

1.2-Napththochinon-3.6-disulfonsaures Kalium: Lange, goldgelbe Stäbchen, löslich in 8 Tln. kaltem Wasser.

$K_2C_{10}H_4O_8S_2$ (394.4) Ber. S 16.26 Gef. S 16.29

1.2-Napththochinon-4.6-disulfonsaures Kalium: Dicke, verwachsene, wahrscheinlich tetragonale Kristalle, löslich in 8 Tln. kaltem Wasser.

$K_2C_{10}H_4O_8S_2$ (394.4) Ber. S 16.26 Gef. S 16.12

1.2-Napththochinon-4.7-disulfonsaures Kalium: Goldgelbe feine Nadeln, löslich in 8 Tln. kaltem Wasser.

Anthracenchinon-(1.2)-sulfonsäure-(4) nach L. F. Fieser¹⁰⁾.

79. Wolfgang Langenbeck und Siegfried Fittkau: Organische Katalysatoren XXXIII. Mittel. *): Peroxydasewirkung verschiedener Oxyhämoglobine

[Aus dem Chemischen Institut der Universität Halle]

(Eingegangen am 3. Februar 1954)

Die Peroxydasewirkungen der Oxyhämoglobine von sieben verschiedenen Tierarten wurden miteinander verglichen. Die Aktivitäten erwiesen sich als deutlich verschieden.

R. Willstätter und A. Pollinger¹⁾ haben schon 1923 gefunden, daß die Oxyhämoglobine des Pferdes, des Hundes, des Rindes und des Schweines sich in ihrer Peroxydasewirkung deutlich unterscheiden. Die Aktivitäten verhalten sich wie 15.2:11.5:11.4:9.3. Die Hämoglobine unterscheiden sich nur in der Zusammensetzung und dem Bau der Globine²⁾, sie liefern also ein Beispiel für die Beeinflussung einer prosthetischen Gruppe (bzw. eines Coferments, des Protohäm) durch verschiedene Proteine. Damit wird eine Frage berührt, die augenblicklich im Mittelpunkt der Enzymforschung steht: Wie kommt die Aktivierung der Cofermente durch die Apofermente zustande?³⁾ Es schien uns deshalb interessant, die erwähnten Versuche auf die Oxyhämoglobine anderer Säugetiere auszudehnen.

Willstätter und Pollinger haben die eingesetzten Mengen der Oxyhämoglobine auf die Trockengewichte bezogen. Da aber die Globine nicht genau die gleichen Molekulargewichte besitzen und die Hämoglobine hartnäckig Wasser festhalten, war es zweckmäßiger und genauer, Katalysatormengen von gleichem Eisen- bzw. Hämgehalt zu vergleichen. Auch haben wir alle Messungen bei mehreren p_H -Werten (2.9, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 und 6.0) ausgeführt, so daß immer die p_H -Optima der Wirkung verglichen werden konnten. Die

¹⁰⁾ J. Amer. chem. Soc. **50**, 469 [1928].

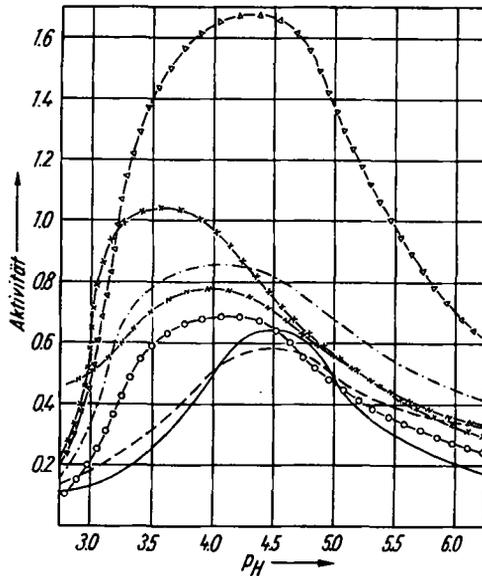
*) XXXII. Mittel.: W. Langenbeck, H. Le Blanc u. B. Lukowczyk, Chem. Ber. **87**, 496 [1954], voranstehend.

¹⁾ Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **130**, 281 [1923].

²⁾ Vergl. dazu R. R. Porter u. F. Sanger in: F. J. W. Roughton u. J. C. Kendrew, „Haemoglobin“ (London 1949), S. 121.

³⁾ Vergl. auch W. Langenbeck, Naturwissenschaften, **37**, 44 [1950]; Z. elektrochem. angew. physik. Chem. **54**, 400 [1950]; Advances in Enzymol. **14**, 180–190 [1953].

Kurven der Abbild. 1 zeigen die peroxydatischen Aktivitäten (mg Purpurogallin nach 15 Min. bei 0°) der mehrfach umkristallisierten Oxyhämoglobine des Pferdes, des Rindes, der weißen Ratte, des Meerschweinchens, des Schweines, des Hundes und des Kaninchens in Abhängigkeit vom p_H ⁴⁾. Die Messungen beziehen sich jeweils auf einen Gehalt der eingesetzten Oxyhämoglobinnmengen von 0.1 mg Hämin.



Abbild. 1. Aktivitäts- p_H -Kurven verschiedener Oxyhämoglobine (Ordinate: mg Purpurogallin) — · · · · · Pferde-Oxy-Hb, - - - - - Rinder-Oxy-Hb, o-o-o Ratten-Oxy-Hb, Δ - Δ - Δ Meerschweinchen-Oxy-Hb, x-x-x Schweine-Oxy-Hb, - - - - - Hunde-Oxy-Hb, — Kaninchen-Oxy-Hb

Man ersieht aus der Kurvenschar, daß die Oxyhämoglobine sich nicht nur in den Aktivitäten, sondern auch in der Lage der p_H -Optima sehr deutlich unterscheiden. Die Verhältniszahlen von Willstätter und Pollinger konnten auch unter den verfeinerten Bedingungen im wesentlichen bestätigt werden^{4a)}. Neu und bemerkenswert ist die auffallend hohe Aktivität des Meerschweinchen-Oxyhämoglobins. Sie ist etwa dreimal so groß wie die des Hunde-Oxyhämoglobins. Wir sehen in den Ergebnissen eine Bestätigung unserer Theorie der aktivierenden Gruppen³⁾.

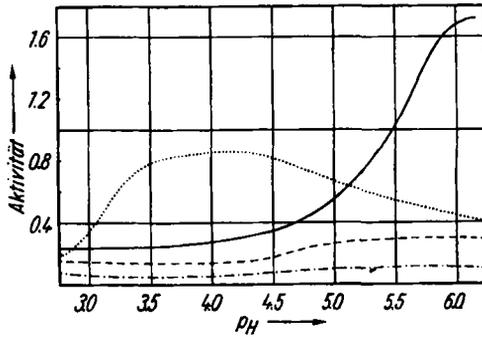
Abbild. 2 bringt einen Vergleich der Aktivitäten von Pferde-Oxyhämoglobin mit Hämin, Pyridin-parahämatin und Imidazol-parahämatin⁵⁾. Auf-

⁴⁾ Dem pharmakologischen Institut der Univ. Halle, insbesondere Herrn Prof. Dr. F. Holtz danken wir für die Überlassung von Kleintierblut.

^{4a)} Willstätter und Pollinger arbeiteten ohne Puffer, also in der Nähe des Neutralpunktes.

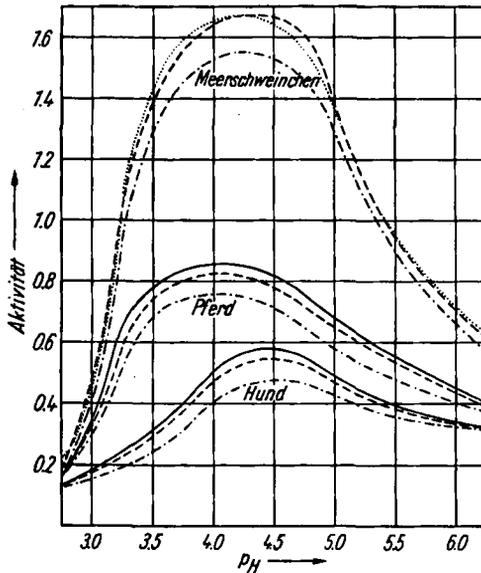
⁵⁾ W. Langenbeck, R. Hutschenreuter u. W. Rottig, Ber. dtsh. chem. Ges. 65, 1750 [1932].

fallend ist besonders die starke Verschiebung des p_H -Optimums durch das Globin. Beim Imidazol-parahämatin ist im untersuchten p_H -Bereich das Optimum noch nicht erreicht.



Abbild. 2. Aktivitäts- p_H -Kurven von Häm, (— · — · —) Pyridin-parahämatin (---), Imidazol-parahämatin (—) und Pferde-Oxyhämoglobin (·····)

Abbild. 3 zeigt den Effekt des Umkristallisierens auf die Aktivität der Oxyhämoglobine des Hundes, Pferdes und Meerschweinchens. Man erkennt, daß schon nach der zweiten Kristallisation die Aktivität fast konstant ist. Eine Ausnahme macht nur das sehr leicht lösliche Schweine-Oxyhämoglobin (s. u.).



Abbild. 3. Aktivität von Oxyhämoglobinen ----- einmal, ---- zweimal, — dreimal umkristallisierte Präparate; ····· Vergleichsbestimmung

Beschreibung der Versuche⁶⁾

Darstellung und Reinigung der Oxyhämoglobine

Die rohen Oxyhämoglobin-Lösungen aus Citratblut wurden im wesentlichen nach dem Verfahren von R. Willstätter und A. Pollinger¹⁾ dargestellt.

1. Umkristallisation unter Zusatz von Alkohol

Pferde-Oxyhämoglobin: 60 ccm der filtrierten Rohlösung wurden bei 0° unter Turbinieren allmählich mit 15 ccm Alkohol versetzt und 12 Stdn. bei -7° aufbewahrt. Die abgeschiedenen Kristalle wurden noch feucht in derselben Art noch zweimal umkristallisiert. Lange flache Nadeln.

Hunde-Oxyhämoglobin: 100 ccm der Rohlösung wurden bei 0° mit 20 ccm Alkohol versetzt; sonst wie oben. Lange, rhombische, an den Enden zugespitzte Nadeln.

Rinder-Oxyhämoglobin: Die Lösung wurde mit $\frac{1}{3}$ ihres Vol. an Alkohol versetzt und 24 Stdn. bei -12° aufbewahrt. Die Kristalle saugte man in einer auf -15° gekühlten Nutsche ab und kristallisierte noch zweimal in derselben Weise um. Rhombische, zugespitzte lange Nadeln.

Meerschweinchen-Oxyhämoglobin kristallisierte schon bei der Hämolyse der Blutkörperchen mit der doppelten Menge Wasser vollständig aus. Es wurde zweimal mit kaltem Wasser gewaschen, bei 55° rasch mit Wasser in Lösung gebracht, filtriert und, mit 20 ccm Alkohol versetzt, 4 Tage bei 0° aufbewahrt. Derbe Kristalle, nach dem optischen Verhalten rhombisch.

Ratten-Oxyhämoglobin, ähnlich schwer löslich wie das Meerschweinchen-Oxyhämoglobin, wurde in derselben Weise bei 55° umkristallisiert. 100 ccm der filtrierten Lösung wurden mit 10 ccm Alkohol versetzt und 12 Stdn. bei 0° aufbewahrt. Dünne, hexagonale Tafeln.

Schweine-Oxyhämoglobin: Kristallisation und Reinigung des sehr leicht löslichen Stoffes erfolgten ähnlich wie bei Rinder-Oxyhämoglobin, nur wurde die Lösung 1-3 Wochen bei -15° aufbewahrt; die abzentrifugierten Kristalle wurden mit 30-proz. Alkohol nachgewaschen. Sehr leicht zerfließliche, feine Nadeln.

2. Kristallisation unter Zusatz von Ammoniumsulfat

Kaninchen-Oxyhämoglobin: 15 ccm möglichst konzentrierte Hämoglobinlösung wurden mit 3 ccm 0.5 *m* Phosphatpuffer vom p_H 7.4, dann unter Rühren tropfenweise mit 40 ccm gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzt. Die Kristalle wurden nach 6 Stdn. abzentrifugiert, in wenig Wasser gelöst und bei 0° mit wenig Ammoniumsulfatlösung versetzt. Nach wenigen Minuten war fast vollständige Kristallisation eingetreten. Längliche, sehr leicht lösliche Tafeln, monoklin oder triklin.

Schweine-Oxyhämoglobin: Kristallisation und Umkristallisation wie bei Kaninchen-Oxyhämoglobin. Im Gegensatz zur Alkohol-Methode wurden derbe Doppelpyramiden erhalten. Die mit Ammoniumsulfat abgeschiedenen Oxyhämoglobine wurden vor der Messung in Wasser gelöst und durch Cellophan sulfatfrei dialysiert.

Das nach dem Ammoniumsulfat-Verfahren dargestellte Schweine-Oxyhämoglobin war, besonders nach der Dialyse, wesentlich aktiver als das Alkoholprodukt. Wahrscheinlich war das letztere bei der mehrwöchigen Auskristallisation z.Tl. inaktiviert.

Tafel 1. Peroxydase-Aktivität des Schweine-Oxyhämoglobins beim optimalen p_H 3.5

Aus alkohol. Lösung einmal kristallisiert:	0.610 mg Purpurogallin		
„ „ „ zweimal	„ 0.778 „ „		
mit Ammoniumsulfat dreimal	„ 0.921 „ „		
Dasselbe nach der Dialyse	1.033 „ „		

⁶⁾ Weitere experimentelle Einzelheiten, auch Mikrophotographien der krist. Oxyhämoglobine, findet man in der Diplomarbeit von S. F i t t k a u, Halle 1953, die demnächst in der wiss. Zeitschr. der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg veröffentlicht wird.

3. Papierelektrophorese

Die Papierelektrophorese der mehrmals umkristallisierten Oxyhämoglobine von Meerschweinchen, Pferd und Rind ergab keinerlei Anhaltspunkte für die Anwesenheit fremder Proteine.

4. Hämoglobin-Bestimmung

a) Eine abgewogene Menge (etwa 50 mg) feuchtes Oxyhämoglobin wurde im Reagensglas mit 1,5 ccm konz. eisenfreier Salpetersäure erwärmt, dann gekocht und mit einigen Tropfen Perhydrol entfärbt. Lichtelektrisch-kolorimetrische Eisenbestimmung mit Sulfo-salicylsäure nach L. Lorber⁷⁾.

b) Die Hämoglobinlösung wurde durch Erwärmen mit 0,1 *n* HCl denaturiert und nach M. Kiese⁸⁾ lichtelektrisch-kolorimetrisch als Hämochromogen bestimmt. Statt Ammoniak wurde Pyridin zugesetzt, das ein beständigeres und intensiver gefärbtes Hämochromogen ergibt. Vergleich mit Hämochromogen aus reinem Hämin.

Die Methode a) wich bei mehreren Messungen desselben Präparates um höchstens 4,4% vom Mittelwert ab, Methode b) um höchstens 1,5%. Auch die Abweichungen der beiden Methoden voneinander überschritten diese Fehlergrenze nicht.

5. Aktivitätsmessung

Es wurde die Meßmethode von W. Langenbeck, R. Hutschenreuter und W. Rottig⁵⁾ angewandt, die von der Methode von R. Willstätter und A. Stoll⁹⁾ nur wenig abweicht. Sie beruht auf der Bildung von Purpurogallin aus Pyrogallol bei 0° (Acetatpuffer). Das Purpurogallin wird nach 15 Min. ausgeäthert und lichtelektrisch-kolorimetrisch bestimmt. Die noch feuchten Oxyhämoglobin-Kristalle oder die wäßr. Lösungen wurden entsprechend ihrem vorher analytisch bestimmten Hämingehalt (s. o.) von 0,1 mg eingewogen. Eine kinetische Messung zeigte, daß unter diesen Bedingungen nach 15 Min. der Reaktionsverlauf noch linear ist.

80. Egon Stahl: Über das Cham-Azulen und dessen Vorstufen, II. Mitteil.*): Cham-Azulencarbonsäure aus Kamille**)

[Aus dem Botanischen Institut der Technischen Hochschule Karlsruhe]

(Eingegangen am 12. Februar 1954)

Aus proazulenhaltigen Kamillenauszügen wurde eine kristalline, blaue Azulencarbonsäure erhalten und ihre Identität mit der aus Schafgarbe isolierten Säure bewiesen.

Beim Erwärmen einer angesäuerten Proazulenanreicherung***) aus Kamille tritt nach kurzer Zeit eine blaue Trübung auf. Die blaue Substanz läßt sich mit Äther ausschütteln und aus der Ätherphase mit wäßrigem Alkali zum großen Teil wieder entziehen.

⁷⁾ Biochem. Z. 181, 391 [1927].

⁸⁾ Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. 204, 199 [1947].

⁹⁾ Liebigs Ann. Chem. 416, 21 [1918].

* I. Mitteil.: E. Stahl, Chem. Ber. 87, 202 [1954].

** Herrn Prof. Dr. K. Bodendorf danke ich für die Durchsicht der Arbeit und das Interesse, das er ihr zuteil werden ließ.

***) Die Behandlung mit Alkali – in gleicher Weise wie bei Schafgarbe*) durchgeführt – ergibt keine rotbraune Farbe, keinen blumigen Geruch und beim nachfolgenden Ansäuern auch keine Blaufärbung.