

Proben im Mikro-van-Slyke-Apparat der Einwirkung salpetriger Säure unterworfen und die Werte in der Tabelle auf 2.0 ccm bzw. auf ccm  $n/20$ -Kalilauge umgerechnet.

Die Verfolgung der ereptischen Hydrolyse geschah in dem abgekochten und filtrierten tryptischen Verdauungs-Gemisch. Wir vermischten 35 ccm dieses Hydrolysates mit 15 ccm Auszug aus Darm-Schleimhaut. In der Lösung wurde  $pH = 7.4$  gemessen. Für die Bestimmung der freigelegten Gruppen verfahren wir wie oben. In beiden Fällen verblieben die Ansätze während der Versuchszeit bei  $30^{\circ}$ .

**346. Wolfgang Langenbeck, Rudolf Hutschenreuter und Walter Rottig: Über organische Katalysatoren, VII. Mitteil.<sup>1)</sup>: Katalytische Wirkungen von Imidazol-häminen.**

[Aus d. Chem. Institut d. Universität Münster i. W.]

(Eingegangen am 21. Oktober 1932.)

Die katalytischen Wirkungen von Para-hämatinen in Abhängigkeit von der Konstitution der angewandten Base sind bisher noch nicht systematisch untersucht worden. Im folgenden bringen wir eine Anzahl Messungen von Reaktionen, bei denen Imidazol-hämine als Katalysatoren wirkten. Diese Klasse von Para-hämatinen schien uns für den angedeuteten Zweck besonders geeignet, weil es verhältnismäßig feste Verbindungen sind, die in wässriger Lösung nicht vollständig zerfallen<sup>2)</sup>.

Wir haben von jedem Imidazol-hämin drei verschiedene Wirkungen gemessen, die katalytische, peroxydatische und eine oxydatische Reaktion (Tabelle 1 bis 3. Die Basen sind nach steigender Aktivität geordnet.) Die Katalase-Wirkung wurde im wesentlichen nach Kuhn und Brann<sup>3)</sup> bestimmt. Als Substrat für die Hämin-Peroxydase haben wir das Pyrogallol gewählt, unsere Meßmethode schließt sich an die bekannte Methode von Willstätter und Stoll<sup>4)</sup> an. Jodwasserstoff kam als Substrat nicht in Frage, weil die meisten Imidazole sehr schnell mit Jod reagieren. Substrat für die Oxydasen-Wirkung war das Cystein<sup>5)</sup>; die Reaktion wurde in schwach saurer Lösung ausgeführt, den Sauerstoff-Verbrauch ohne Katalysator haben wir von den katalytischen Werten abgezogen. Für die Ausarbeitung der Methoden war es ein wichtiger Gesichtspunkt, daß die Bildung der Para-hämatine eine Zeitreaktion ist, die in verdünnter Lösung sehr langsam verlaufen kann<sup>6)</sup>. Wenn man also die wahre Aktivität der Imidazol-hämine messen will, muß man Hämin und Base in verhältnismäßig konzentrierter Lösung zusammenbringen und diese Mischung als Katalysator zur Substrat-Lösung geben.

<sup>1)</sup> VI. Mitteil.: A., im Druck. Zu der vorliegenden Mitteilung vergl. W. Langenbeck, Naturwiss. **20**, 124 [1932]; B. **65**, 842 [1932].

<sup>2)</sup> W. Langenbeck, B. **65**, 845 [1932].

<sup>3)</sup> R. Kuhn u. L. Brann, B. **59**, 2370 [1926]; Ztschr. physiol. Chem. **168**, 27 [1927]. <sup>4)</sup> R. Willstätter u. A. Stoll, A. **416**, 21 [1918].

<sup>5)</sup> D. C. Harrison, Biochem. Journ. **18**, 1009 [1924]; H. A. Krebs, Biochem. Ztschr. **193**, 347 [1928]. <sup>6)</sup> W. Langenbeck, B. **65**, 843 [1932].

Tabelle 1. Katalase-Wirkung (ccm  $n/10$ -Permanganat).

Min.	1-Äthyl-2-methyl-imidazol		2.4.5-Trimethyl-imidazol		2-Methyl-imidazol		Pilocarpin	
	pH 6	pH 7.5	pH 6	pH 7.5	pH 6	pH 7.5	pH 6	pH 7.5
15	0.05	0.08	0.01	0.08	0.22	0.19	0.25	0.32
30	0.07	0.09	0.02	0.16	0.36	0.38	0.38	0.47
60	0.10	0.11	0.05	0.19	0.61	0.53	0.51	0.69

  

Min.	Hämin ohne Base	4(5)-Phenyl-imidazol-sulfonsäure		4(5)-[Cyan-methyl]-imidazol	
		pH 8	pH 6	pH 7.5	pH 6
15		0.36	0.42	0.39	0.91
30		0.58	0.54	0.53	1.35
60		0.92	0.67	0.60	1.88

  

Min.	Pyridin			Imidazol		4(5)-Methyl-imidazol			
	pH 6	pH 7	pH 8	pH 6	pH 7.5	pH 6	pH 7	pH 7.5	pH 8
15	0.91	0.73	0.50	1.53	1.32	0.88	1.94	2.13	1.61
30	1.32	0.97	0.67	2.24	1.92	1.37	2.40	3.00	2.15
60	1.60	1.11	0.82	3.05	2.40	1.82	2.86	3.55	2.52

Tabelle 2. Peroxydase-Wirkung auf Pyrogallol (mg Purpurogallin).

	pH 6	pH 6.5			pH 6	pH 6.5
Hämin ohne Base ....	0.04	—	2.4.5-Trimethyl-imidazol	0.27	—	
1-Äthyl-2-methyl-imidazol .....	0.14	—	4(5)-Methyl-imidazol ..	0.28	0.31	
Pilocarpin .....	0.15	—	2-Methyl-imidazol ....	0.36	—	
Pyridin .....	0.20	0.23	Imidazol .....	0.50	—	
4(5)-[Cyan-methyl]-imidazol .....	0.23	—	4(5)-Phenyl-imidazol-sulfonsäure .....	0.55	—	

Tabelle 3. Oxydierende Wirkung auf Cystein (ccm Sauerstoff).

Min.	I	II	III	IV	V	VI	VII
30	8.2	8.5	14.0	17.4	11.2	27.4	39.9
60	15.7	25.3	22.3	27.2	21.1	43.1	60.3
120	24.7	32.0	31.0	42.6	39.0	64.3	87.8
300	—	51.1	51.4	66.3	80.6	91.1	119.6

I. Hämin ohne Base, II. Imidazol, III. 4(5)-Phenyl-imidazol-sulfonsäure, IV. Pyridin, V. 4(5)-Methyl-imidazol, VI. 1-Äthyl-2-methyl-imidazol, VII. Pilocarpin.

Das wesentliche Ergebnis unserer Messungen ist der Nachweis, daß man durch geeignete Substitution am Imidazolkern Katalysatoren herstellen kann, die viel spezifischer wirken, als die bisher untersuchten Para-hämatine. Das beste Beispiel ist das 4(5)-phenyl-imidazol-sulfonsäure Natrium. Diese Base aktiviert die katalatische Wirkung des Hämins gar nicht, die peroxydatische dagegen auf das 14-fache. Demgegenüber aktiviert Imidazol die Hämin-Katalase auf den 4-fachen, die Peroxydase auf den 12.5-fachen

Wert. Die oxydatische Wirkung des Imidazol-hämins und des Phenyl-imidazol-sulfonsäure-hämins zeigt keine charakteristischen Unterschiede. Wir haben also einen Katalysator dargestellt, der stark als Peroxydase, aber kaum als Katalase wirkt. Für die Kenntnis der Ferment-Wirkungen ist dieser Befund von Wert, da ja die Katalase und die Peroxydase streng spezifisch wirken.

Bemerkenswert ist auch, daß das 1-Äthyl-2-methyl-imidazol die Hämin-Katalase stark hemmt, während es die Oxydase aktiviert. Es läßt sich allerdings nicht mit Sicherheit ausschließen, daß diese Aktivierung zum Teil auf einer Verminderung der H-Ionen-Konzentration beruht, die bei Zusatz der Base trotz starker Pufferung nicht ganz zu vermeiden ist. Die Oxydation des Cysteins ist besonders empfindlich gegen  $p_H$ -Verschiebungen.

Eine starke Aktivierung der Hämin-Katalase und -Peroxydase hat sich bisher nur durch den Wechsel im Ringsystem der zugesetzten Base erreichen lassen. Imidazol-hämin ist katalatisch fast doppelt, peroxydatisch 2.5-mal so wirksam wie Pyridin-hämin. Immerhin zeigt auch das 4(5)-Methyl-imidazol katalatisch einen deutlichen Anstieg gegenüber dem Imidazol selbst, so daß vielleicht auch Substitution unter Beibehaltung des Ringsystems zur Aktivierung führen kann. Die Zahl der untersuchten Basen ist aber bisher noch viel zu gering, als daß man etwas Endgültiges über die günstigste Art der Aktivierung aussagen könnte.

Die Affinität der Imidazole zum Hämin hängt stark von der Substitution ab. Man kann das an der Farbe der Hämin-Basen-Lösungen leicht erkennen. Rot gefärbt, also stark parahäminhaltig, sind alkalische Hämin-Lösungen mit Imidazol, 4(5)-Methyl-imidazol, 4(5)-[Cyan-methyl]-imidazol, 4(5)-Phenyl-imidazol-sulfonsäure und Pilocarpin, die unveränderte braune Hämin-Farbe zeigen Lösungen mit 2-Methyl-imidazol, 2.4.5-Trimethyl-imidazol und 1-Äthyl-2-methyl-imidazol. Anscheinend vermindert Substitution des Imidazols in 2-Stellung seine Affinität zum Hämin.

Die Justus-Liebig-Gesellschaft ermöglichte diese Arbeit durch Gewährung eines Stipendiums an den einen von uns (Hutschenreuter). Wir sprechen dafür unseren besten Dank aus. Zu Dank verpflichtet sind wir ferner Hrn. Prof. P. Esch, Münster, der uns die Benutzung seiner Warburg-Apparatur gestattete.

### Beschreibung der Versuche.

#### Messung der Katalase-Wirkung.

50 mg reines, nach der Pyridin-Methode umkristallisiertes Hämin wurden mit 50 ccm  $m/10$ - $Na_2HPO_4$  30 Min. unter häufigem Umschütteln auf dem Wasserbade erwärmt. Das Hämin ging dabei in Lösung. 5 ccm davon wurden mit 0.002 Mol der betr. Base, gelöst in 5 ccm Wasser, versetzt. Von dieser Mischung verwendeten wir 2 ccm für jede Katalase-Messung (1 mg Hämin).

In einen 100-ccm-Meßkolben wurden 20 ccm  $n/10$ -Wasserstoffperoxyd und 20 ccm  $m/10$ -Phosphat-Puffer gegeben, dann wurde mit kohlensäurefreiem Wasser auf 100 ccm aufgefüllt. Den gefüllten Kolben kühlte man durch 1-stdg. Stehen in Eis auf 0° ab. Dann gab man die Hämin-Basen-Lösung hinzu, schüttelte schnell um, entnahm sofort 25 ccm der Mischung und ließ sie in 10 ccm 10-proz. Schwefelsäure einfließen. Es wurde mit  $n/10$ -Perman-

ganat titriert. Nach 15, 30 und 60 Min. wurden wieder je 25 ccm Lösung entnommen und titriert.

Dies Verfahren unterschied sich von der Methode von Kuhn und Brann<sup>7)</sup> dadurch, daß der Reaktionsverlauf zu verschiedenen Zeitpunkten verfolgt wurde. Dabei zeigte sich, daß der Katalysator ziemlich rasch inaktiviert wurde.

#### Messung der Peroxydase-Wirkung.

0.25 ccm Hämin-Lösung versetzten wir mit 0.01 Mol Base und 4.75 ccm Wasser und verwendeten von dieser Mischung für jeden Versuch 2 ccm (0.1 mg Hämin). In einen 100-ccm-Meßkolben gab man 4 ccm  $n/10$ -Wasserstoffperoxyd und 20 ccm  $m/10$ -Phosphat-Puffer (im allgemeinen  $p_H = 6$ ). Der Kolben wurde auf 100 ccm aufgefüllt und 1 Stde. in Eis auf 0° abgekühlt. Währenddessen wog man 0.25 g reines Pyrogallol in einen Kolben von 200 ccm Inhalt ein und stellte diesen kurz vor Beginn der Messung in Eis. Das Pyrogallol wurde dann mit dem gekühlten Inhalt des Meßkolbens übergossen und durch Umschütteln rasch in Lösung gebracht. Dazu kam unter Umschütteln die Hämin-Basen-Lösung. Das Ganze blieb genau 15 Min. (gerechnet vom Zeitpunkt des Katalysator-Zusatzes) in Eis stehen. Die gelbe Mischung wurde in 20 ccm 10-proz. Schwefelsäure gegossen und sofort 3-mal ausgeäthert, so daß das Gesamtvolume des Auszugs etwa 50 ccm betrug. Die Äther-Lösung wurde colorimetrisch bestimmt gegen eine Standardlösung, die 10 mg Purpurogallin in 11 Äther enthielt.

Für die Lösung von Puffer und Pyrogallol fanden wir elektrometrisch  $p_H = 6.06$ .

#### Messung der Oxydation von Cystein.

Die Messung wurde in der bekannten Weise mit Barcroft-Warburg-Manometern ausgeführt. Außer dem Gefäß für den Blindversuch haben wir stets mindestens 2 Tröge nebeneinander verwendet. Sie enthielten: 1) 5 mg Cystein-Chlorhydrat, 2 ccm  $m/10$ -Phosphat-Puffer ( $Na_2HPO_4 : KH_2PO_4 = 1 : 3$ ); 2) Dasselbe + 0.2 ccm der Hämin-Basen-Lösung, wie sie für die Katalase-Messung benutzt wurde (0.1 mg Hämin).

$p_H$  betrug ohne Basen-Zusatz 5.87, mit 1-Äthyl-2-methyl-imidazol 6.27. Wir haben also stets eine schwach saure Lösung verwendet; in alkalischer Lösung wird die Eigen-oxydation des Cysteins zu stark, da man die Puffer-substanzen nicht ganz von Schwermetall-Spuren befreien kann.

#### 4(5)-Phenyl-imidazol-sulfonsäure.

Diese Substanz war bisher noch nicht dargestellt worden. Wir benötigten sie, weil 4(5)-Phenyl-imidazol in Wasser zu wenig löslich ist. 2 g 4(5)-Phenyl-imidazol<sup>8)</sup> wurden unter Eiskühlung allmählich in 8 g rauchende Schwefelsäure (8–10 %  $SO_3$ ) eingetragen. Das Gemisch erhitzte man 15 Min. auf dem Wasserbade. Nach dem Abkühlen wurde es auf Eis gegossen. Der ausgefallene Krystallbrei (Rohausbeute 2.3 g) wurde abgesaugt und aus Wasser unter Zusatz von Tierkohle umkrystallisiert. Farblose Blättchen, schwer

<sup>7)</sup> R. Kuhn u. L. Brann, 1. c.

<sup>8)</sup> R. L. Grant u. F. L. Pyman, Journ. chem. Soc. London 119, 1893 [1921].

löslich in kaltem Wasser, bei 300° noch nicht geschmolzen. Zur Analyse wurde im Vakuum bei 100° getrocknet.

6.42 mg Sbst.: 7.20 ccm N (23°, 757 mm).

$C_9H_8O_3N_2S$ . Ber. N 12.50. Gef. N 12.57.

Die Sulfogruppe steht sicher im Benzolkern, da Imidazol-sulfonsäuren sich erst unter schärferen Bedingungen bilden<sup>9</sup>).

1-Äthyl-2-methyl-imidazol<sup>10</sup>) ließ sich bequemer als nach den älteren Verfahren durch katalytische Hydrierung von 1-Äthyl-2-methyl-4-chlor-imidazol nach der Methode von Busch und Stöve<sup>11</sup>) gewinnen. Die Hydrierung dauerte einige Tage.

**347. H. Staudinger: Über hochpolymere Verbindungen, 72. Mitteil.<sup>1)</sup>: Zur Temperatur-Abhängigkeit der Viscosität von Cellulose-Lösungen.**

[Aus d. Chem. Universitäts-Laborat., Freiburg i. Br.]

(Eingegangen am 18. Oktober 1932.)

Über dieses Thema veröffentlichten K. Hess und B. Rabinowitsch<sup>2)</sup> eine Arbeit, in der sie folgendes sagen: „Späteren Mitteilungen von Staudinger<sup>3)</sup> muß man entnehmen, daß er bereits auch über Erfahrungen an Lösungen von Poly-styrol und Cellulose-acetat verfügt, die der Annahme einer Temperatur-Unabhängigkeit widersprechen. Aus einer Untersuchung von K. H. Meyer und H. Mark<sup>4)</sup> geht schließlich hervor, daß Cellit-Lösungen keineswegs eine von der Temperatur unabhängige spezif. Viscosität zeigen. Das Messungs-Ergebnis dieser Forscher ist bei den letzten Arbeiten Staudingers ebenso unberücksichtigt geblieben wie seine eigenen, z. B. Tabelle 340, S. 472 seines Buches zu entnehmenden Befunde.“ Zu der zitierten Arbeit von K. H. Meyer und H. Mark habe ich schon früher folgendermaßen Stellung genommen<sup>5)</sup>: „Es ist nicht einzusehen, was die 3 von K. H. Meyer und H. Mark angeführten Viscositäts-Messungen Neues zeigen sollen, vor allem, da zwei dieser Messungen an hochviscosen Gellösungen ausgeführt sind. In meinen Arbeiten finden sich hunderte von Viscositäts-Messungen unter den verschiedensten Bedingungen, und es ist ausgeführt, wie man bei jedem Stoff im Zusammenhang mit anderen Untersuchungen daraus Rückschlüsse auf den Bau der Kolloidteilchen ziehen kann.“

Was das sonstige Beweismaterial der Autoren gegen die von mir gefundenen Viscositäts-Gesetze betrifft, so ist es im Grunde zwecklos, mit Autoren zu diskutieren, die experimentell begründete Auffassungen nicht

<sup>9)</sup> F. L. Pyman u. L. A. Raval, Journ. chem. Soc. London 117, 1430 [1920].

<sup>10)</sup> O. Wallach, A. 214, 298 [1882].

<sup>11)</sup> M. Busch u. H. Stöve, B. 49, 1063 [1916].

<sup>1)</sup> 71. Mitteil.: E. Sauter, Röntgenometrische Untersuchungen an hochmolekularen Poly-oxymethylenen, Ztschr. physikal. Chem. (B) 18, 417 [1932].

<sup>2)</sup> K. Hess u. B. Rabinowitsch, B. 65, 1408, Absatz 2 [1932].

<sup>3)</sup> H. Staudinger, Die hochmolekularen organischen Verbindungen, Kautschuk und Cellulose (Verlag Springer, 1932), S. 170 u. 472.

<sup>4)</sup> K. H. Meyer u. H. Mark, B. 64, 2002 [1931].

<sup>5)</sup> H. Staudinger, B. 64, 2723, Absatz 2 [1931].