

Untersuchungen über bakteriostatische Chinone und andere Antibiotica.

II. Mitteilung: Hemmungswirkungen verschiedener
Antibiotica auf die Wasserstoffperoxydzersetzung
durch Blutkatalase.

Von

O. Hoffmann-Ostenhof und **E. Biach**.

Aus dem I. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

(Eingelangt am 28. Febr. 1946. Vorgelegt in der Sitzung am 7. März 1946.)

Wie in der ersten Mitteilung dieser Reihe¹ ausgeführt wurde, haben wir uns die Aufgabe gestellt, den Einfluß verschiedener Antibiotica auf einige Fermentsysteme zu prüfen, in der Hoffnung, auf diese Weise Aufklärung über den Mechanismus der Hemmung des Bakterienwachstums durch diese Stoffe zu erhalten.

Als zweites zu untersuchende Fermentsystem wählten wir die Wasserstoffperoxydzersetzung durch Katalase. Die Gründe, warum wir gerade dieses System für unsere Versuche aussuchten, sind die folgenden: Viele Bakterien, darunter fast alle pathogenen Aerobier, sowie auch der gewöhnlich zur Austestung der bakteriostatischen Wirksamkeit verwendete *Staphylococcus aureus* produzieren Katalase. Andererseits kommt dem p-Benzochinon, also dem Grundkörper der Antibiotica aus der Chinonreihe, welcher selbst auch eine allerdings geringe bakteriostatische Wirkung aufweist, eine deutliche Hemmwirkung gegenüber der Katalaseaktivität zu, worüber *A. Alexejew* und *K. Russinowa*², deren Arbeit uns leider nur im Zentralblattauszug vorlag, schon seinerzeit berichtet haben. Schließlich haben *A. Locke*, *E. R. Main* und *R. R. Mellon*³ eine spezifische Hemmwirkung des Sulfanilamids und seiner Derivate auf die Katalaseaktivität beobachtet. Nach den Untersuchungen von *G. Carrara*

¹ *O. Hoffmann-Ostenhof* und *W. H. Lee*, diese Z. **76**, 180 (1946).

² *Bull. Inst. Rech. biol. Perm.* **6**, 425 (1928); *Chem. Zbl.* **1929 II**, 2055.

³ *Science (New York)* **88**, 620 (1938).

und *F. M. Chiancone*⁴, welche einen eventuellen Antagonismus zwischen den Sulfanilamiden und der p-Aminobenzoesäure auch gegenüber der Katalase nachzuweisen versuchten, ist die p-Aminobenzoesäure entgegen den Erwartungen nicht in der Lage, die Katalasehemmung durch Sulfanilamide zu verhindern.

Für unsere Arbeiten verwendeten wir ebenso wie *Alexejew* und *Russinowa* ein Katalasepräparat aus menschlichem Blut. Wir sind uns dessen bewußt, daß die kristallisierte Katalase nach *Sumner* und *Dounce* besser reproduzierbare Ergebnisse erbracht hätte, aus welchen man auch genauere Angaben über die Kinetik des Hemmprozesses hätte machen können; anderseits stand uns, durch die derzeitigen Verhältnisse bedingt, die zur Herstellung kristallisierter Katalase notwendige Menge Rinderleber nicht zur Verfügung. Außerdem erscheint es nach den Angaben aller Autoren als fast sicher, daß alle Katalasen, seien sie nun tierischer, pflanzlicher oder bakterieller Herkunft, in chemischer Hinsicht sehr ähnlich aufgebaut sind, so daß wohl kein ernster Anstoß daran genommen werden kann, Blutkatalase als Modellsubstanz für Katalasen bakteriellen Ursprungs zu verwenden.

Bei unseren Hemmungsversuchen mit der Katalase fanden wir, daß, ähnlich wie bei den vorhergegangenen Versuchen mit der Urease, die Hemmung der Katalaseaktivität durch unsere Antibiotica mit der antibakteriellen Wirksamkeit dieser Substanz *nicht* parallel ging. Wir konnten dagegen im allgemeinen eine auffallende Übereinstimmung zu den bei den Versuchen mit der Urease gefundenen Hemmungswerten finden; diese stellt eigentlich ein recht überraschendes Ergebnis dar, wenn man die Verschiedenheit der Wirkmechanismen dieser beiden Enzyme, über welche ja immerhin schon recht bestimmte Vorstellungen bestehen⁵, miteinander vergleicht. Allerdings scheint die Blutkatalase ein gegen Inhibitoren etwas empfindlicheres System darzustellen, denn wir konnten mit Stoffen, welche auf die Harnstoffzersetzung durch Urease keinerlei hemmende Wirkung entfalteten, bei der Wasserstoffperoxydzerersetzung doch noch eine, wenn auch geringe, Hemmung erzielen.

Bei Vergleich der erhaltenen Werte (siehe Tabelle) mit den Ergebnissen der bakteriologischen Untersuchungen, welche von *A. E. Oxford*⁶ und *E. F. Moeller*⁷ an Kulturen von *Staphylococcus aureus* mit denselben Substanzen ausgeführt wurden, sind folgende Tatsachen bemerkenswert:

⁴ *Chim. e Ind. (Milano)* **23**, 435 (1941); *Chem. Zbl.* **1942 II**, 67.

⁵ Vgl. etwa: *D. Keilin* und *E. F. Hartree*, *Proc. Roy. Soc. (London)*, Ser. B **124**, 397 (1938); *J. B. Sumner* und *L. O. Poland*, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **30**, 553 (1933) sowie *K. G. Stern* und *K. Salomon*, *Enzymologia* **2**, 96 (1937).

⁶ *Chem. Industry* **61**, 189 (1942).

⁷ Zitiert bei *K. Wallenfels*, *Chemie* **58**, 1 (1945).

Gerade die aktivst antibakteriellen Substanzen der Chinonreihe, wie das 4-Methoxytoluchinon, das 2,6-Dimethoxybenzochinon und das Methyl-naphthazarin (2-Methyl-5,8-dioxy-1,4-naphthochinon) zeigten eine nur geringe Hemmwirkung auf die katalatische Wasserstoffperoxydzersetzung. (Diese drei Substanzen hatten auf die Harnstoffzersetzung durch Urease überhaupt keinen hemmenden Einfluß.) Auffallend stark war bei der Katalase, ähnlich wie bei der Urease, die hemmende Wirkung von p-Benzochinon und von 1,2-Naphthochinon, beides Substanzen, deren antibakteriellen Fähigkeiten vergleichsweise ziemlich gering sind. Auch die Halogenderivate des p-Benzochinons verhielten sich bei der Katalase ähnlich wie bei der Urease.

Tabelle 1. Hemmung der Blutkatalase durch Chinone und andere Antibiotica.

| Substanz (Lösungsmittel) | Perzentuelle Hemmung der Wasserstoffperoxydzersetzung bei verschiedener molarer Konzentration des Hemmstoffs (Durchschnitt aus den nach 5, 10, 15 und 20 Minuten gemessenen Werten) | | | |
|------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | $1,67 \cdot 10^{-4}$ | $1,67 \cdot 10^{-5}$ | $1,67 \cdot 10^{-6}$ | $1,67 \cdot 10^{-7}$ |
| p-Benzochinon (Wasser) | 29,1 | 15,3 | 3,0 | 1,3 |
| Toluchinon (Wasser) | 24,8 | 14,8 | 3,6 | 0,3 |
| 4-Methoxytoluchinon (Wasser) | 1,8 | 0 | — | — |
| 2,5-Dimethoxychinon (Methanol) | — | 10,1 | 0 | — |
| 2,6-Dimethoxychinon (Wasser) | 11,6 | 6,3 | 2,1 | 0 |
| 2,6-Dichlorchinon (Wasser) | 26,8 | 7,8 | 0 | — |
| 2,5-Dichlor-3,6-dioxychinon (Wasser) | 0 | — | — | — |
| Trichlormethylchinon (Äthanol) | — | 3,9 | — | — |
| 1,2-Naphthochinon (Wasser) | 33,8 | 25,9 | 18,8 | 4,9 |
| 1,4-Naphthochinon (Methanol) | 19,9 | 9,6 | 4,7 | 0 |
| Naphthazarin (Methanol) | 23,9 | 15,4 | 0 | — |
| Methylnaphthazarin (Methanol) | 4,0 | 0 | — | — |
| Penicillin (Wasser) | 1,8 | 0 | — | — |
| Patulin (Wasser) | 0 | — | — | — |
| Salicylsäure (Wasser) | 2,8 | — | — | — |

Von den antibiotisch wirksamen Substanzen anderer Gruppen, die uns zur Verfügung standen, zeigte das Penicillin (verwendet wurde das Na-Salz, ein Produkt der Commercial Solvents Corp., welches wir über die Schweiz erhielten) auch in ziemlich hoher Konzentration nur eine ganz geringe Hemmwirkung, welche kaum die Versuchsfehlergrenze überschritt. Gegenüber der Harnstoffzersetzung durch Urease hat das Penicillin nach den Angaben von *J. C. Turner*, *F. K. Heath* und *B. Magasanik*⁸ eine sehr deutliche Hemmwirkung, welche sogar nach einem Vorschlag der genannten Autoren dazu benützt werden soll, die Penicillin-

⁸ Nature (London) 150, 633 (1942).

konzentration in Blut und anderen Körperflüssigkeiten zu bestimmen. Ebenso ist eine Hemmwirkung der Katalaseaktivität durch Salicylsäure kaum wahrnehmbar, während letztere doch eine recht deutliche ureasehemmende Wirkung zeigt. Von den antibiotischen ungesättigten Lactonen stand uns wieder nur Patulin (Anhydro-3-oxymethylen-tetrahydropyron-2-carbonsäure) zur Verfügung; dieses hemmte die Katalaseaktivität ebensowenig wie seinerzeit die Ureasewirkung.

Über den Wirkmechanismus der Katalasehemmung durch Chinone haben wir einige Versuche angestellt; es ist uns aber noch nicht gelungen, in die Art des Eingreifens der Chinone in den enzymatischen Vorgang Einblick zu erhalten. Wir beabsichtigen unsere Untersuchungen darüber fortzusetzen und hoffen in Bälde darüber berichten zu können.

Herrn Prof. *L. Ebert* danken wir bestens für das unserer Arbeit entgegengebrachte fördernde Interesse. Die meisten erwähnten Chinonderivate wurden von *Frl. G. Reitmaier* dargestellt.

Experimenteller Teil.

Für alle Hemmungsversuche wurde ein Katalasepräparat aus dem Blut einer Versuchsperson benützt, welches wir herstellten, indem wir 0,02 ccm aus der Fingerbeere gewonnenes Blut mit 50 ccm destilliertem Wasser verdünnten. Zur genauen Einstellung der Wasserstoffionenkonzentration auf $p_H = 7$, bei welchem p_H alle Bestimmungen durchgeführt wurden, benützten wir eine $\frac{1}{5}$ molare Phosphatpufferlösung nach *Soerensen*. Das Wasserstoffperoxyd in den Versuchsansätzen wurde jodometrisch mit $\frac{1}{100}$ n-Natriumthiosulfatlösung bestimmt, nachdem es sich gezeigt hatte, daß die für Blutkatalasebestimmungen gewöhnlich verwendete manganometrische Methode mit Kaliumpermanganat für unsere Versuche zu ungenau war, was auf die schwere Erkennbarkeit des Farbumschlags durch die Eigenfärbung der Lösungen zurückzuführen ist.

Ausführung der Bestimmung: Zu 10 ccm der oben beschriebenen Blutlösung werden 75 ccm Pufferlösung und 25 ccm Lösung des jeweilig untersuchten Hemmkörpers zugesetzt, wobei sämtliche Lösungen durch längeres Stehen im Thermostaten die Temperatur von 20° haben sollen. Zu dieser Mischung werden 40 ccm ebenfalls auf 20° temperierte $\frac{1}{40}$ mol. H_2O_2 -Lösung gegeben und die Mischung in den Thermostaten gestellt. Nach genau 5, 10, 15 und 20 Minuten nach der Zugabe des Wasserstoffperoxyds werden je 25 ccm der Lösung entnommen. Diese vier verschiedenen Proben werden mit je 3 ccm 10%iger Schwefelsäure, 10 ccm 10%iger Kaliumjodidlösung und einigen Tropfen einer gesättigten Lösung von Molybdänsäure versetzt. Dann wird auf die übliche Art mit $\frac{1}{100}$ n-Thio-sulfatlösung titriert.

Zur Bestimmung der perzentuellen Hemmung ist auch die Ermittlung des Anfangsgehaltes an Wasserstoffperoxyd, sowie die Verfolgung der ungehemmten Zersetzung des H_2O_2 durch das gleiche Blutkatalasepräparat erforderlich. Der Anfangswert wird bestimmt, indem eine gleichartige Versuchslösung, der aber statt den 10 ccm Blutlösung die gleiche Menge destillierten Wassers zugesetzt wurde, auf ihren Gehalt an Wasserstoffperoxyd untersucht. Zur Verfolgung der ohne Inhibitor verlaufenden Zersetzung des H_2O_2 wird die oben beschriebene Bestimmung mit einer Versuchslösung ausgeführt, die an Stelle der 25 ccm Lösung des Hemmkörpers 25 ccm des für den zu prüfenden Inhibitor verwendeten Lösungsmittels enthält.

Wir berechneten die perzentuelle Hemmung der Katalaseaktivität, die uns als die günstigste Maßzahl für Vergleiche erschien, nach folgender Formel:

$$P \cdot H \cdot = \frac{A - B}{A - C} \cdot 100$$

Hierbei bedeutet A den Anfangswert an H_2O_2 , B die Menge von H_2O_2 , welche nach einer bestimmten Zeit in der durch einen Hemmkörper beeinflussten Reaktionslösung noch vorhanden ist, und C die Menge H_2O_2 , die nach derselben Zeit in einer ungehemmten, aber sonst gleichartigen Lösung noch vorhanden ist. An Stelle der H_2O_2 -Menge kann man auch zweckmäßiger die jeweils verbrauchten Kubikzentimeter Thiosulfat in analoger Weise in die Formel einsetzen.

Für unsere Tabelle benützten wir die Durchschnittswerte aus den perzentuellen Hemmungen, die wir für vier verschiedene Zeiten (5, 10, 15 und 20 Minuten) in oben beschriebener Weise ermittelten.

Die Genauigkeit der Methode läßt leider bei geringen Hemmungen (unter 5%) etwas zu wünschen übrig, immerhin dürften aber die Werte doch eine gute Vergleichsbasis abgeben.

Zusammenfassung.

Es wurde die hemmende Wirkung verschiedener Antibiotica, hauptsächlich aus der Chinonreihe, auf die Wasserstoffperoxydspaltung durch Blutkatalase gemessen. Die Blutkatalase diente in diesem Falle als Modellsubstanz für Katalasen bakteriellen Ursprungs. Die Resultate ergaben, daß von den Chinonen gerade die antibiotisch stärkst wirksamen, wie das 4-Methoxytoluchinon und das Methylnaphthazarin, eine nur sehr geringe hemmende Wirkung gegenüber der Katalaseaktivität zeigten, während bakteriostatisch schwach wirksame Substanzen, wie das p-Benzochinon und das 1,2-Naphthochinon, die Katalasewirkung stark hemmten. Bei den Chinonen wurde eine bemerkenswerte Übereinstimmung mit den Hemmungswerten, welche bei früheren Versuchen über die Hemmung

der Ureaseaktivität durch dieselben Substanzen erhalten wurden, festgestellt. Von den Antibiotica anderer chemischer Konstitution, die auch auf ihre antikatalatische Wirkung geprüft wurden, hatten das Na-Salz des Penicillins, das Patulin und die Salicylsäure in den geprüften Konzentrationen keine oder nur eine sehr geringe Hemmwirkung auf die Katalaseaktivität.

Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, daß es unwahrscheinlich ist, daß die antibakterielle Wirkung der untersuchten Substanzen auf ihrer katalasehemmenden Wirkung beruht.