

## 112. Inhibitoren der enzymatischen Oxydation ungesättigter Fettsäuren

von H. Süllmann,

(26. III. 43.)

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss verschiedener Stoffe auf die durch die Lipoxydase aus Leguminosensamen bewirkte Oxydation ungesättigter Fettsäuren<sup>1)</sup> geprüft. Von den untersuchten Stoffen wird die eine Gruppe (in erster Linie phenolische Verbindungen) auf Grund ihrer Wirkung bei zahlreichen Oxydationsvorgängen im allgemeinen zu den Antioxydantien<sup>2)</sup>, die andere Gruppe (Cyanid, Azid, Sulfid, Pyrophosphat) zu den Schwermetallgiften<sup>3)</sup> gezählt.

Die in Gegenwart des Enzyms erfolgende Oxydation von Linolensäure, Leinölsäure oder Lecithin wird durch Substanzen beider Gruppen gehemmt. Nur Pyrophosphat hat keinen deutlichen hemmenden Einfluss erkennen lassen.

### Versuche und Ergebnisse.

Methodisches. Die Enzymlösungen wurden durch Extraktion von 5 g entfettetem Sojabohnenpulver mit 100 cm<sup>3</sup> Wasser und anschliessende Dialyse über Nacht gegen fließendes Leitungswasser erhalten. Von den ausgefallenen Globulinen wurde durch Zentrifugieren abgetrennt.

Als Substrate wurden Linolensäure, „Leinölsäure“ (*Kahlbaum*) und Lecithin (ex ovo) in Form wässriger Emulsionen verwendet. Linolen- und Leinölsäure wurden mit der berechneten Menge Natronlauge gelöst und die Lösungen mit 80 Proz. der zur vollständigen Umsetzung notwendigen Menge Salzsäure neutralisiert. Lecithin wurde in Äther gelöst und die ätherische Lösung in warmes Wasser unter Rühren eingetragen. Zur Entfernung des Äthers wurde die Lecithinemulsion ins Vakuum gebracht. Lecithinemulsionen bieten den Vorzug grösserer Stabilität bei saurer Reaktion.

Die auf ihren Einfluss zu prüfenden Substanzen waren reinste *Kahlbaum*-Präparate, mit Ausnahme von *d,l*- $\alpha$ -Tocopherol, Ascorbinsäure, 3,4-Dioxy-phenylalanin (*F. Hoffmann-La Roche & Cie. A.G.*) und Adrenalin (*Gesellschaft für chemische Industrie in Basel*<sup>4)</sup>). Die Substanzen wurden in Wasser oder Alkohol gelöst. Sofern alkoholische Lösungen zur Verwendung kamen ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Naphthol, Tocopherol), wurden den Parallelversuchen ohne Inhibitor die gleichen Mengen Alkohol zugesetzt. Wegen der beschränkten Löslichkeit der zuletzt genannten Stoffe in der wässrigen Phase der Versuchslösung lässt sich ihre wirksame Konzentration nicht sicher angeben. Vielleicht spielt auch die

<sup>1)</sup> Vorhergehende Mitteilungen: *H. Süllmann*, *Helv.* **24**, 465, 646 (1941); **25**, 521 (1942); *Verh. Schweiz. Physiol.* Juli 1941; Juni 1942.

<sup>2)</sup> Vgl. die zusammenfassenden Darstellungen: *K. Weber*, „Inhibitorwirkungen“ (Stuttgart 1938). — *Ch. Dufraisse* und *P. Chovin*, „La catalyse négative“ etc. in *G.-M. Schwab*, *Handb. d. Katalyse*, Bd. **2**, S. 339 (Wien 1940). — *K. C. Bailey*, „The retardation of chemical reactions“ (London 1937).

<sup>3)</sup> *O. Warburg*, „Katalytische Wirkungen der lebendigen Substanz“ (Berlin 1928). — *D. Keilin*, *Proc. Roy. Soc. (London)*, [B] **113**, 393 (1933); **121**, 165 (1936).

<sup>4)</sup> Für die Überlassung von Adrenalin pur. danken wir auch an dieser Stelle bestens.

Verteilung der übrigen Stoffe in dem heterogenen System eine Rolle. Natriumcyanid, Natriumazid und Natriumsulfid wurden mit Salzsäure, Ascorbinsäure wurde mit Natriumhydrogencarbonat neutralisiert. In der Regel wurden Enzym und Inhibitor im Hauptraum der Atmungsgefäße zusammengebracht und die Substratlösung bei Versuchsbeginn aus dem Seitengefäß zugekippt.

Die Messung des Sauerstoffverbrauchs geschah manometrisch nach *Warburg* bei 37°. Im Gasraum befand sich Luft. Zur Absorption etwa entstehenden Kohlendioxyds<sup>1)</sup> enthielt das Innengefäß Natronlauge. In den Versuchen mit Cyanid, Azid und Sulfid blieb das Innengefäß leer.

Die angegebenen  $p_H$ -Werte beziehen sich auf das  $p_H$  der zugesetzten Pufferlösung.

Die zunächst als Substrat verwendete Linolensäure musste in weiteren Versuchen durch Leinölsäure oder Lecithin ersetzt werden. Soweit in den Versuchen verschiedene Substrate vorliegen, ist nur ein bedingter Vergleich der Ergebnisse, besonders in quantitativer Beziehung, möglich. Die Angaben über die Inhibitorwirkung beschränken sich im übrigen auf die Anführung der Sauerstoffaufnahme und prozentualer Hemmungswerte, wie sie unter den angegebenen Versuchsverhältnissen gefunden wurden.

## 1. Phenolische Verbindungen.

Die in Gegenwart der Lipoxydase erfolgende Oxydation von Linolensäure wird durch alle untersuchten phenolischen Verbindungen gehemmt. Als Inhibitoren der enzymatischen Linolensäureoxydation von starker bis mittlerer Wirksamkeit können angesprochen werden: Brenzcatechin, Hydrochinon,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Naphthol, p-Aminophenol, Dioxy-phenyl-alanin, Adrenalin und Tocopherol. Von schwächerer, aber noch deutlicher Wirkung sind Phloroglucin und Resorecin<sup>2)</sup>.

Tabelle I enthält die unter den angegebenen Versuchsbedingungen erhaltenen prozentualen Hemmungswerte für verschiedene Inhibitor-konzentrationen.

Die von den angeführten Inhibitoren infolge ihrer Autoxydation aufgenommenen Sauerstoffmengen sind im allgemeinen gering (etwa bis zu 25 mm<sup>3</sup> O<sub>2</sub> in 5 Stunden für 0,01-m. Lösungen). p-Aminophenol und Adrenalin nehmen grössere Mengen Sauerstoff auf: z. B. 0,01-m. p-Amino-phenol in 5 Stunden 150 mm<sup>3</sup>; 0,005-m. Adrenalin in 4 Stunden 96 mm<sup>3</sup>, 0,001-m. Adrenalin in der gleichen Zeit 23 mm<sup>3</sup>. Die von den beiden letzten Inhibitoren allein aufgenommenen Mengen Sauerstoff sind bei der Berechnung der prozentualen Hemmung in Tabelle I berücksichtigt, während sonst die sich aus der Autoxydation der übrigen Inhibitoren ergebende geringfügige Korrektur nicht in Anrechnung gebracht wurde.

<sup>1)</sup> In Ansätzen, die bei  $p_H = 6,3$  1 cm<sup>3</sup> Enzymlösung und 1 cm<sup>3</sup> 0,1-m. Leinölsäure enthielten, wurden in 4 Stunden mit Natronlauge im Innengefäß 1020 mm<sup>3</sup> O<sub>2</sub> verbraucht, ohne Natronlauge trat eine Druckänderung entsprechend einem Verbrauch von 960 mm<sup>3</sup> O<sub>2</sub> auf. Die im Laufe des Versuchs allenfalls entstehende Menge Kohlendioxyd ist danach auf wenige Prozent des Sauerstoffverbrauchs zu veranschlagen.

<sup>2)</sup> Von Phloroglucin und Resorecin kamen mit den gleichen Ergebnissen auch *Merck*-Präparate zur Anwendung. Das Vorhandensein von zufälligen, hemmend wirkenden Verunreinigungen ist daher nicht sehr wahrscheinlich. In einer vorläufigen Mitteilung gibt *Strain* (*Am. Soc.* **63**, 3542 (1941)) an, dass die Oxydation von ungesättigtem Fett durch die Lipoxydase („unsaturated fat oxydase“) von Phloroglucin und Resorecin nicht gehemmt wird. Neben anderen abweichenden Versuchsbedingungen spielt vielleicht die Natur des Substrats für die verschiedenen Befunde eine Rolle.

Tabelle I.

Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die enzymatische Oxydation von Linolensäure.

4 cm<sup>3</sup> enthalten: 1 cm<sup>3</sup> Enzym, 1 cm<sup>3</sup> 0,05-m. Linolensäure, 1 cm<sup>3</sup> 0,2-m. Phosphat (p<sub>H</sub> = 6,3), Inhibitoren in den angegebenen Konzentrationen. — Durchschnittlicher O<sub>2</sub>-Verbrauch in den Versuchen ohne Inhibitor: 182 mm<sup>3</sup> nach 10 Minuten, 490 mm<sup>3</sup> nach 60 Minuten und 1035 mm<sup>3</sup> nach 300 Minuten.

Inhibitor	Molarität	% Hemmung nach		
		10 Min.	60 Min.	300 Min.
Brenzcatechin . . . . .	0,25 × 10 <sup>-3</sup>	32	56	76
„ . . . . .	1 × 10 <sup>-3</sup>	47	80	90
„ . . . . .	1 × 10 <sup>-2</sup>	85	93	95
Resorcin . . . . .	0,25 × 10 <sup>-3</sup>	0	5	14
„ . . . . .	1 × 10 <sup>-3</sup>	0	6	18
„ . . . . .	1 × 10 <sup>-2</sup>	18	29	50
Hydrochinon . . . . .	0,25 × 10 <sup>-3</sup>	0	47	74
„ . . . . .	1 × 10 <sup>-2</sup>	35	81	—
Phloroglucin . . . . .	0,25 × 10 <sup>-3</sup>	0	8	32
„ . . . . .	1 × 10 <sup>-3</sup>	0	17	40
„ . . . . .	1 × 10 <sup>-2</sup>	39*	40	63
„ . . . . .	2 × 10 <sup>-2</sup>	39*	56	70
α-Naphtol . . . . .	1 × 10 <sup>-2</sup>	95*	96	—
β-Naphtol . . . . .	1 × 10 <sup>-2</sup>	87*	92	—
p-Aminophenol . . . . .	1 × 10 <sup>-3</sup>	37*	55	71
„ . . . . .	1 × 10 <sup>-2</sup>	76*	88	90
Adrenalin . . . . .	1 × 10 <sup>-3</sup>	17	36	55**
„ . . . . .	0,5 × 10 <sup>-2</sup>	43	50	64**
Dioxy-phenylalanin . . . . .	0,25 × 10 <sup>-3</sup>	6	30	60
„ . . . . .	0,5 × 10 <sup>-3</sup>	8	34	63
Tocopherol . . . . .	1 × 10 <sup>-3</sup>	22*	45	62
„ . . . . .	1 × 10 <sup>-2</sup>	41*	50	62

\* Prozent Hemmung nach 15 Minuten.

\*\* „ „ „ 240 „

Es ist ersichtlich, dass die hemmende Wirkung der Inhibitoren mit fortschreitender Versuchszeit deutlicher in Erscheinung tritt. Das zeigt sich besonders für die kleineren Inhibitorkonzentrationen. Zu bemerken ist, dass die in der Zeiteinheit aufgenommene Menge Sauerstoff in dem vorliegenden System: Enzym + Linolensäure mit der Versuchszeit abnimmt (im Gegensatz zu dem autokatalytischen Verlauf der Autoxydation von Linolensäure). Diese Abnahme ist aber in Anwesenheit der Inhibitoren in der Regel noch grösser, entsprechend einer relativen Zunahme der Hemmung während der Versuchszeit.

Höhere Inhibitorkonzentrationen hemmen auch die Anfangsreaktion stark, je nach Inhibitor unter Umständen nahezu vollständig. So beträgt die Hemmung mit 0,01-m. Brenzcatechin oder Naphtol nach den ersten Messzeiten von 10 bzw. 15 Minuten bereits 85—95%.

Tabelle II.

Hemmung der Oxydation von Lecithin durch Brenzcatechin.

4 cm<sup>3</sup> enthalten: 1 cm<sup>3</sup> Enzym, 1 cm<sup>3</sup> 6-proz. Lecithin-emulsion, 1 cm<sup>3</sup> 0,02-m. Phosphat (p<sub>H</sub> = 6,3); Brenzcatechin.

Messzeit (Minuten)	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> (ohne Brenz.)	Prozent Hemmung		
		+ 0,0001-m. Brenz.	+ 0,001-m. Brenz.	+ 0,01-m. Brenz.
10	74	80	92	100
30	178	81	92	100
180	562	69	95	100
360	745	62	95	100

Mit Lecithin als Substrat treten quantitativ etwas andere Verhältnisse auf. Zunächst ist darauf hinzuweisen, dass in gleichen Zeiten mit Lecithin<sup>1)</sup> weniger Sauerstoff aufgenommen wird als mit Leinöl- oder Linolensäure. Tabelle II zeigt die Wirkung von Brenzcatechin in 0,0001-, 0,001- und 0,01-m. Konzentrationen. Bereits die kleinste Brenzcatechinkonzentration hemmt die Sauerstoffaufnahme beträchtlich. Die Hemmung nimmt bei dieser Inhibitorkonzentration im Laufe des Versuchs von 80 auf 62% ab. Diese Abnahme der Hemmungswirkung dürfte durch einen Schwund der wirksamen Inhibitorkonzentration zu erklären sein. Ab 0,001-m. Brenzcatechin wird die enzymatische Oxydation des Lecithins über die ganze Versuchszeit praktisch vollständig gehemmt.

Tabelle III.

Hemmung der Oxydation von Lecithin durch Phloroglucin.

Ansätze wie in der vorstehenden Tabelle.

Messzeit (Minuten)	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> (ohne Phlo- rogglucin)	Prozent Hemmung	
		+ 0,0025-m. Phlorogl.	+ 0,0125-m. Phlorogl.
10	55	0	0
30	143	3	8
120	337	21	28
330	518	32	38

<sup>1)</sup> Die enzymatische Oxydation von Lecithin und der freien ungesättigten Fettsäuren betrachten wir hier unter denselben Gesichtspunkten, nehmen also primär eine Addition von Sauerstoff an die Substrate an. Die Frage, ob daneben auch andere Vorgänge (Dehydrierungen) eine Rolle spielen, bleibt zu untersuchen.

Wie in den Versuchen mit Linolensäure hat Phloroglucin auch in den Versuchen mit Lecithin (Tabelle III) eine schwächere hemmende Wirkung als z. B. Brenzcatechin.

Tabelle IV gibt Versuche mit verschiedenen Mengen Lecithin bzw. Leinölsäure und 0,001-m. Brenzcatechin wieder. Die Oxydation von Lecithin wird stärker gehemmt als die von Leinölsäure. Obgleich mit Lecithin weniger Sauerstoff aufgenommen wird als mit Leinölsäure, ist eine durchgehende Abhängigkeit zwischen dem Sauerstoffverbrauch und der prozentualen Hemmung nicht festzustellen. Wenn trotzdem für die erzielte Hemmung die Oxydationsgeschwindigkeit eine Rolle spielen mag, scheint hierfür auch die Natur des Substrats von Bedeutung zu sein.

**Tabelle IV.**  
Hemmung der Oxydation von Lecithin- und Leinölsäure durch Brenzcatechin.

In 4 cm<sup>3</sup> befinden sich: 1 cm<sup>3</sup> Enzym, die angegebenen Mengen Lecithin bzw. Leinölsäure, 1 cm<sup>3</sup> 0,2-m. Phosphat (p<sub>H</sub> = 6,3); in den Versuchen mit Inhibitor: 0,001-m. Brenzcatechin. Die O<sub>2</sub>-Aufnahme ist nur für die Versuche ohne Brenzcatechin angegeben.

Versuch	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> nach 30 Min.	% Hemmung	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> nach 300 Min.	% Hemmung
Enzym + 30 mg Lecithin . . .	123	95	322	92
„ + 90 mg „ . . .	151	100	600	96
„ + 7 mg Leinölsäure .	354	54	676	72
„ + 21 mg „ .	443	61	1191	83

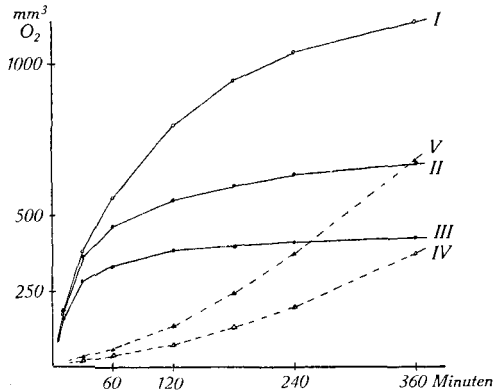


Fig. 1.

Einfluss von Phloroglucin auf die Oxydation von Linolensäure. Versuche mit 1 cm<sup>3</sup> Enzym, 1 cm<sup>3</sup> 0,05-m. Linolensäure, 1 cm<sup>3</sup> 0,2-m. Phosphat (p<sub>H</sub> = 6,3). Ausgezogene Kurven: mit Enzym; unterbrochene Kurven: ohne Enzym. — I: Enzym + Linolensäure; II: + 0,001-m. Phloroglucin; III: + 0,01-m. Phloroglucin. — IV: Linolensäure; V: + 0,01-m. Phloroglucin.

Während Phenole im allgemeinen als Inhibitoren der Autoxydation ungesättigter Fette und Fettsäuren wirksam sind, wird die Autoxydation von Linolensäure durch Phloroglucin nicht gehemmt, sondern beschleunigt<sup>1)</sup>. Diese Wirkung des Phloroglucins geht aus Kurven der Fig. 1 hervor. Bemerkenswert erscheint dabei noch die im Verhältnis zur Sauerstoffaufnahme von Linolensäure (ohne und mit Phloroglucin) ausgeprägte Hemmung des Sauerstoffverbrauches im System der Lipoxydase durch Phloroglucin; die abgeflachten „Hemmungskurven“ (mit 0,001- und 0,01-m. Phloroglucin) stehen im Gegensatz zu den ansteigenden Kurven der Versuche ohne Enzym. Phloroglucin wirkt also im System der Lipoxydase „antioxygen“, bei der Autoxydation von Linolensäure (und Lecithin) dagegen „prooxygen“. (Die an sich geringere Autoxydation von Lecithin wird durch 0,0025-m. Phloroglucin auf etwa das 2,5fache erhöht).

Chinon wirkt ebenfalls, sowohl auf die enzymatische Oxydation von Lecithin als auch auf die von Leinölsäure, hemmend. In Ansätzen, die den vorhergehenden Versuchen entsprachen, betrug die Hemmung nach 4 Stunden für Lecithin mit 0,001-m. Chinon 82%, mit 0,01-m. Chinon 100%; für Leinölsäure mit 0,001-m. Chinon 52%, mit 0,01-m. Chinon 71%.

Eine in Betracht fallende Oxydation der phenolischen Inhibitoren durch die Enzymlösung allein (ohne ungesättigte Fettsäuren) wurde nicht beobachtet. Insbesondere wurde in wiederholten Versuchen festgestellt, dass keine Oxydation von Brenzcatechin durch die Enzymlösung stattfindet. Die entsprechende Polyphenol-oxydase kann deshalb in den verwendeten Extrakten kaum vorhanden sein.

## 2. Ascorbinsäure.

Bei der Prüfung der Ascorbinsäurewirkung traten zunächst insofern Schwierigkeiten auf, als die Ascorbinsäure in der üblichen Versuchsanordnung eine beträchtliche Eigenoxydation zeigte, was die Beurteilung der Ergebnisse erschwerte. Um die — vermutlich durch Schwermetallspuren verursachte oder geförderte — Oxydation der Ascorbinsäure herabzudrücken, wurde in den folgenden Versuchen ein Pyrophosphatpuffer verwendet.

Die Wirkung der Ascorbinsäure in An- und Abwesenheit von Enzym ist aus den Kurven der Fig. 2 zu ersehen. Ascorbinsäure hemmt die enzymatische Oxydation der Linolensäure. Diese Wirkung der Ascorbinsäure im System der Lipoxydase ist insofern besonders bemerkenswert, weil die Autoxydation von Linolensäure durch Ascorbinsäure wirksam beschleunigt wird. Eine „katalytische“ Wirkung der Ascorbinsäure auf die Autoxydation von Leinöl wurde bereits von *Holtz*<sup>2)</sup> festgestellt und eingehend untersucht<sup>3)</sup>. In den Versuchen

<sup>1)</sup> *W. Franke* (A. **498**, 152 (1932)) fand bereits eine beschleunigende Wirkung von Phloroglucin auf die Autoxydation von Leinölsäure.

<sup>2)</sup> *P. Holtz*, Arch. exptl. Path. Pharmakol. **182**, 98 (1936).

<sup>3)</sup> Über die Beschleunigung der Oxydation von Phosphatiden durch Ascorbinsäure vgl. *H. F. Deutsch*, *B. E. Kline* und *H. P. Rusch*, J. Biol. Chem. **141**, 529 (1941).

der Fig. 2 tritt der Beschleunigungseffekt auf die Autoxydation der Linolensäure mit 0,001-m. Ascorbinsäure nur wenig, mit 0,01-m. dagegen ausgeprägt hervor (Kurve VI im Vergleich zu Kurve IV).

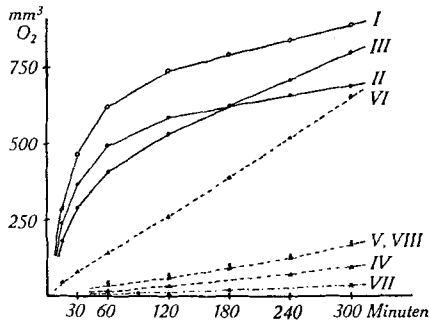


Fig. 2.

Einfluss von Ascorbinsäure auf die Oxydation von Linolensäure. Versuche mit 1 cm<sup>3</sup> Enzym, 1 cm<sup>3</sup> 0,05-m. Linolensäure, 1,4 cm<sup>3</sup> 0,16-m. Pyrophosphatpuffer (p<sub>H</sub> etwa 6,3); Volumen 4 cm<sup>3</sup>. — Ausgezogene Kurven: mit Enzym; unterbrochene Kurven: ohne Enzym. — I: Enzym + Linolensäure; II: + 0,001-m. Ascorbinsäure; III: + 0,01-m. Ascorbinsäure. — IV: Linolensäure; V: + 0,001-m. Ascorbinsäure; VI: + 0,01-m. Ascorbinsäure. — VII und VIII: 0,001-m. bzw. 0,01-m. Ascorbinsäure allein.

Andererseits ist die Hemmung der enzymatischen Oxydation am Versuchsende mit der kleinen Ascorbinsäurekonzentration etwas grösser als mit der höheren Konzentration, und im letzten Falle nähert sich die Kurve der zeitlichen Sauerstoffaufnahme zunehmend derjenigen des Vergleichsversuchs ohne Ascorbinsäure. Dies macht sehr wahrscheinlich, dass Ascorbinsäure — wenigstens in der höheren, die Autoxydation von Linolensäure stark beschleunigenden Konzentration — in Gegenwart des Enzyms eine zweifache Wirkung auf die Oxydation der Linolensäure hat: eine beschleunigende (wie sie in den Versuchen ohne Enzym vorliegt) und eine hemmende. Die Inhibitorwirkung der Ascorbinsäure auf die enzymatische Oxydation dürfte daher höher zu veranschlagen sein, als in den betreffenden Versuchen ohne weiteres zum Ausdruck kommt.

Die von Ascorbinsäure aufgenommene Menge Sauerstoff ist in Gegenwart der Enzymlösung nicht erhöht (auch nicht in Phosphatpuffer). Die Lipoxydase vermag also Ascorbinsäure unter den Versuchsbedingungen nicht in sichtbarem Umfange zu oxydieren.

Nach *Golumbic* und *Mattill*<sup>1)</sup> wirkt Ascorbinsäure bei der Autoxydation natürlicher Fette als Inhibitor. Diese Wirkung wird in einer Verstärkung der Wirksamkeit anderer vorhandener Inhibitoren gesehen. Wird Tocopherol aus dem Fett entfernt, so wirkt Ascorbinsäure nicht mehr hemmend. Ob die hemmende Wirkung der Ascorbinsäure im System der Lipoxydase in ähnlicher Weise auf das Vorhandensein geringer, für sich nicht deutlich wirksamer Inhibitormengen in den Enzymlösungen bzw. in den Substratlösungen zurückgeführt werden kann, entzieht sich vorerst unserer Kenntnis.

<sup>1)</sup> *C. Golumbic* und *H. A. Mattill*, *Am. Soc.* **63**, 1279 (1941).

### 3. Die Wirkung von Cyanid, Azid, Sulfid und Phosphat.

Aus früher mitgeteilten Versuchen<sup>1)</sup> geht bereits hervor, dass die enzymatische Oxydation ungesättigter Fettsäuren durch Cyanid gehemmt wird, dass diese Hemmung aber, selbst bei einer Konzentration von 0,025-m. Cyanid in der Versuchslösung, unvollständig ist. Das Ausmass der in einzelnen Versuchen erzielten Cyanid-Hemmung schwankt in gewissen Grenzen. Die mit Leinölsäure oder Linolensäure als Substrate in verschiedenen Versuchen gefundenen Hemmungswerte betragen für 0,025-m. Cyanid etwa 30—50 % nach der mehrstündigen Versuchszeit.

Die folgende Tabelle V enthält eine Versuchsreihe über die Hemmung der enzymatischen Oxydation von Lecithin durch Cyanid bei verschiedenem  $p_H$ .

Tabelle V.

#### Hemmung der Oxydation von Lecithin durch Cyanid.

Ansätze mit 1 cm<sup>3</sup> Enzym, 1 cm<sup>3</sup> Lecithin (6-proz. Emulsion), 1 cm<sup>3</sup> 0,2-m. Phosphatpuffer von angegebenem  $p_H$ , 0,005- und 0,025-m. NaCN (mit HCl bis  $p_H$  = etwa 6 bzw. 7,8 neutralisiert). Volumen der Versuchslösung: 4 cm<sup>3</sup>.

$p_H$	NaCN	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> nach Minuten			Prozent Hemmung nach Minuten		
		30	120	300	30	120	300
5,3	—	94	250	372			
5,3	0,0001-m.	75	200	274	20	20	27
5,3	0,005-m.	44	128	196	53	49	47
5,3	0,025-m.	20	64	115	79	75	69
6,3	—	123	322	482			
6,3	0,005-m.	77	203	306	37	37	37
6,3	0,025-m.	59	167	261	52	48	46
7,8	—	119	193	312			
7,8	0,005-m.	122	171	234	0	11	25
7,8	0,025-m.	104	155	210	13	20	32

Die Hemmung der Oxydation von Lecithin durch Cyanid nimmt mit dem abnehmenden  $p_H$ -Wert der zugesetzten Pufferlösung deutlich zu. Die bei  $p_H$  = etwa 5,3 erzielten Hemmungswerte von 50 % für 0,005-m. Cyanid bzw. 70—80 % für 0,025-m. Cyanid zeigen deutlich die Cyanidempfindlichkeit der vorliegenden Oxydation von Lecithin, wenn die Hemmung auch hier unvollständig bleibt.

Die unter den bisherigen Versuchsbedingungen unvollständige Hemmung vermag auch die in einer vorhergehenden Arbeit<sup>2)</sup> festgestellte unregelmässige Hemmung der Sekundäroxydation von Carotin durch Cyanid zu erklären.

<sup>1)</sup> Helv. 24, 1360 (1941).

<sup>2)</sup> H. Süllmann, Helv. 24, 646 (1941).



Die Wirkung des von *Keilin*<sup>1)</sup> als weiteres Schwermetallgift in die Enzymchemie eingeführten Natriumazids wurde in den folgenden Versuchen mit Lecithin als Substrat untersucht.

**Tabelle VI.**

Hemmung der Oxydation von Lecithin durch Natriumazid.  
Ansätze wie in Tabelle V.

p <sub>H</sub>	Azid	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> nach Minuten			Prozent Hemmung nach Minuten		
		30	120	300	30	120	300
5,3	—	75	210	316			
5,3	0,005-m.	9	47	102	88	78	68
5,3	0,025-m.	2	15	42	97	93	87
7,8	—	120	197	310			
7,8	0,005-m.	123	198	280	0	0	10
7,8	0,025-m.	120	196	276	0	0	11

In Tabelle VI ist eine Versuchsreihe mit Phosphatpuffern von p<sub>H</sub> = 5,3 bzw. 7,8 wiedergegeben. Bei der schwach sauren Reaktion bewirkt Azid eine ausgesprochene Hemmung der Sauerstoffaufnahme; bei der schwach alkalischen Reaktion dagegen findet sich eine Hemmung nur mehr angedeutet. Unter Berücksichtigung des von Lecithin + Natriumazid allein aufgenommenen Sauerstoffes ist mit 0,025-m. NaN<sub>3</sub> und p<sub>H</sub> = 5,3 die Hemmung vollständig.

Eine gleichartige Abhängigkeit der Azidhemmung von der [H<sup>+</sup>] ergibt sich nach *Keilin* für die Hefatmung und für die Polyphenol-oxydase.

Weiter wurde die im System der Lipoxydase festgestellte Azidhemmung auf ihre Reversibilität geprüft. Hierzu wurden die Ansätze zur Entfernung des Azids dialysiert und ihre Fähigkeit zur Oxydation von Lecithin mit derjenigen entsprechender Ansätze ohne und mit Azid verglichen (Tabelle VII).

**Tabelle VII.**

Reversibilität der Azidhemmung.

A: 5 cm<sup>3</sup> Enzym + 5 cm<sup>3</sup> 0,2-m. Phosphatpuffer (p<sub>H</sub> = 5,3) + 10 cm<sup>3</sup> Wasser. B: wie A, statt Wasser 5 cm<sup>3</sup> 0,1-m. Natriumazid (neutral). Beide Ansätze wurden eine Stunde bei Zimmertemperatur stehen gelassen und dann über Nacht gegen fließendes Leitungswasser dialysiert; Endvolumen: 25 cm<sup>3</sup>. C: wie B, eine Stunde vor Messung des O<sub>2</sub>-Verbrauchs angesetzt (nicht dialysiert); Volumen auf 25 cm<sup>3</sup> ergänzt. Zur Messung des O<sub>2</sub>-Verbrauchs dienen: je 2 cm<sup>3</sup> der obigen Versuchslösungen + 1 cm<sup>3</sup> Lecithin + 1 cm<sup>3</sup> 0,2-m. Phosphat (p<sub>H</sub> = 5,3). Bei der Messung betrug also die Azid-Konzentration in C 0,01-m. Die Tabelle enthält die verbrauchten mm<sup>3</sup> O<sub>2</sub> nach 4 Stunden.

A. ohne Azid; dialysiert	B. mit Azid; dialysiert	C. mit Azid; nicht dialysiert
204	171	35

<sup>1)</sup> *D. Keilin*, Proc. Roy. Soc. (London), [B] **113**, 393 (1933); [B] **121**, 165 (1936).

Der Versuch zeigt, dass die Azidhemmung, wenigstens zum grössten Teil, reversibel ist.

Die Autoxydation von Lecithin wird durch Azid nicht gehemmt; im Gegenteil wurde z. B. mit 1 cm<sup>3</sup> Lecithinemulsion nach 5 Stunden eine Änderung des negativen Drucks entsprechend der Aufnahme von 24 mm<sup>3</sup> O<sub>2</sub>, mit Lecithin + 0,02-m. NaN<sub>3</sub> entsprechend der Aufnahme von 50 mm<sup>3</sup> O<sub>2</sub> beobachtet. Ebensowenig hemmt Cyanid<sup>1)</sup> die Autoxydation von ungesättigten Fettsäuren.

**Tabelle VIII.**

Hemmung der Oxydation von Lecithin durch Natriumsulfid.

Ansätze wie in Tabelle V.

p <sub>H</sub>	Sulfid	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> nach Minuten			Prozent Hemmung nach Minuten		
		30	120	300	30	120	300
5,3	—	82	219	329			
5,3	0,001-m.	50	100	132	39	54	60
7,8	—	132	200	290			
7,8	0,001-m.	42	92	137	68	54	53

Die Wirkung von Natriumsulfid (bzw. Schwefelwasserstoff) wurde ebenfalls unter Verwendung von Lecithin als Substrat bei p<sub>H</sub> = 5,3 und 7,8 untersucht (Tabelle VIII). Unter Berücksichtigung des von 0,001-m. Natriumsulfid allein aufgenommenen Sauerstoffs (nach 5 Stunden bei p<sub>H</sub> = 5,3 11 mm<sup>3</sup>, bei p<sub>H</sub> = 7,8 40 mm<sup>3</sup> O<sub>2</sub>) beträgt die Hemmung der Oxydation von Lecithin in den Versuchen bei p<sub>H</sub> = 5,3 48—63%, bei p<sub>H</sub> = 7,8 89—67%. Die Sulfid-Hemmung ist also, besonders bei Betrachtung der kürzeren Versuchszeiten, mit dem alkalischen Puffer deutlicher als mit dem sauren. Das entspricht früheren, kurz mitgeteilten<sup>2)</sup> Beobachtungen über die Hemmung der Sekundäroxydation von Carotin im System der Lipoxydase (mit Leinöl als Substrat) durch kleine Sulfidkonzentrationen.

In Ansätzen mit Leinölsäure + Sulfid (ohne Enzym) wird mehr Sauerstoff aufgenommen, als der Summe des von beiden Stoffen allein verbrauchten Sauerstoffs entspricht (Tabelle IX). Das weist auf eine Beschleunigung der Oxydation von Leinölsäure durch Sulfid hin, ähnlich der Wirkung von organischen Thiolen bei der Oxydation ungesättigter Fettsäuren<sup>3)</sup>. Sulfid scheint also bei der Autoxydation ungesättigter Fettsäuren eine „prooxygene“ Wirkung auszuüben, während es bei der enzymatischen Oxydation, wie gezeigt, hemmend wirkt.

<sup>1)</sup> M. E. Robinson, Biochem. J. **18**, 255 (1924).

<sup>2)</sup> Verh. Schweiz. Physiol., Juli 1941; Helv. **24**, 1360 (1941).

<sup>3)</sup> O. Meyerhof, Pflüger's Arch. ges. Physiol. **199**, 531 (1923); F. G. Hopkins, Biochem. J. **19**, 787 (1925).

Tabelle IX.

Einfluss von Schwefelwasserstoff auf die Autoxydation von Leinölsäure.

4 cm<sup>3</sup> enthalten: 1 cm<sup>3</sup> 0,05-m. Leinölsäure, 0,40 cm<sup>3</sup> 0,001-m. Na<sub>2</sub>S, 1 cm<sup>3</sup> 0,2-m. Phosphat (p<sub>H</sub> = 6,3).

Minuten	mm <sup>3</sup> Sauerstoff		
	Leinölsäure	Sulfid	Leinöls. + Sulfid
60	3	0	8
180	8	3	34
360	22	5	96

Aus den Versuchen mit Ascorbinsäure ging bereits hervor, dass die enzymatische Oxydation von Linolensäure auch bei Verwendung von Pyrophosphat als Puffer vor sich geht. Vergleichsweise wurde noch die in Gegenwart des Enzyms erfolgende Sauerstoffaufnahme von Leinölsäure einerseits in Phosphat (0,05-m.) und andererseits in Pyrophosphat (0,04-m.) bei p<sub>H</sub> = 6,3 und 7,9 gemessen. In beiden Versuchsreihen war der Sauerstoffverbrauch in Gegenwart von Pyrophosphat zwar etwas geringer; die Hemmung betrug aber maximal nur 13%, wobei noch offen bleiben muss, ob dieser geringe Unterschied auf einem spezifischen Effekt des Pyrophosphats beruht.

Die Frage nach der Wirkungsweise der verschiedenen Inhibitoren bei dieser biologischen Oxydation von Fettsäuren soll in einer späteren Mitteilung erörtert werden.

Zusammenfassung.

Es wird der Einfluss verschiedener Stoffe auf die Oxydation von Linolensäure, Leinölsäure und Lecithin durch die Lipoxydase aus Leguminosensamen untersucht.

1. Diese Oxydation wird von Stoffen gehemmt, die auf Grund ihrer Wirkung bei anderen Oxydationsreaktionen zu den Antioxydantien gezählt werden. Von starker bis mittlerer Wirksamkeit sind: Brenzcatechin, Hydrochinon, p-Aminophenol,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Naphtol, Dioxy-phenylalanin, Adrenalin und Tocopherol. Eine schwächere Hemmung bewirken: Phloroglucin, Resorcin und Ascorbinsäure.

Während die meisten dieser Verbindungen auch die Autoxydation ungesättigter Fettsäuren hemmen, wirken Phloroglucin und Ascorbinsäure auf die Autoxydation von Linolensäure beschleunigend.

2. Die enzymatische Oxydation wird ebenfalls von Natriumcyanid, Natriumazid und Natriumsulfid, die im allgemeinen als Schwermetallgifte betrachtet werden, gehemmt. Natriumpyrophosphat zeigt keine deutliche hemmende Wirkung.

Bei der Autoxydation ungesättigter Fettsäuren wirken diese Stoffe nicht als Inhibitoren.

Basel, Laboratorium der Universitäts-Augenklinik.