

## 51. Über Ionenkonzentrationsgradienten und ihre biochemische Bedeutung<sup>1)</sup>.

V. Mitteilung.

### Zur Steuerung biologischer Oxydoreduktionsprozesse durch Wasserstoffionen

von F. Almasy.

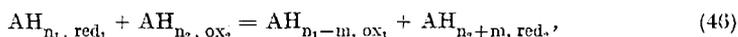
(14. II. 45.)

§ 1. Das oxydoreduktive Gleichgewicht zweier m-stufiger Redoxsysteme, deren Bestandteile:  $ox_1$ ,  $red_1$  und  $ox_2$ ,  $red_2$  unvollständig dissoziierte Säuren sein mögen, die teils in freier und teils in Salzform gelöst vorliegen, genügt bei konstanter Temperatur und konstantem Aussendruck der Bedingung:

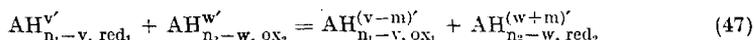
$$\frac{[AH_{n_1-m}]_{ox_1} [AH_{n_2+m}]_{red_2}}{[AH_{n_1}]_{red_1} [AH_{n_2}]_{ox_2}} = \text{konst.} \quad m = 1, 2, \dots \quad (45)$$

An einer Fermentmolekel, welche die Einstellung dieses Gleichgewichtes wirksam katalysiert, erscheint unter der auch in vorliegender Arbeit benutzten Voraussetzung idealer Lösungen Gleichung (45) bis auf geringe Abweichungen erfüllt, die durch das Nachdiffundieren der Reaktionspartner des Fermentprozesses bedingt sind. Falls letzterer z. B. im Sinne:  $red_1 + ox_2 \rightarrow ox_1 + red_2$  erfolgt, diffundieren die linksstehenden Partner zur Fermentmolekel, und die rechtsstehenden von ihr hinweg. Die Diffusionsgeschwindigkeit kann dabei als klein im Vergleich zur Umsetzungsgeschwindigkeit am Ferment angenommen werden. In so kleinen Volumgebieten, wie der katalytisch wirkenden Grenzschicht einer Fermentmolekel, treten sehr bedeutende statistische Konzentrationschwankungen um die Gleichgewichtslage auf (vgl. z. B. <sup>2)</sup>). Wir sehen von diesen ab, da sie sich im Mittel über längere Zeiträume herausheben und in der folgenden Überlegung nicht berücksichtigt werden müssen.

Man kann eine Oxydoreduktion im Sinne der *Wieland'schen* Dehydrierungstheorie als Austausch von H-Atomen auffassen:



oder im Sinne der *Clark'schen* Theorie als Elektronenaustausch betrachten:



Nach beiden Anschauungen erfolgt der Austausch von m H-Atomen bzw. Elektronen ohne Konsum oder Produktion von Wasserstoffionen. Dagegen nehmen am Umsatz sämtlicher Dissoziationsstufen von  $red_1$ ,  $ox_2$ ,  $ox_1$  und  $red_2$ , wie er aus der Verknüpfung der Oxydoreduktion mit der elektrolytischen Gleichgewichtseinstellung resultiert, im allgemeinen auch Wasserstoffionen teil. Um den  $p_H$ -Einfluss, der hieraus hervorgeht, angemessen behandeln zu können, benutzen wir das in der IV. Mitt.<sup>3)</sup> dargelegte Verfahren, namentlich die unter der Voraussetzung:  $T = \text{konst.}$ ,  $p = \text{konst.}$  für infinitesimale Verschiebungen des elektrolytischen Gleichgewichtes erhaltene Beziehung:

$$RT \, d \ln [\text{Säure total}]_{AH_n} + \sum_{i=0}^{i=n} i \alpha_{i, AH_n} RT \, d \ln [H^+] - RT \, d \ln [AH_n] = 0 \quad (37)$$

<sup>1)</sup> Arbeit mit Unterstützung der *Jubiläumsspende für die Universität Zürich*.

<sup>2)</sup> *Donnan, F. G., J. gen. Physiol.* **8**, 685 (1927).

<sup>3)</sup> *Helv.* **25**, 1590 (1944), IV. Mitt.

Die damit verbundene Gleichung (38) wird berücksichtigt im Sinne der Ausführungen des § 4 der IV. Mitt.

§ 2. Für eine unendlich kleine isotherm-isobare Verschiebung des oxydoreduktiven Gleichgewichtes gilt nach der vorstehenden Gleichung (45):

$$d \ln [\text{AH}_{n_1-m}]_{\text{ox}_1} + d \ln [\text{AH}_{n_2+m}]_{\text{red}_1} - d \ln [\text{AH}_{n_1}]_{\text{red}_1} - d \ln [\text{AH}_{n_2}]_{\text{ox}_2} = 0 \quad (48)$$

Setzt man gemäss Gleichung (37) für  $d \ln [\text{AH}_{n_1-m}]_{\text{ox}_1}$

$$d \ln [\text{Säure total}]_{\text{ox}_1} + \sum_{i=0}^{i=n_1-m} i \alpha_{i, \text{ox}_1} d \ln [\text{H}^{\cdot}]$$

ein und verfährt mit den übrigen Termen der Gleichung (48) in analoger Weise, dann ergibt sich bei Einführung der abgekürzten Bezeichnungen:

$$\sum_{i=0}^{i=n_1-m} i \alpha_{i, \text{ox}_1} + \sum_{i=0}^{i=n_2+m} i \alpha_{i, \text{red}_2} - \sum_{i=0}^{i=n_1} i \alpha_{i, \text{red}_1} - \sum_{i=0}^{i=n_2} i \alpha_{i, \text{ox}_2} = \vec{A}^{\text{F}} - \vec{A}^{\text{F}} = B_{\text{H}} \quad (49)$$

die Relation:

$$d \ln [\text{Säure total}]_{\text{ox}_1} + d \ln [\text{Säure total}]_{\text{red}_2} - d \ln [\text{Säure total}]_{\text{red}_1} - d \ln [\text{Säure total}]_{\text{ox}_2} + B_{\text{H}} d \ln [\text{H}^{\cdot}] = 0, \quad (50)$$

welche für konstantes T und p das Verhalten des im Gleichgewicht befindlichen Systems:

$$(\text{Säure total})_{\text{red}_1} + (\text{Säure total})_{\text{ox}_2} = (\text{Säure total})_{\text{ox}_1} + (\text{Säure total})_{\text{red}_2} + B_{\text{H}} \text{H}^{\cdot}$$

gegenüber infinitesimalen Konzentrationsänderungen in dem Masse erfasst, als die Bedingung:  $d B_{\text{H}}/d \ln [\text{H}^{\cdot}] = 0$  erfüllt ist. Dementsprechend beruhen die folgenden Überlegungen auf der Voraussetzung einer hinreichend kleinen  $p_{\text{H}}$ -Abhängigkeit von  $B_{\text{H}}$  (vgl. IV. Mitt., § 4).

In der Definitionsgleichung (49) drückt  $\vec{A}^{\text{F}}$  die mit einem Mol (Säure total)<sub>red<sub>1</sub></sub> sowie einem Mol (Säure total)<sub>ox<sub>2</sub></sub> zur Fermentmolekel hindiffundierende, und  $\vec{A}^{\text{F}}$  die mit einem Mol (Säure total)<sub>ox<sub>1</sub></sub> sowie einem Mol (Säure total)<sub>red<sub>1</sub></sub> von der Fermentmolekel wegdiffundierende Säureanionenladung in Faraday-Einheiten aus [vgl. II. Mitt. <sup>1)</sup>, S. 1489 bis 1492]. Zur Erhaltung der Elektroneutralität wird (in der Grenzschichte der Fermentmolekel) pro Mol Umsatz eines jeden der vier Partner eine dem Überschuss der letztern über die erstere Ladungsmenge äquivalente H<sup>·</sup>-Ionenmenge:  $B_{\text{H}} = \vec{A}^{\text{F}} - \vec{A}^{\text{F}}$  freigesetzt oder gebunden, je nachdem ob  $B_{\text{H}}$  positiv oder negativ ist.  $B_{\text{H}}$  ist dimensionslos, da es die Bedeutung Mol H<sup>·</sup>-Ionen pro Mol Umsatz hat. Die Forderung einer kleinen  $p_{\text{H}}$ -Abhängigkeit von  $B_{\text{H}}$  erscheint in  $p_{\text{H}}$ -Bereichen erfüllt, in denen die Kurve  $B_{\text{H}}(p_{\text{H}})$  nahezu horizontal verläuft.

Wir schreiben Gleichung (50) in der Form:

$$\frac{d [\text{Säure total}]_{\text{ox}_1}}{[\text{Säure total}]_{\text{ox}_1}} + \frac{d [\text{Säure total}]_{\text{red}_2}}{[\text{Säure total}]_{\text{red}_2}} - \frac{d [\text{Säure total}]_{\text{red}_1}}{[\text{Säure total}]_{\text{red}_1}} - \frac{d [\text{Säure total}]_{\text{ox}_2}}{[\text{Säure total}]_{\text{ox}_2}} = -B_{\text{H}} d \ln [\text{H}^{\cdot}] \quad (50a)$$

<sup>1)</sup> Helv. 24, 1480 (1941), II. Mitt.

Falls in der katalytisch wirkenden Grenzschichte der Fermentmolekel durch eine differentielle  $p_H$ -Änderung eine unendlich kleine Umsetzung im Sinne:  $red_1 + ox_2 \rightarrow ox_1 + red_2$  hervorgebracht wird, gilt aus stöchiometrischen Gründen unter Nichtbeachtung des Nachdiffundierens der Reaktionspartner:

$$\begin{aligned} d[Säure\ total]_{ox_1} &= d[Säure\ total]_{red_1} = -d[Säure\ total]_{red_1} = \\ &= -d[Säure\ total]_{ox_2} = (d[Säure\ total])_{red_1, ox_2 \rightarrow ox_1, red_2}, \end{aligned} \quad (51)$$

wobei das rechtsstehende Differential die Umsetzung einheitlich kennzeichnet. Beim Einführen dieser Grösse in Gleichung (50a) erhält man:

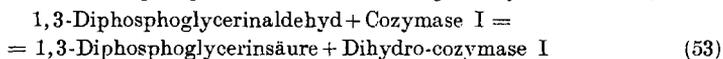
$$\begin{aligned} (d[Säure\ total])_{red_1, ox_2 \rightarrow ox_1, red_2} &\left( \frac{1}{[Säure\ total]_{ox_1}} + \frac{1}{[Säure\ total]_{red_2}} + \right. \\ &\left. + \frac{1}{[Säure\ total]_{red_1}} + \frac{1}{[Säure\ total]_{ox_2}} \right) = -B_H d \ln [H^+], \end{aligned}$$

oder durch Umformung und Übergang zu:  $p_H = -\ln [H^+]/2,30$ :

$$\begin{aligned} &\frac{(d[Säure\ total])_{red_1, ox_2 \rightarrow ox_1, red_2}}{d p_H} = \\ &= \frac{2,30 B_H}{\frac{1}{[Säure\ total]_{ox_1}} + \frac{1}{[Säure\ total]_{red_2}} + \frac{1}{[Säure\ total]_{red_1}} + \frac{1}{[Säure\ total]_{ox_2}}} \end{aligned} \quad (52)$$

Der Differentialquotient  $(d[Säure\ total])_{red_1, ox_2 \rightarrow ox_1, red_2}/d p_H$  gibt an, in welchem Sinne und wie stark das Oxydoreduktionssystem auf  $p_H$ -Änderungen anspricht. Bei positivem  $B_H$  ist  $(d[Säure\ total])_{red_1, ox_2 \rightarrow ox_1, red_2}/d p_H$  positiv, d. h., das System spricht gemäss der Definitionsgleichung (51) auf  $p_H$ -Erhöhungen im Sinne:  $red_1 + ox_2 \rightarrow ox_1 + red_2$  an, und auf  $p_H$ -Senkungen im Sinne:  $ox_1 + red_2 \rightarrow red_1 + ox_2$ . Bei negativem  $B_H$  ist  $(d[Säure\ total])_{red_1, ox_2 \rightarrow ox_1, red_2}/d p_H$  negativ, und das System reagiert auf  $p_H$ -Änderungen in umgekehrter Art. Gleichung (52) lässt ohne weiteres erkennen, dass kein merkliches Ansprechen auf  $p_H$ -Änderungen erwartet werden kann, sofern  $|B_H|$  oder auch nur eine der vier im Nenner stehenden Konzentrationsgrössen sehr klein ist. Wir gehen nun auf diese Variablen der Gleichung (52) näher ein (§§ 3, 4).

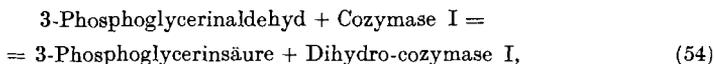
§ 3. Was  $B_H$  betrifft, so lässt es sich mittels Gleichung (40) der IV. Mitt. berechnen, falls die elektrolytischen Dissoziationskonstanten der vier Reaktionspartner bekannt sind. Noch einfacher wird  $B_H$  aus den Titrationskurven der Partner erhalten (s. <sup>1)</sup>). Unter Umständen ist der eine oder der andere Partner instabil, so dass die Bestimmung der Dissoziationskonstanten nicht gelingt. Im Falle der wichtigen Oxydoreduktion<sup>2)</sup>:



<sup>1)</sup> Helv. **24**, 1480 (1941), II. Mitt.

<sup>2)</sup> Warburg, O., und Christian, W., Bioch. Z. **303**, 40 (1939); Nägelein, E., und Brömel, H., Bioch. Z. **301**, 135 (1939); **303**, 132 (1939).

konnte z. B. der 1,3-Diphosphoglycerinaldehyd noch nicht isoliert werden und muss vor-  
derhand als hypothetisch gelten (nur seine Doppelverbindung wurde synthetisiert<sup>1)</sup>), wäh-  
rend Cozymase I in alkalischer und Dihydro-cozymase I in saurer Lösung unbeständig  
ist<sup>2)</sup>. Sieht man von der Phosphorylierung in der 1-Stellung ab und schreibt gemäss der  
früheren Auffassung:



dann gelingt es,  $B_H$  beim physiologischen  $p_H$  7 mit einiger Sicherheit zu ermitteln. *Kiess-  
ling*<sup>3)</sup> bestimmte (wahrscheinlich bei 20° C) die Dissoziationskonstanten des 3-Phospho-  
glycerinaldehyds:  $K_1 = 7,94 \times 10^{-3}$ ,  $K_2 = 1,78 \times 10^{-7}$ , sowie der 3-Phosphoglycerinsäure:  
 $K_1 = 3,80 \times 10^{-2}$ ,  $K_2 = 3,80 \times 10^{-4}$ ,  $K_3 = 1,05 \times 10^{-6}$ . Nach Gleichung (40) der IV. Mitt.  
berechnen wir daraus:

$$\begin{aligned} & \sum_{i=0}^{i=2} i \alpha_{i, 3\text{-Phosphoglycerinaldehyd}, p_H 7} = \\ & = \frac{7,94 \times 10^{-3} \times 10^{-7} + 2 \times 7,94 \times 10^{-3} \times 1,78 \times 10^{-7}}{10^{-14} + 7,94 \times 10^{-3} \times 10^{-7} + 7,94 \times 10^{-3} \times 1,78 \times 10^{-7}} = 1,64, \end{aligned}$$

und ebenso:

$$\sum_{i=0}^{i=3} i \alpha_{i, 3\text{-Phosphoglycerinsäure}, p_H 7} = 2,92$$

Die Untersuchung der Leitfähigkeit und der dielektrischen Eigenschaften der Cozy-  
mase I durch *Hausser* und *Kinder*<sup>4)</sup> ergab übereinstimmend mit der von *Meyerhof* und  
*Möhle*<sup>5)</sup> erhaltenen Titrationskurve, dass bei  $p_H$  7 die Dissoziation der  $NH_3^+$ -Gruppe des  
Adenins nahezu völlig zurückgedrängt, und die Dissoziation des Pyridiniumstickstoffs  
sowie der beiden Phosphorsäurereste praktisch vollständig ist (einwertiges Zwitteranion).  
Pro Mol Cozymase weist bei diesem  $p_H$  danach die Aminogruppe des Adenins die Ladung  
Null, der Pyridiniumstickstoff die positive Ladung 1 *Faraday* und jeder der zwei Phos-  
phorsäurereste die negative Ladung 1 *Faraday* auf. In einfacher Verallgemeinerung der  
bisher nur für Anionen benutzten Formulierungsweise auf den Fall von Zwitterionen  
schreiben wir:

$$\sum_{i=-2}^{i=2} i \alpha_{i, \text{Cozymase I}, p_H 7} = -1 + 2 = 1.$$

Die Dihydro-cozymase I wurde im fraglichen Zusammenhang nicht untersucht.  
Nach *Karrer*, *Schwarzenbach*, *Benz* und *Solmsen*<sup>6)</sup> sowie *Warburg* und *Christian*<sup>7)</sup>  
fehlt hier jedenfalls die positive Ladung des Pyridiniumstickstoffs der Cozymase. Mithin  
liegt die Dihydro-cozymase unter der wahrscheinlichen Voraussetzung, dass (wie im Fall  
der Cozymase) die Dissoziation der Adenin-Aminogruppe verschwindend gering und die  
Dissoziation der beiden Phosphorsäurereste praktisch vollständig ist, bei  $p_H$  7 als zwei-  
wertiges Anion vor. Wir schreiben in diesem Sinne:

$$\sum_{i=-1}^{i=2} i \alpha_{i, \text{Dihydro-cozymase I}, p_H 7} = 2.$$

<sup>1)</sup> *Baer, E., und Fischer, H. O. L., J. Biol. Chem. 143, 563 (1942).*

<sup>2)</sup> *Warburg, O., und Christian, W., Bioch. Z. 287, 291 (1936).*

<sup>3)</sup> *Kiessling, W., Bioch. Z. 273, 103 (1934).*

<sup>4)</sup> *Hausser, I., und Kinder, E., Z. physikal. Ch. [B.] 41, 142 (1938).*

<sup>5)</sup> *Meyerhof, O., und Möhle, W., Bioch. Z. 294, 249 (1937).*

<sup>6)</sup> *Karrer, P., Schwarzenbach, G., Benz, F., und Solmsen, U., Helv. 19, 811 (1936).*

<sup>7)</sup> *Warburg, O., und Christian, W., Bioch. Z. 287, 291 (1936).*

Nach Gleichung (49) zusammenfassend, findet man für  $p_H$  7:

$$\begin{aligned} \tilde{A}^F &= \sum_{i=0}^{i=3} i \alpha_{i, 3\text{-Phosphoglycerinsäure}} + \sum_{i=-1}^{i=2} i \alpha_{i, \text{Dihydro-cozymase I}} = 2,92 + 2 = 4,92 \\ \tilde{A}^F &= \sum_{i=0}^{i=2} i \alpha_{i, 3\text{-Phosphoglycerinaldehyd}} + \sum_{i=-2}^{i=2} i \alpha_{i, \text{Cozymase I}} = 1,64 + 1 = 2,64 \\ B_H &= \tilde{A}^F - \tilde{A}^F = 4,92 - 2,64 = 2,28. \end{aligned}$$

Der Umsatz von je einem Mol 3-Phosphoglycerinaldehyd und Cozymase I zu 3-Phosphoglycerinsäure und Dihydro-cozymase I ist demnach bei  $p_H$  7 mit der Freisetzung von 2,28 Mol H<sup>+</sup>-Ionen verknüpft. Auf analoge Art findet man bei  $p_H$  7,5 bzw. 8 die (approximativen)  $B_H$ -Werte 2,11 bzw. 2,05, woraus folgt, dass  $B_H$  in diesem Bereich mit zunehmendem  $p_H$  abnimmt.  $d B_H/d p_H$  beträgt bei  $p_H$  7,25 etwa  $-0,34$  und bei  $p_H$  7,75 etwa  $-0,12$ . Eine genügend weitgehende Annäherung an den im § 2 vorausgesetzten Grenzfall:  $d B_H/d p_H = 0$  dürfte beim vorliegenden Oxydoreduktionssystem somit erst im Bereich um  $p_H$  8 herum zu erwarten sein.

§ 4. Einige der wichtigsten Metaboliten weisen in lebenden Zellen eine Konzentration von ungefähr  $10^{-3}$  Mol pro Liter auf<sup>1)</sup>. Die Konzentrationsvariablen der Gleichung (52) sind z. T. voraussichtlich von höherer Grössenordnung, da sie sich nicht auf die gesamte Zelle, sondern auf die katalytisch wirksame Grenzschicht einer Fermentmolekel beziehen, und das Adsorptionsgleichgewicht dieser Schicht (des Adsorptionsfilmes) mit dem umgebenden Zytoplasma massgebend erscheint. Einbezogen werden muss hierin der Fall chemischer Bindung ans Fermentprotein. [Vgl. zu diesem Paragraphen<sup>2)</sup>.]

Zur Berechnung der räumlichen Konzentration  $c_i$  in einem Film des Stoffes  $i$  benutzen wir nach *Langmuir*<sup>3)</sup> den Quotienten  $\Gamma_i/\tau$ , worin die Oberflächendichte  $\Gamma_i$  die Zahl der auf 1 Å<sup>2</sup> Filmfläche entfallenden Molekeln des Stoffes  $i$  angibt, und  $\tau$  die ungefähre Filmdicke in Å bedeutet. Die Erörterung zweier Extremfälle, welche wohldefinierte wässrige Oberflächen betreffen, soll den hinsichtlich Gleichung (52) interessierenden Grössenbereich von  $c_i$  kennzeichnen.

a) Im Fall kondensierter Filme z. B. von Stearinsäure auf Wasser wurde der Höchstwert von  $\Gamma_i$  durch Oberflächendruckmessungen zu etwa  $1/20$  Molekel pro Å<sup>2</sup> bestimmt, entsprechend einem gegenseitigen Abstand der steil zur Oberfläche orientierten Stearinsäuremolekeln, welcher der Packung im Krystallgitter nahe kommt. Nimmt man die Filmdicke übereinstimmend mit der Molekellänge zu etwa 30 Å an, dann folgt:  $c_i = \Gamma_i/\tau \sim 1/20 \times 30$  Molekeln pro Å<sup>3</sup> =  $10^{27}/20 \times 30 \times 6,02 \times 10^{23} = 2,8$  Mol pro Liter. Bimolekulare Schichtung würde diesen Wert nicht ändern. Bei 10 Å langen Molekeln und gleich dichter Packung wäre  $c_i$  gleich 8,4 Mol pro Liter.

b) In der Oberfläche einer  $10^{-3}$ -molaren wässrigen Lösung von Propionsäure liegt im Gegensatz zum vorübergehenden Beispiel ein sehr verdünnter Adsorptionsfilm vor, indem die Oberflächenspannung  $\gamma_i$  dieser Lösung nur um etwa 0,1 dyn pro cm kleiner ist als die Oberflächenspannung  $\gamma_0$  des Wassers<sup>4)</sup>. Man bezeichnet solche Filme als Gasfilme, da sie der zweidimensionalen Zustandsgleichung:  $F_i/\Gamma_i = 10^{16} \times kT$  angenähert genügen ( $F_i = \gamma_0 - \gamma_i$  = Oberflächendruck,  $k$  = Boltzmann-Konstante =  $1,38 \times 10^{-16}$  erg pro °C). Bei Zimmertemperatur gilt:  $(\gamma_0 - \gamma_i)/\Gamma_i \sim 400$ , und durch Einsetzen von:  $\gamma_0 - \gamma_i = 0,1$  erhält man:  $\Gamma_i \sim 0,1/400 = 1/4000$  Molekel pro Å<sup>2</sup>. Da in Gasfilmen die Molekeln flach in der Oberfläche liegen, nehmen wir die Filmdicke zu etwa 6 Å an. Es resultiert dann:  $c_i = \Gamma_i/\tau \sim 1/4000 \times 6$  Molekeln pro Å<sup>3</sup> = 0,07 Mol pro Liter.

<sup>1)</sup> *Rashevsky, N.*, Mathematical Biophysics, Chicago 1938.

<sup>2)</sup> *Adam, M. K.*, The Physics and Chemistry of Surfaces, Oxford 1938.

<sup>3)</sup> *Langmuir, I.*, Am. Soc. **39**, 1883 (1917).

<sup>4)</sup> *Traube, I.*, A. **265**, 27 (1891).

In Anbetracht der hieraus sich ergebenden ungefähren Grenzen 0,1 und 10 Mol pro Liter, wählen wir in Gleichung (52) als wahrscheinliche Werte:  $[\text{Säure total}]_{\text{ox}_1} \sim [\text{Säure total}]_{\text{red}_2} \sim 1$  Mol pro Liter. Um in der katalytisch wirkenden Oberflächenschichte einer Fermentmolekel Konzentrationen dieser Grössenordnung (abgesehen von den sehr bedeutenden statistischen Schwankungen) zu erreichen, dürften je nach der Oberflächenentwicklung 10 bis 1000 Molekeln genügen.

Das Grössenverhältnis von  $[\text{Säure total}]_{\text{ox}_1}$ ,  $[\text{Säure total}]_{\text{red}_2}$  zu  $[\text{Säure total}]_{\text{red}_1}$ ,  $[\text{Säure total}]_{\text{ox}_2}$  steht in Zusammenhang mit der Differenz:  $E'_{0,1} - E'_{0,2}$  der Normalpotentiale der Redoxsysteme  $\text{ox}_1/\text{red}_1$  und  $\text{ox}_2/\text{red}_2$ . Bei gegebenem  $p_{\text{H}}$  werden die Redoxpotentiale  $E_1$  und  $E_2$  der beiden m-stufigen Systeme festgelegt durch (vgl. z. B.<sup>1)</sup>):

$$E_1 = E'_{0,1} + \frac{2,30 RT}{mF} \log \frac{[\text{Säure total}]_{\text{ox}_1}}{[\text{Säure total}]_{\text{red}_1}} \quad E_2 = E'_{0,2} + \frac{2,30 RT}{mF} \log \frac{[\text{Säure total}]_{\text{ox}_2}}{[\text{Säure total}]_{\text{red}_2}}$$

Da  $E_1$  und  $E_2$  bei oxydoreduktivem Gleichgewicht der zwei Systeme denselben Wert haben, gilt für die katalytisch wirkende Grenzschichte des Ferments praktisch:  $E_1 - E_2 = 0$ , oder:

$$\begin{aligned} & \log [\text{Säure total}]_{\text{red}_1} [\text{Säure total}]_{\text{ox}_2} = \\ & = \log [\text{Säure total}]_{\text{ox}_1} [\text{Säure total}]_{\text{red}_2} + \frac{mF(E'_{0,1} - E'_{0,2})}{2,30 RT} \end{aligned} \quad (55)$$

An Hand dieser Beziehung betrachten wir das 2-stufige Oxydoreduktionssystem Gleichung (54), § 3. Das Normalpotential,  $E'_{0,1}(p_{\text{H}} 7)$ , des Redoxsystems Glycerinsäure/Glycerinaldehyd beträgt angenähert  $-0,460$  Volt<sup>2)</sup>, das Normalpotential des in 3-Stellung phosphorylierten Systems dürfte sich davon nur unwesentlich unterscheiden<sup>3)</sup>. Das Normalpotential,  $E'_{0,2}(p_{\text{H}} 7)$ , des Redoxsystems Cozymase I/Dihydro-cozymase I beträgt  $-0,280$  Volt<sup>4)</sup>. Die Differenz:  $E'_{0,1} - E'_{0,2}$  beläuft sich somit auf etwa  $-0,180$  Volt. Für diese Differenz der Normalpotentiale,  $T = 298^\circ$ ,  $m = 2$  und die oben angenommenen Werte:  $\log [\text{Säure total}]_{\text{ox}_1} \sim \log [\text{Säure total}]_{\text{red}_2} \sim 0$  finden wir nach Gleichung (55):

$$\log [\text{Säure total}]_{\text{red}_1} [\text{Säure total}]_{\text{ox}_2} = \frac{2 \times 23060 \times -0,180}{2,30 \times 1,986 \times 298} = -6,1$$

Der kleinere der beiden Konzentrationswerte  $[\text{Säure total}]_{\text{red}_1}$  und  $[\text{Säure total}]_{\text{ox}_2}$  beträgt danach höchstens (und zwar unter der Bedingung:  $[\text{Säure total}]_{\text{red}_1} = [\text{Säure total}]_{\text{ox}_2}$ )  $10^{-3,05}$  oder rund 0,001 Mol pro Liter.

§ 5. Unter Hinweis auf die §§ 3 und 4 setzen wir in Gleichung (52) ein:  $B_{\text{H}}(p_{\text{H}} 7) = 2,28$ ,  $[\text{Säure total}]_{\text{ox}_1} \sim [\text{Säure total}]_{\text{red}_2} \sim 1$  Mol pro Liter,  $[\text{Säure total}]_{\text{red}_1} \sim [\text{Säure total}]_{\text{ox}_2} \sim 0,001$  Mol pro Liter und erhalten:

$$\begin{aligned} & \frac{d[\text{Säure total}]_{\text{red}_1, \text{ox}_2 \rightarrow \text{ox}_1, \text{red}_2}}{d p_{\text{H}}} \sim \frac{2,30 \times 2,28}{1/1 + 1/1 + 1/0,001 + 1/0,001} = \\ & = 0,0026 \text{ Mol Umsatz pro Liter pro } p_{\text{H}}\text{-Zunahme um eine Einheit.} \end{aligned}$$

Das Oxydoreduktionssystem Gleichung (54) spricht demnach auf  $p_{\text{H}}$ -Änderungen nur sehr schwach an, was offenbar bedingt ist durch

<sup>1)</sup> Michaelis, L., Oxydations-Reduktionspotentiale, Berlin 1933.

<sup>2)</sup> Parks, G. S., and Huffman, H. M., The Free Energies of Some Organic Compounds, New York, 1932.

<sup>3)</sup> Kalckar, H. M., Chem. Reviews **23**, 71 (1941).

<sup>4)</sup> Borsook, H., J. Biol. Chem. **133**, 629 (1940).

den beträchtlichen Unterschied von 0,18 Volt der Normalpotentiale der zwei Redoxsysteme, aus denen es besteht.

Das Normalpotential des Redoxsystems 1,3-Diphosphoglycerinsäure/1,3-Diphosphoglycerinaldehyd stimmt bei  $p_H$  7 auf weniger als 0,03 Volt mit dem Normalpotential des Redoxsystems Cozymase I/Dihydro-cozymase I überein<sup>1</sup>). Unter analogen Bedingungen wie vorhin folgt hieraus für das Oxydoreduktionssystem Gleichung (53) als Mindestwert:  $\log [\text{Säure total}]_{\text{red}_1} [\text{Säure total}]_{\text{ox}_2} = -1,02$ . Bei Gleichheit von  $[\text{Säure total}]_{\text{red}_1}$  und  $[\text{Säure total}]_{\text{ox}_2}$  beträgt jede der zwei Konzentrationen somit mindestens:  $10^{-0,51} \sim 0,3$  Mol pro Liter. In Unkenntnis des wahren  $B_H$ -Wertes (s. § 3) setzen wir in Gleichung (52) wie oben ein:  $B_H(p_H 7) = 2,28$ , was immerhin einen grössenordnungsmässigen Fehler in sich schliessen könnte. Ferner setzen wir in die Gleichung ein:  $[\text{Säure total}]_{\text{ox}_1} \sim [\text{Säure total}]_{\text{red}_2} \sim 1$  Mol pro Liter,  $[\text{Säure total}]_{\text{red}_1} \sim [\text{Säure total}]_{\text{ox}_2} \sim 0,3$  Mol pro Liter und erhalten als Mindestwert:  $(d[\text{Säure total}]_{\text{red}_1, \text{ox}_2} / d p_H)_{\text{ox}_1, \text{red}_2} \sim 0,61$  Mol pro Liter pro  $p_H$ -Zunahme um eine Einheit.

Das aus zwei Redoxsystemen mit kleinem Unterschied der Normalpotentiale bestehende Oxydoreduktionssystem Gleichung (53) spricht danach auf  $p_H$ -Änderungen kräftig an.

Im Hinblick auf die lebende Zelle geben die beiden Anwendungsbeispiele der Gleichung (52) folgendes zu erkennen.  $p_H$ -Änderungen, welche am Ort der einzelnen fermentativen Oxydoreduktion in der Zelle auftreten, beeinflussen den Prozessablauf nur dann merklich (im Sinne einer Beschleunigung, Verlangsamung oder Umkehr), wenn es sich um die Umsetzung zweier Redoxsysteme mit nicht zu grosser Differenz der Normalpotentiale und nicht zu kleinem  $|B_H|$  handelt. Die Grenzen hängen von beiden Faktoren ab; bei:  $|B_H| \sim 1$  wäre etwa zu fordern, dass  $|E'_{o,1} - E'_{o,2}|$  weniger als ein Zehntel Volt beträgt. Wie in der 3. Mitt. <sup>2</sup>), S. 1281—82, erwähnt wurde, nahmen *Barron*<sup>3</sup>) sowie *Jung*<sup>4</sup>) bereits vor einigen Jahren an, dass manches wichtige biologische Oxydoreduktionssystem aus zwei Redoxsystemen mit geringem Unterschied der Normalpotentiale bestehe.

Die mannigfaltigen an den spezifischen Fermenten der lebenden Zelle vor sich gehenden Oxydoreduktionen sind Quellen bzw. Senken des intrazellulären  $[H^+]$ -Gradientenfeldes. Falls diese Prozesse auf  $p_H$ -Änderungen hinreichend ansprechen, stehen sie über den gemeinsamen Reaktionspartner  $H^+$  in einer Wechselwirkung, die durchs  $[H^+]$ -Gradientenfeld vermittelt wird. Andererseits fehlen die Voraussetzungen zu dieser — physiologisch betrachtet — sehr bedeutsamen Koordination der Einzelprozesse in dem Masse, als die Zelle

<sup>1</sup>) *Kalckar, H. M.*, Chem. Reviews **28**, 71 (1941).

<sup>2</sup>) *Helv.* **25**, 1255 (1942), III. Mitt.

<sup>3</sup>) *Barron, E. S. G.*, *Physiol. Reviews* **19**, 224 (1939).

<sup>4</sup>) *Jung, A.*, *Z. Vitaminf.* **1**, 1 (1940).

Fermentproteine enthält, an denen Oxydoreduktionssysteme mit erheblichem Unterschied der Normalpotentiale oder mit sehr kleinem  $|B_H|$  umgesetzt werden.

§ 6. Wir gehen nun auf das H<sup>+</sup>-Pufferungsvermögen fermentativer Oxydoreduktionssysteme ein, was mittels Gleichung (52) und der in der IV. Mitt. gebrachten Darstellung des elektrolytischen Gleichgewichtes einfach durchzuführen ist.

Im Fall eines gewöhnlichen Puffers [einer schwachen Säure (Base), die teils in freier Form und teils als Salz gelöst ist] legen die Gesamtkonzentration [Säure total]<sub>AH<sub>n</sub></sub> und

die Anionenladung  $\sum_{i=0}^{i=n} i \alpha_{i, AH_n}$  die Konzentration der dissoziablen H-Atome fest:

$$[H \text{ dissoziabel}] = [\text{Säure total}]_{AH_n} \left( n - \sum_{i=0}^{i=n} i \alpha_{i, AH_n} \right) \text{ Grammatom pro Liter,} \quad (56)$$

welche gleich einer gewöhnlichen Konzentrationsgrösse in Rechnung gestellt werden kann. Die H<sup>+</sup>-Pufferungskapazität ergibt sich durch Differentiation nach p<sub>H</sub>:

$$\begin{aligned} \text{H}^+\text{-Pufferungskapazität} &= -d[H \text{ dissoziabel}]/d p_H = \\ &= [\text{Säure total}]_{AH_n} d \sum_{i=0}^{i=n} i \alpha_{i, AH_n} / d p_H \end{aligned} \quad (57)$$

Für 1-, 2- und 3-wertige Säuren folgt aus dieser Gleichung sowie Gleichung (40), (40a) und (40b) der IV. Mitteilung:

$$\text{H}^+\text{-Pufferungskapazität} = [\text{Säure total}]_{AH} \frac{2,30 K [H^+]}{([H^+] + K)^2} \quad (57a)$$

$$\text{H}^+\text{-Pufferungskapazität} = [\text{Säure total}]_{AH_2} \frac{2,30(K_1[H^+]^3 + 4K_1K_2[H^+]^2 + K_1^2K_2[H^+])}{([H^+]^2 + K_1[H^+] + K_1K_2)^2} \quad (57b)$$

$$\text{H}^+\text{-Pufferungskapazität} = [\text{Säure total}]_{AH_3} \times L \quad (57c)$$

$$L = \frac{2,30 \{ K_1[H^+]^5 + 4K_1K_2[H^+]^4 + (K_1^2K_2 + 9K_1K_2K_3)[H^+]^3 + 4K_1^2K_2K_3[H^+]^2 + K_1^3K_2^2K_3[H^+] \}}{([H^+]^3 + K_1[H^+]^2 + K_1K_2[H^+] + K_1K_2K_3)^2}$$

Die vorstehend erörterte infinitesimale Umsetzung eines oxydoreduktiven Gleichgewichtssystems von (d[Säure total])<sub>red<sub>1</sub>, ox<sub>1</sub> → ox<sub>1</sub>, red<sub>2</sub></sub> Mol pro Liter ist nach den Definitionsgleichungen (49) und (51) mit einer Freisetzung bzw. Bindung von B<sub>H</sub> (d[Säure total])<sub>red<sub>1</sub>, ox<sub>1</sub> → ox<sub>1</sub>, red<sub>2</sub></sub> Mol H<sup>+</sup>-Ionen pro Liter verknüpft. Der dissoziablen Wasserstoff der vier Partner erfährt hierbei die äquivalente Konzentrationsänderung:

$$(d[H \text{ dissoziabel}])_{red_1, ox_2 \rightarrow ox_1, red_2} = -B_H (d[\text{Säure total}])_{red_1, ox_2 \rightarrow ox_1, red_2}$$

woraus sich für d([Säure total])<sub>red<sub>1</sub>, ox<sub>2</sub> → ox<sub>1</sub>, red<sub>2</sub></sub> der Ausdruck  $-(d[H \text{ dissoziabel}])_{red_1, ox_2 \rightarrow ox_1, red_2} / B_H$  ergibt. Wir führen diesen in Gleichung (52) ein und finden resultierend:

$$\begin{aligned} & \frac{(d[H \text{ dissoziabel}])_{red_1, ox_2 \rightarrow ox_1, red_2}}{d p_H} = \\ & = \frac{-2,30 B_H^2}{\frac{1}{[\text{Säure total}]_{ox_1}} + \frac{1}{[\text{Säure total}]_{red_2}} + \frac{1}{[\text{Säure total}]_{red_1}} + \frac{1}{[\text{Säure total}]_{ox_2}}} \end{aligned} \quad (58)$$

$(d[\text{H dissoziabel}]_{\text{red}_1, \text{ox}_2 \rightarrow \text{ox}_1, \text{red}_2} / d p_{\text{H}})$  misst die durch die oxydoreduktive Gleichgewichtseinstellung bedingte  $\text{H}^+$ -Pufferungskapazität. Diese ist unabhängig vom Vorzeichen der quadratisch in die Gleichung (58) eingehenden Grösse  $B_{\text{H}}$ . Ähnlich wie das im § 5 behandelte Ansprechen auf  $p_{\text{H}}$ -Änderungen hat  $(d[\text{H dissoziabel}]_{\text{red}_1, \text{ox}_2 \rightarrow \text{ox}_1, \text{red}_2} / d p_{\text{H}})$  nur dann einen beträchtlichen Wert, wenn das Oxydoreduktionssystem aus zwei Redoxsystemen mit nicht zu grosser Differenz der Normalpotentiale besteht, und  $|B_{\text{H}}|$  nicht zu klein ist. Für die Oxydoreduktionssysteme Gleichung (54) und (53) finden wir nach Gleichung (58) mit den im § 5 benutzten Daten:

$$d([\text{H dissoziabel}]_{\text{red}_1, \text{ox}_2 \rightarrow \text{ox}_1, \text{red}_2} / d p_{\text{H}}) \sim -0,006 \text{ bzw. } -1,4,$$

entsprechend der Freisetzung durchs erstere System von 0,006, bzw. durchs letztere System von 1,4 Mol  $\text{H}^+$ -Ionen pro Liter pro  $p_{\text{H}}$ -Zunahme um eine Einheit.

Abgesehen von dieser Pufferwirkung des Gleichgewichtssystems, wirken dessen Bestandteile  $\text{red}_1$ ,  $\text{ox}_2$ ,  $\text{ox}_1$  und  $\text{red}_2$  als gewöhnliche  $\text{H}^+$ -Puffer. So finden wir in der Fermentgrenzschichte bei  $p_{\text{H}} 7$  z. B. für 0,001-m. 3-Phosphoglycerinaldehyd und 0,3-m. 3-Phosphoglycerinsäure mit Hilfe der Gleichung (57b) und (57c) die  $\text{H}^+$ -Pufferungskapazitäten 0,0005 und 0,18. Bei praktisch vollständiger Dissoziation oder im Fall einer nahezu horizontalen Wendetangente der Titrationskurve, wie sie die Cozymase I bei  $p_{\text{H}} 7$  aufweist<sup>1)</sup>, ist die Kapazität eines Puffers verschwindend klein.

Abnorme  $p_{\text{H}}$ -Änderungen, die spontan oder infolge äusserer Einflüsse in einer Zelle stellenweise zustande kommen, können den koordinierten Zellstoffwechsel u. a. durch Inaktivierung von Fermentproteinen stören und eventuell den Zelltod herbeiführen. Ein Vergleich der in der Fermentgrenzschichte wirkenden Pufferungsmechanismen zeigt bereits anhand der gebrachten Zahlenwerte, dass der Pufferungskapazität der oxydoreduktiven Gleichgewichtseinstellung ein wesentlicher, wenn nicht der ausschlaggebende Anteil am unmittelbaren Schutz des Fermentproteins vor  $\text{H}^+$ - oder  $\text{OH}^-$ -Inaktivierung zukommt. Die Dehydrasen einer Zelle ermangeln dieser Schutzfunktion, wie die zwei Anwendungsbeispiele der Gleichung (58) zu erkennen geben, angenähert in dem Masse, als an ihnen Oxydoreduktionssysteme mit beträchtlicher Differenz der Normalpotentiale oder sehr kleinem  $|B_{\text{H}}|$  umgesetzt werden.

Die biochemische Erfahrungstatsache, dass die meisten aeroben Zellarten den oxydativen Abbau der Kohlehydrate mittels einer langen Reaktionsreihe bewerkstelligen und so die rund 700000 cal pro Mol betragende freie Energieabnahme der Zuckeroxydation in kleine Beträge unterteilen, lässt sich auf Grund der vorstehenden Ergebnisse,

<sup>1)</sup> Meyerhof, O., und Möhle, W., Biochem. Z. 294, 249 (1937).

namentlich der Gleichungen (52) und (58), als die Folge eines biologischen Ausleseprozesses deuten. Im Verlaufe dieses Prozesses sterben unter der Auswirkung zumindest zweier nachteiliger Faktoren (mangelhafte Koordination der oxydoreduktiven Teilprozesse und ungenügender Schutz vor H<sup>-</sup>- oder OH'-Inaktivierung der Dehydrasen) jene Zellarten bevorzugt aus, welche die Eigenschaft der Synthese von Fermentproteinen besitzen, an denen Oxydoreduktionssysteme mit erheblichem Unterschied der Normalpotentiale oder sehr kleinem  $|B_H|$  umgesetzt werden. Die dauernd fortbestehenden Zellarten entsprechen darnach der obigen Erfahrungstatsache.

Physikalisch-chemisches Institut der Universität Zürich.

## 52. Zur percutanen Resorption lipoidlöslicher Substanzen aus organischen Lösungsmitteln

von Walter Stadlin.

(26. II. 45.)

Im Jahre 1885 schrieb *Ellenberger*<sup>1)</sup>, dass alles durch die unverletzte Haut resorbierbar ist, was gasförmig ist, was Fette löst oder in Fett gelöst zur Anwendung gelangt (zit. nach *Rothman*<sup>2)</sup>). Hierbei spielt sicherlich eine Rolle, dass diese Substanzen im Hauttalg der Hautoberfläche und in den Fetten der Epidermis löslich sind (*Fيلهне*)<sup>3)</sup>,

„wenn auch ein absolutes Hindernis für die Resorption von lipoidunlöslichen Stoffen weder an der Hautoberfläche noch in der Hornschicht gelegen ist, nur diese sind aber mit Fetten und Cholesterinfetten durchtränkt.“ (zit. nach *Rothman*<sup>2)</sup>).

Die Lipoidlöslichkeit spielt aber nicht nur, und wohl auch nicht in erster Linie eine Rolle für die Penetration durch die mit Fetten und Cholesterinen „durchtränkten“ Hautschichten, sondern „sie ist für die Resorption in die lebende Zelle massgebend.“ (*Rothman*<sup>2)</sup>).

Nach der Lehre von *Meyer-Overton*

„ist das Zellprotoplasma in einen Fettmantel eingehüllt, der jene Stoffe aufnimmt, die fettlöslich sind.“ „Die Geschwindigkeit, mit der Stoffe in die Membran eindringen können, ist von dem Lösungsverhältnis derselben in Lipoid und Wasser abhängig und steigt, je mehr diese Beziehung sich zugunsten der Lipoidlöslichkeit verschiebt, doch darf nach allgemeinen Grundsätzen für die Resorption die Löslichkeit in Wasser nicht auf Null herabsinken, weil die Wasserlöslichkeit eine Voraussetzung für diesen Vorgang bildet.“ (zit. nach *Königstein*<sup>4)</sup>).

1) *Ellenberger*, Lehrb. d. allg. Ther. d. Haussäugetiere, Dresden 1885.

2) *Rothman*, Handb. der norm. u. path. Physiol. 1929, 107.

3) *Fيلهне*, Berl. Klin. Wschr. 1898, Nr. 3, 45.

4) *Königstein*, Ar. Pth. 97, 262 (1923).