

Die Elementaranalyse und Stickstoffbestimmung lassen auf ein Dinitroderivat schließen.

0.1309 g Sbst. (bei 100° getrocknet): 0.2374 g CO₂, 0.0398 g H₂O. - 0.1512 g Sbst.: 19.2 ccm N (16°, 749 mm).

C₁₆H₁₂O₈N₄. Ber. C 49.48, H 3.09, N 14.44.
Gef. » 49.46, » 3.37, » 14.49.

Eine weitere Charakterisierung dieses Körpers behalte ich mir vor.
Zum Schluß gestatte ich mir noch, Hrn. Prof. Dr. W. Suid für seine Unterstützung, sowie Hrn. Dr. G. Koller für die Anregung zu dieser Arbeit bestens zu danken.

Die Arbeit wird fortgesetzt.

442. A. Bach: Über das Verhalten der Peroxydase gegen Hydroxylamin, Hydrazin und Blausäure.

(Eingegangen am 19. Juni 1907.)

Nachdem die Peroxydase sich gegen Jod als wenig empfindlich erwiesen hatte¹⁾), wurde ihr Verhalten gegen einige andere als Protoplasma- und Fermentgifte geltende Agenzien untersucht. Im nachstehenden sollen die Ergebnisse dieser Untersuchung mitgeteilt werden.

Peroxydase und Hydroxylaminchlorhydrat.

Um die Einwirkung des Hydroxylamins auf Peroxydase messen zu verfolgen, wurde die von mir in früheren Arbeiten vielfach benutzte Methode, nämlich die durch das System Peroxydase-Hydroperoxyd bewirkte Oxydation des Pyrogallols zu Purpurogallin, angewandt. Seiner Alkalinität wegen konnte hier das Hydroxylamin nicht in freien Zustände, sondern nur als Salz zur Verwendung kommen. Die Versuche wurden mit einem frisch dargestellten peroxydasereichen Extrakt aus Meerrettigwurzeln und reinem Hydroxylaminchlorhydrat angestellt. Die Bestimmung des Aktivierungsvermögens des Extraktes nach der früher²⁾ beschriebenen Pyrogallolmethode ergab, daß 15 ccm desselben 0.179 g Hydroperoxyd unter Bildung von 0.359 g Purpurogallin aktivierten. Von diesem Extrakt wurden je 75 ccm in gut verschließbar Fläschchen gebracht und mit steigenden Mengen Hydroxylaminchlorhydrats in 25 ccm Wasser versetzt. Zu bestimmten Zeiten wurden je 20 ccm der Gemische mit 1 g Pyrogallol in 50 ccm Wasser und 30 ccm

¹⁾ Diese Berichte **40**, 230 [1907].

²⁾ Diese Berichte **37**, 3787 [1904].

1-prozentiger Hydroperoxydlösung zusammengebracht, die Reaktionsgemische wurden 24 Stunden stehen gelassen und das entstandene Purpurogallin wurde dann in der früher angegebenen Weise gewogen. Durch Vorversuche wurde festgestellt, daß Peroxydase auch gegen Hydroxylamin verhältnismäßig wenig empfindlich ist. Dementsprechend wurden auf je 75 ccm Extrakt 0.1—5.0 g Hydroxylaminchlorhydrat angewandt. In folgender Tabelle sind die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zusammengestellt. Die angegebenen Mengen Hydroxylaminchlorhydrates sind auf das wasserfreie Salz bezogen.

Erhaltenes Purpurogallin.

Hydroxylaminchlorhydrat	I 0.1 g	II 0.5 g	III 1.0 g	IV 1.5 g	V 2.0 g	VI 3.0 g	VII 4.0 g	VIII 5.0 g
Sofort nach dem Vermischen	0.255	0.217	0.174	0.142	0.107	0.047	0.013	0.017
Nach 24 Stunden	0.256	0.216	0.177	0.145	0.103	0.014	0.016	0.012
» 48 »	0.250	0.219	0.175	0.141	0.099	0.012	0.015	0.014
Ohne Hydroxylaminchlorhydratzusatz	0.359 g.							

Der Zusatz von steigenden Mengen Hydroxylaminchlorhydrats bewirkte also eine steigende Lähmung der Peroxydase, wobei die Reaktion zwischen Peroxydase und Hydroxylaminchlorhydrat mit sehr großer Geschwindigkeit verlief. Denn nach 1—2 Tage langer Einwirkung des Hydroxylaminchlorhydrats war die Lähmung der Peroxydase nicht größer, als sofort nach dem Vermischen der Reagenzien. Merkwürdigerweise war bei Anwendung von 4 und 5 g Hydroxylaminchlorhydrat auf 75 ccm Extrakt (Versuche VII und VIII) die Wirkung der Peroxydase anscheinend noch nicht aufgehoben. Das Pyrogallolreagens färbte sich auch in diesen Fällen tiefbraun und lieferte geringe Niederschläge.

Als ich aber mit sämtlichen Peroxydasegemischen die übrigen Peroxydasereaktionen qualitativ ausführte, beobachtete ich zu meiner Überraschung, daß dieselben nur bei Gemischen I—VI erhalten werden konnten; bei Gemischen VII und VIII blieben sie dagegen, mit Ausnahme der Reaktionen mit Hydrochinon und Pyrogallol, völlig aus. Proben wurden mit Phenol, Resorcin, Hydrochinon, Pyrocatechin, Guajacol, Guajac-Harz, *o*- und *m*-Phenyldiamin und Jodwasserstoffsäure angestellt.

Daß das Auftreten der Färbungsreaktionen bei VII und VIII nicht etwa durch die Anwesenheit von allzu großen Hydroxylaminmengen verhindert wurde, konnte dadurch bewiesen werden, daß auf Zusatz von aktiver Peroxydaselösung die farblos gebliebenen Reaktionsgemische die für jeden Fall charakteristische Färbung annahmen. Allem

Anschein nach war hier durch die Einwirkung des Hydroxylaminchlorhydrats die von mir¹⁾ gesuchte Trennung der in gewöhnlicher Peroxydase vermutlich enthaltenen spezifischen Bestandteile erzielt, indem sämtliche spezifische Enzyme mit Ausnahme derjenigen, welche Hydroperoxyd bei der Oxydation des Hydrochinons und des Pyrogallols aktivieren, durch dieses Agens zerstört wurden. Eine nähere Untersuchung ergab aber, daß es sich hier nicht um eine Trennung der spezifischen Peroxydasen, sondern um eine eigenartige Reaktion zwischen den genannten Phenolen und Hydroxylaminchlorhydrat in Gegenwart von Hydroperoxyd handelt. Denn beim Zusammenbringen von Hydrochinon und Pyrogallol mit Hydroxylaminchlorhydrat in Gegenwart von Hydroperoxyd wurden genau dieselben Erscheinungen wie bei Versuchen VII und VIII beobachtet.

Dementsprechend erwiesen sich die bei letzteren erhaltenen, beinahe schwarzen Niederschläge als völlig purpurogallinfrei, während der bei Versuch VI erhaltene Niederschlag die Reaktionen des Purpurgallins in unzweideutiger Weise gab. Läßt man Hydrochinon und Pyrogallol mit Hydroxylaminchlorhydrat in wässriger Lösung an der Luft stehen, so färben sich die Gemische nicht mehr als die entsprechenden Phenollösungen allein. Es scheint demnach, daß Hydrochinon und Pyrogallol mit Hydroxylaminchlorhydrat unter Bildung von Körpern reagieren, welche durch Hydroperoxyd viel rascher als die Phenole selbst angegriffen werden. Unter gleichen Bedingungen reagieren andere Phenole mit Hydroxylaminchlorhydrat und Hydroperoxyd nicht.

Aus obigen Versuchen geht also hervor, daß bei Anwendung von mehr als 3 g Hydroxylaminchlorhydrat auf 75 ccm Peroxydaseextrakt die Wirksamkeit des Fermentes völlig aufgehoben wurde. Näher wurde die Menge Hydroxylaminchlorhydrates, welche zur vollen Zerstörung der Peroxydase erforderlich war, in folgender Weise bestimmt

10 Reagensröhren wurden mit je 1 ccm Peroxydaseextrakt beschickt, und der Inhalt wurde der Reihe nach mit 0.040–0.050 g Hydroxylaminchlorhydrat in 5 ccm Wasser und dann mit 1 ccm gesättigter Guajacollösung und 0.5 ccm 1-prozentiger Hydroperoxydlösung versetzt. Die Braunfärbung des Reagens trat bei 0.048 g Hydroxylaminchlorhydrat noch deutlich, bei 0.049 g nicht mehr auf. Das Mittel aus diesen Zahlen — 0.0485 g — ergibt die Menge des Salzes, welche zur vollständigen Lähmung der in 1 ccm Extrakt enthaltenen Peroxydase erforderlich war.

Die Tatsache, daß die Wirksamkeit der Peroxydase erst durch verhältnismäßig große Mengen Hydroxylaminchlorhydrats aufgehoben werden kann, läßt der Voraussetzung Raum, daß es sich hier nicht um eine »Giftwirkung«, sondern um eine stöchiometrische Reaktion

¹⁾ Vergl. diese Berichte **40**, 230 [1907].

zwischen Peroxydase und Hydroxylaminchlorhydrat handelt. Schon mehrfach ist hervorgehoben worden¹⁾, daß Peroxydase und Hydroperoxyd stets in konstanten Verhältnissen mit einander reagieren, und daß die Hydroperoxydmenge, welche durch ein gegebenes Quantum Peroxydase aktivierbar ist, ziemlich genau bestimmt werden kann. Da in vorliegendem Falle sowohl die Menge des zur vollen Lähmung der Peroxydase erforderlichen Hydroxylamins wie die des aktivierten Hydroperoxyds bekannt sind, so kann aus dem Verhältnis Hydroxylaminchlorhydrat:Hydroperoxyd auf das Verhältnis Hydroxylaminchlorhydrat:Peroxydase geschlossen werden.

Die Berechnung ergab, daß hier auf 1 Mol. Hydroperoxyds fast genau 2 Mol. Hydroxylaminchlorhydrats kommen:

15 ccm Peroxydaseextrakt aktivierte 0.179 g = 0.00526 Mol. Hydroperoxyds. Zur Tötung der Peroxydase in 15 ccm Extrakt waren $0.0485 \times 15 = 0.7215 = 0.01046$ Mol. Hydroxylaminchlorhydrats erforderlich.

Hydroxylaminchlorhydrat: Hydroperoxyd = 1.984 : 1.

Angenommen, daß Hydroperoxyd und Peroxydase Molekül für Molekül mit einander reagieren, scheint also die Peroxydase mit 2 Mol. Hydroxylaminchlorhydrats unter Aufheben ihrer Wirksamkeit in Reaktion zu treten. Ist weniger als 2 Mol. Hydroxylaminchlorhydrats vorhanden, so bleibt ein Anteil der Peroxydase ungelähmt.

Es sei hier voraus bemerkt, daß ein völlig ähnliches Verhältnis auch bei der Einwirkung von Kaliumcyanid auf Peroxydase gefunden wurde; beim Hydrazinsulfat wurde dagegen ein von diesem beträchtlich abweichendes Verhältnis beobachtet.

Peroxydase und Hydrazinsulfat.

Die Versuche wurden in ähnlicher Weise wie die oben beschriebenen ausgeführt. Angewandt wurde ein Extrakt aus Meerrettigwurzeln, von dem 15 ccm 0.151 g Hydroperoxyd unter Bildung von 0.312 g Purpurogallin aktiviert. Die in nachstehender Tabelle angegebenen Mengen Hydrazinsulfats beziehen sich auf das reine wasserfreie Salz.

Erhaltenes Purpurogallin.

Hydrazinsulfat	I 0.10	II 0.25	III 0.50	IV 0.75	V 1.0	VI 1.5	VII 2.0
	g	g	g	g	g	g	g
Sofort nach dem Vermischen	0.313	0.277	0.177	0.040	0.017	0.016	0.017
Nach 24 Stunden	0.311	0.279	0.175	0.032	0.016	0.019	0.015
» 48 »	0.309	0.270	0.160	0.014	0.019	0.014	0.014
Ohne Hydrazinsulfatzusatz: 0.312 g.							

¹⁾ Diese Berichte 37, 1346, 3785 [1904]; 38, 1878 [1905].

Im wesentlichen verliefen also die Versuche mit Hydrazinsulfat in ähnlicher Weise wie mit Hydroxylaminchlorhydrat. Nur war hier eine geringe Nachwirkung des Hydrazinsulfats auf Peroxydase bemerkbar, und die Menge des zum Aufheben der Peroxydasewirkung erforderlichen Salzes war beträchtlich geringer. Gemisch IV gab am Beginn des Versuchs noch sämtliche Reaktionen der Peroxydase, Gemisch V keine mehr mit Ausnahme der Hydrochinon- und Pyrogallolreaktion. Niederschläge V, VI und VII waren purpurogallinfrei. Gegen Hydrazinsulfat und Hydroperoxyd verhalten sich die Phenole wie gegen Hydroxylaminchlorhydrat, indem nur Hydrochinon und Pyrogallol unter Braunfärbung und Bildung von geringen schwarzen Niederschlägen rasch angegriffen werden.

Die in oben angegebener Weise ausgeführte nähere Bestimmung der Hydrazinsulfatmenge, welche zur völligen Lähmung der Peroxydase erforderlich war, ergab, daß die in 1 ccm Extrakt enthaltene Peroxydase durch 0.0103 g = 0.000079 Mol. Hydrazinsulfats zerstört wird. Da 1 ccm Extrakt 0.01066 g = 0.00031 Mol. Hydroperoxyds aktivierte, so hat man hier das Verhältnis:

$$\text{Hydrazinsulfat : Hydroperoxyd} = 0.254 : 1.$$

Mit einem anderen 18 Monate aufbewahrten Peroxydaseextrakt, von dem 15 ccm 0.128 g Hydroperoxyd aktivierten, wurde das Verhältnis:

$$\text{Hydrazinsulfat : Hydroperoxyd} = 0.251 : 1$$

erhalten. Während also zur völligen Lähmung der Peroxydase 2 Mol. Hydroxylaminchlorhydrats — auf das aktivierte Hydroperoxyd bezogen — erforderlich sind, wird dieselbe schon durch etwa $\frac{1}{4}$ Mol. Hydrazinsulfats zerstört. Die Ursache dieses Unterschiedes ist mir nicht klar. Möglicherweise spielt hier die Natur der an der Base gebundenen Säure eine gewisse Rolle. Mit Hydroxylaminchlorid und Hydrazinsulfat versetzte Peroxydaselösung reagiert stark sauer, zumal die genannten Salze schon in wässriger Lösung stark hydrolytisch dissoziiert sind. Weitere Aufschlüsse über diesen Gegenstand sollen durch in Aussicht gestellte Versuche über das Verhalten der Peroxydase gegen Säuren gewonnen werden.

Peroxydase und Kaliumcyanid.

Für diese Versuche wurde dasselbe Extrakt wie bei der Versuchsreihe mit Hydrazinsulfat angewandt. Versuchsanordnung wie oben.

Erhaltenes Purpurogallin.

Kaliumcyanid	I 0.05 g	II 0.10 g	III 0.20 g	IV 0.40 g	V 0.60 g	VI 1.0 g	VII 2.0 g	VIII 3.0 g
Sofort nach dem Vermischen	0.251	0.232	0.210	0.166	0.149	0.110	0.039	0.0
Nach 24 Stunden	0.189	0.215	0.214	0.262	0.311	0.312	0.170	0.049
» 48 »	0.169	0.198	0.209	0.270	0.312	0.316	0.198	0.057
» 72 »	0.155	0.188	0.212	0.282	0.310	0.312	0.216	0.066
» 98 »	0.157	0.199	0.210	0.293	0.314	0.313	0.236	0.075
Ohne Kaliumcyanid:	0.312	g.						

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß sofort nach dem Vermischen der Reagenzien die Lähmung der Peroxydase mit steigender Konzentration des Kaliumcyanids bis auf völliges Aufheben ihrer Wirksamkeit zunimmt. Die weitere Einwirkung des Kaliumcyanids geht aber in zwei verschiedenen Richtungen vor sich. Während bei den niederen Konzentrationen (0.05—0.10 g Kaliumcyanid in 100 ccm Gemisch, Reihe I und II) die Wirksamkeit der Peroxydase langsam weiter sinkt, findet bei den höheren Konzentrationen (IV—VIII) eine mehr oder weniger rasche und vollständige »Erholung« des Fermentes statt. Das Optimum für die Erholung scheint etwa bei der Konzentration VI zu liegen. Bei höheren Konzentrationen erfolgt die Erholung viel langsamer. Bei Versuchsreihe III (0.2 g Kaliumcyanid) ist ein Gleichgewichtszustand zwischen Lähmung und Erholung des Fermentes klar ersichtlich, da hier die Wirksamkeit der Peroxydase während der Versuchsdauer innerhalb des Versuchsfehlers unverändert geblieben war. Zu bemerken ist noch, daß beim Zusammenbringen von Pyrogallol, Kaliumcyanid und Hydroperoxyd sich das Gemisch langsam tiefbraun färbt; es liefert aber keine Spur von Purpurogallin.

Da bei den obigen Erscheinungen die Alkalinität des Kaliumcyanids eine Rolle spielen konnte, so wurden die Versuche mit denselben Peroxydase- und Kaliumcyanid-Lösungen in der Weise wiederholt, daß vor dem Vermischen der Reagenzien die Blausäure aus den Kaliumcyanidlösungen durch die berechneten Mengen Essigsäure in Freiheit gesetzt wurde.

Bei der Einwirkung von steigenden Mengen freier Blausäure auf Peroxydase findet also eine gleichmäßige Lähmung und eine gleichmäßige Erholung des gelähmten Fermentes statt. Vergleicht man die in obiger Tabelle angeführten Zahlen mit den bei der Einwirkung von Kaliumcyanid auf Peroxydase erhaltenen, so kommt man zu dem Schluß, daß das Alkalimetall bei der Reaktion zwischen Peroxydase und Blausäure einen schützenden Einfluß auf das Ferment ausübt, indem es bei den niederen Konzentrationen die Lähmung desselben

verzögert, bei den höheren dagegen seine Erholung beschleunigt. Die Ursache dieser Erscheinung soll durch weitere Versuche über das Verhalten der Peroxydase gegen Alkalien erörtert werden.

Erhaltenes Purpurogallin.

Kaliumcyanid + Essigsäure	II. 0.10 g	III. 0.20 g	IV. 0.40 g	V. 0.60 g	VI. 1.0 g	VII. 2.0 g
Sofort nach dem Ver- mischen	0.175	0.166	0.150	0.132	0.104	0.040
Nach 24 Stunden . .	0.206	0.188	0.169	0.149	0.120	0.066
» 48 » . .	0.222	0.206	0.178	0.168	0.148	0.087
» 96 » . .	0.249	0.238	0.227	0.214	0.206	0.104
Ohne Blausäure				0.312 g		

Auf Grund der näheren Bestimmung der Kaliumcyanidmenge, welche zur vollen Lähmung der angewandten Peroxydase erforderlich war, wurde das Verhältnis:

$$\text{Kaliumcyanid : Hydroperoxyd} = 1.957 : 1$$

berechnet.

Die Hauptergebnisse obiger Untersuchung sind also folgende:

1. Die zur völligen Lähmung der Peroxydase erforderlichen Mengen Hydroxylaminchlorhydrates, Hydrazinsulfates und Kaliumcyanids sind so groß, daß es sich hier zweifellos nicht um eine »Giftwirkung«, sondern um eine stöchiometrische Reaktion zwischen Peroxydase und den genannten Substanzen handelt.

2. Vergleicht man diese Mengen mit den Hydroperoxydmengen, welche durch die angewandte Peroxydase aktivierbar sind, so ergibt sich, daß die zur Aktivierung von 1 Mol. Hydroperoxyds erforderliche Peroxydasemenge durch je 2 Mol. Hydroxylaminchlorhydrats und Kaliumcyanids und $\frac{1}{4}$ Mol. Hydrazinsulfats zur vollen Lähmung gebracht wird. Zur näheren Beurteilung dieser Verhältnisse sind weitere Versuche über das Verhalten der Peroxydase gegen Säuren und Alkalien erforderlich.

Genf. Privatlaboratorium.