

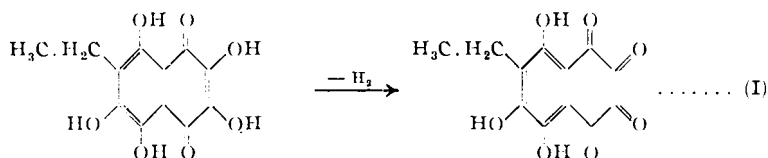
Vergleichs-Substanzen.

Das 1.2.3.4-Tetraketo-tetrahydronaphthalin wurde nach Th. Zincke und A. Ossenbeck¹⁰⁾ dargestellt und durch Krystallisation aus verd. Salpetersäure als Hydrat erhalten. Die Darstellung des 2-Methylnaphthodichinons-(1.4.5.8) werden K. Wallenfels und A. Gauhe beschreiben.

58. Kurt Wallenfels und Adeline Gauhe: Über die Dehydrierung von Echinochrom und anderen 2.3-Dioxy-naphthochinonen durch Peroxydase und Wasserstoffperoxyd.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizin. Forschung, Heidelberg, Institut für Biologie.]
(Eingegangen am 12. März 1942.)

Echinochrom, das tiefrot ist, läßt sich durch verschiedene Oxydationsmittel, z. B. Unterchlorige Säure oder Silberoxyd, glatt zu dem um zwei Wasserstoffatome ärmeren, gelben Dehydro-echinochrom dehydrieren. In derselben Weise wie Echinochrom verhalten sich 2.3-Dioxy-naphthazarin und 2.3-Dioxy-naphthochinon-(1.4) (Isonaphthazarin). Das Dehydrierungsprodukt ist nach R. Kuhn und K. Wallenfels¹⁾ ein Diorthochinon bzw. 1.2.3.4-Tetraketo-tetrahydronaphthalin. Schema I stellt die Reaktion für Echinochrom dar.



Wie wir gefunden haben, läßt sich diese Reaktion auch fermentativ durchführen. Verdünntes Wasserstoffperoxyd allein verändert eine wäßr. Lösung von Echinochrom nicht. Fügt man jedoch bei pH 4–5 ein wenig Peroxydase-Lösung aus Meerrettich hinzu, so beobachtet man eine starke Aufhellung der Farbe, und bald ist die ursprünglich dunkelrote Lösung hellgelb geworden. Die für Echinochrom charakteristischen Absorptionsbanden sind vollständig verschwunden. Leitet man in die gelbe Lösung nun Schwefelwasserstoff, so verwandelt sich der gelbe Farbstoff wieder in den ursprünglichen roten zurück. Der zurückgebildete rote Farbstoff läßt sich mit Äther extrahieren. Die äther. Lösung zeigt am Löwe-Schumm-Spektroskop die Absorptionsbanden von Echinochrom (530 und 500–490 $\text{m}\mu$). Die colorimetrische Bestimmung des Echinochromgehalts ergibt, daß Dehydrierung und Hydrierung quantitativ verlaufen.

Einfluß der Wasserstoff-Ionen-Konzentration.

Um die Geschwindigkeit der Dehydrierung bei verschiedenen pH -Werten zu ermitteln, wurden in einer Cuvette 1 ccm einer 0.004-proz. Echinochrom-Lösung (Auflösen in wenig Alkohol, Verdünnen mit Wasser) mit 1 ccm

¹⁰⁾ A. 307, 1 [1899].

¹⁾ R. Kuhn u. K. Wallenfels, B. 75, 407 [1942].

0.04-n. Acetatpufferlösung und 1 ccm 0.0016-proz. H_2O_2 -Lösung vermischt. Nach Zugabe von 1 ccm Peroxydaselösung (enthaltend etwa 0.00015 Per-

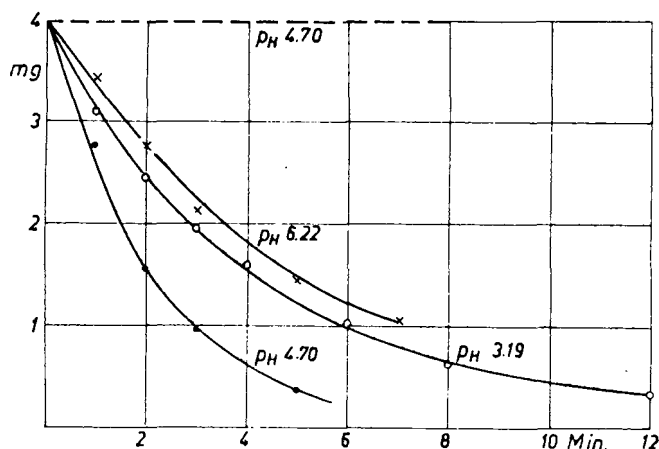


Abbildung 1. Veränderung der Lichtabsorption von Echinochrom in Gegenwart von Peroxydase bei verschiedenem pH . Ordinate: mg Echinochrom in 100 ccm Lösung; Abszisse: Zeit in Min. nach dem Zufügen der Peroxydase.
----- Echinochrom + H_2O_2 ohne Peroxydase.

oxydase-Einheiten) wurde im Stufenphotometer die Abnahme der Extinktion bei 470 $\text{m}\mu$ gegenüber einer Vergleichslösung ohne Peroxydase bestimmt.

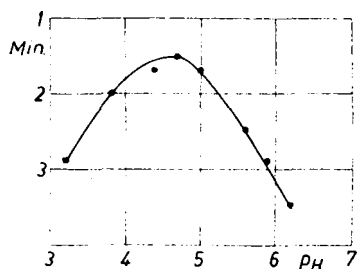


Abbildung 2. Geschwindigkeit der Dehydrierung von Echinochrom durch Peroxydase. Ordinate: Halbwertszeit in Min.; Abszisse: pH -Wert.

Die Abbild. 1 zeigt den zeitlichen Verlauf der Dehydrierung von Echinochrom bei verschiedenen pH -Werten und die Konstanz des Farbwertes ohne Zufügen von Peroxydase.

Bei schwach saurer Reaktion (pH 4.7) verläuft die Reaktion am schnellsten. Die Abbild. 2 zeigt die Zeit in Min., nach welcher die Hälfte des Echinochroms bei verschiedenem pH dehydriert war.

Das pH -Optimum der peroxydatischen Dehydrierung ist bei den verschiedenen Substraten des Fermentes verschieden. Für Kresol, Hydrochinon und Guajacol liegt es im sauren Bereich, für Pyrogallol im schwach alkalischen (Tafel 1).

Tafel 1.

Substrat	Kresol	Guajacol	Hydrochinon	Leukomalachitgrün	Pyrogallol	Echinochrom
pH -Optimum	5.2 ²⁾	5.2 ²⁾	5.0 ³⁾	4.0 ⁴⁾	7.8 ⁵⁾	4.7

²⁾ H. Ucko u. H. Bansi, Ztschr. physiol. Chem. **159**, 235 [1926].

³⁾ B. B. Dey u. Sitharaman, Journ. Indian. chem. Soc. **9**, 499 [1932].

⁴⁾ R. Willstätter u. A. Weber, A. **449**, 156 [1926].

⁵⁾ R. W. Getchell u. S. Walton, Journ. biol. Chem. **91**, 419 [1931].

Einfluß der Wasserstoffperoxyd-Konzentration.

A. Bach⁶⁾ zeigte schon vor vielen Jahren, daß sich die Einwirkung von Peroxydase auf Jodwasserstoffsäure durch überschüssiges H_2O_2 hemmen läßt. Er nahm an, daß das Enzym irreversibel zerstört wird. Willstätter und Weber⁴⁾ untersuchten die Dehydrierung von Leukomalachitgrün und fanden, daß nur bei sehr hoher Wasserstoffperoxyd-Konzentration das Ferment irreversibel zerstört wird, während sich die Hemmung durch mittlere H_2O_2 -Konzentrationen durch teilweise Zerstörung des überschüssigen Hydroperoxyds oder durch Erhöhung der Substratkonzentration wieder aufheben läßt. Sie nahmen an, daß das Wasserstoffperoxyd sich in zwei verschiedenen Formen an die Peroxydase addieren kann (I und II).

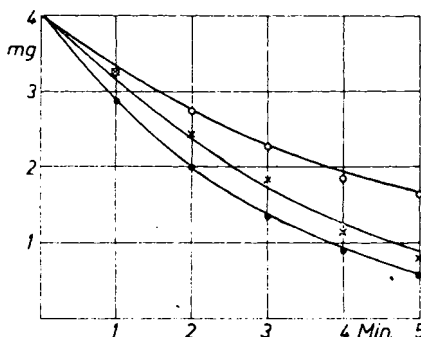


I.



II.

Die beiden Additionsprodukte sollen verschiedene Oxydationspotentiale besitzen. P. J. G. Mann⁷⁾, der die H_2O_2 -Hemmung bei der Guajacol-Oxydation untersucht hat, nimmt an, daß sich zunächst ein ternäres Anlagerungsprodukt Peroxydase- H_2O_2 -Substrat bildet. In diesem haftet das Substrat an zwei aktiven Stellen der Peroxydase. Bei hoher H_2O_2 -Konzentration besetzt dieses auch die Haftstellen des Substrats, so daß dieses nicht mehr addiert werden kann. Diese Annahme erklärt besser die Tatsache, daß sich die Hemmung durch H_2O_2 durch Erhöhung der Substratkonzentration aufheben läßt. Auch die Dehydrierung von Echinochrom wird durch Erhöhung der Wasserstoffperoxyd-Konzentration gehemmt. In den Kurven der Abbild. 3 ist der zeitliche Verlauf der Echinochrom-



Abbild. 3. Dehydrierung von Echinochrom durch Peroxydase in Gegenwart von H_2O_2 . Ordinate: mg Echinochrom in 100 ccm Lösung; Abszisse: Zeit in Min. nach Zugabe der Peroxydase.

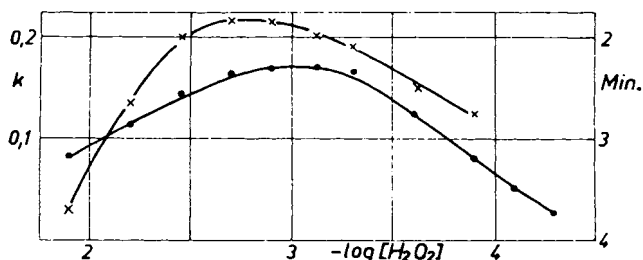
$\circ \quad \circ \quad \circ \quad \circ$ $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1.25 \times 10^{-2}$ molar im Ansatz
 $\times \quad \times \quad \times \quad \times$ 1.00×10^{-3} „
 $\cdot \quad \cdot \quad \cdot \quad \cdot$ 3.00×10^{-3} „
 Echinochrom-Konzentration: 1.5×10^{-4} „

⁶⁾ B. 37, 3785 [1904].

⁷⁾ Biochem. Journ. 25, 918 [1931].

Dehydrierung bei optimalem p_H (4.7) und verschiedener H_2O_2 -Konzentration dargestellt.

Abbild. 4 zeigt die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der H_2O_2 -Konzentration. Bei gleichmolarer Konzentration von Echinochrom und Wasserstoffperoxyd ist die Reaktionsgeschwindigkeit nicht maximal.



Abbild. 4. Dehydrierung von Echinochrom durch Peroxydase in Gegenwart von H_2O_2 . Ordinate links: Durchschnitt der Reaktionskonstanten ($\bullet \cdots \bullet$); rechts: Zeit in Min., in der die Hälfte des eingesetzten Echinochroms umgesetzt ist ($\times \cdots \times$); Abszisse: negativer Log der H_2O_2 -Konzentration.

Dies wird erst bei einer Konzentration von etwa 10 Mol. H_2O_2 je Mol. Echinochrom erreicht. Die Affinität der Peroxydase zum Echinochrom scheint demnach viel größer zu sein als zum Wasserstoffperoxyd.

Die Reaktionsordnung.

Die Geschwindigkeitskonstante einer Reaktion 1. Ordnung wird nach der Gleichung berechnet:

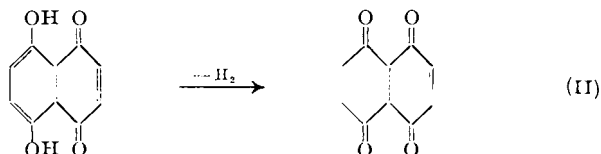
$$k = \frac{1}{t} \cdot \log \frac{a}{a-x} \quad (1)$$

Hierin bedeuten t die Zeit in Min., a in unserem Falle die Echinochrom-Anfangskonzentration, $a-x$ die Echinochrom-Konzentration zur Zeit t . Die Tafeln des Versuchsteils zeigen, daß sowohl für die verschiedenen p_H -Werte als auch für die verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen bis zum Ende der Dehydrierung Gleichung (1) erfüllt ist. Man kann also annehmen, daß die Dehydrierung von Echinochrom mit H_2O_2 und Peroxydase eine Reaktion 1. Ordnung ist. Wir nehmen an, daß die Verschiebung des Wasserstoffs vom Substrat zum H_2O_2 diese, die Geschwindigkeit bestimmende Reaktion ist, während die Bildung der ternären Additionsverbindung und der Zerfall nach der Verschiebung des Wasserstoffs in Peroxydase, Dehydro-echinochrom und Wasser mit unmeßbar großer Geschwindigkeit erfolgen.

Andere Oxynaphthochinone.

Naphthazarin läßt sich mit Bleitetraacetat nach dem Schema II zur nahezu farblosen Dichinon dehydrieren⁸⁾. Diese Reaktion läßt sich mit Peroxydase und H_2O_2 nicht durchführen.

⁸⁾ K. Zahn u. P. Ochwat, A. 462, 72 [1928]. Über die Darstellung verschiedener substituierter Naphthodichinone werden wir noch berichten.



Für den Übergang Naphthazarin \rightarrow Naphthodichinon ist das Redoxpotential von Dimroth und Hellmuth⁹⁾ gemessen worden. Es liegt um 0.257 Volt positiver als das von *p*-Benzochinon, d. h. E_0 ist bei 25° und p_H 0 = 0.970 Volt. Man könnte daran denken, daß das Oxydationspotential von H_2O_2 und Peroxydase hierfür nicht ausreichend ist. Wie Balls und Hale¹⁰⁾ festgestellt haben, werden jedoch noch *o*- und *p*-Kresol und Vanillin von Peroxydase und Wasserstoffperoxyd oxydiert. Das Oxydationspotential dieser Verbindungen liegt, wie Fieser¹¹⁾ festgestellt hat, bei etwa 1.1 Volt.

Wir haben eine Reihe weiterer Oxynaphthochinone auf ihre Oxydierbarkeit mit H_2O_2 und Peroxydase untersucht. Das Ergebnis dieser Versuche ist in Tafel 2 dargestellt.

Tafel 2.

Substanz	Einwirkung von Peroxydase und H_2O_2 bei p_H 4.7
2-Oxy-naphthochinon-(1.4)	0
5-Oxy-naphthochinon-(1.4)	0
2.3-Dioxy-naphthochinon-(1.4)	+
5.8-Dioxy-naphthochinon-(1.4)	0
5.8-Dioxy-2-methyl-naphthochinon-(1.4)	0
2.5.8-Trioxy-naphthochinon-(1.4)	0
2.5.8-Trioxy-3-methyl-naphthochinon-(1.4)	0
2.5.8-Trioxy-6- oder 7-methyl-naphthochinon-(1.4) ¹²⁾ ...	0
2.5.8-Trioxy-3-äthyl-naphthochinon-(1.4) ¹³⁾	0
2.3.5.8-Tetraoxy-naphthochinon-(1.4)	+
2.5.6- oder 7.8-Tetraoxy-naphthochinon-(1.4) ¹⁴⁾	0
2.5.6- oder 7.8-Tetraoxy-3-äthyl-naphthochinon-(1.4) ¹⁵⁾ .	0
2.3.5.6.8-Pentaoxy-7-äthyl-naphthochinon-(1.4) ¹⁶⁾	+
2.3.5.6.8-Pentaoxy-7-acetyl-naphthochinon-(1.4) ¹⁶⁾	+
Spinochrom A ¹⁶⁾	+
Spinochrom P ¹⁶⁾	0

+ bedeutet, daß auf Zusatz von H_2O_2 und Peroxydase Entfärbung eintritt. Durch H_2S wird der ursprüngliche Farbstoff regeneriert. 0 bedeutet, daß keine Veränderung stattfindet.

Aus der Tafel 2 scheint uns hervorzugehen, daß die wesentliche Bedingung für die Dehydrierbarkeit mit Peroxydase und H_2O_2 nicht ein entsprechendes Redoxpotential, sondern eine bestimmte Anordnung der Hydroxylgruppen ist. Nur diejenigen Oxynaphthochinone werden de-

⁹⁾ O. Dimroth, Angew. Chem. **46**, 571 [1933]; R. Hellmuth, Dissertat. Würzburg 1930 (D 20).

¹⁰⁾ A. K. Balls u. W. S. Hale, Journ. biol. Chem. **107**, 767 [1934].

¹¹⁾ L. F. Fieser, Journ. Amer. chem. Soc. **52**, 5204 [1930].

¹²⁾ Schmp. 175°; über die Synthese dieser Verbindung werden wir noch berichten.

¹³⁾ Schmp. 185°, K. Wallenfels, unveröffentlicht.

¹⁴⁾ Schmp. 236—238°, K. Wallenfels u. A. Gauhe, unveröffentlicht.

¹⁵⁾ Schmp. 192°, K. Wallenfels, unveröffentlicht.

¹⁶⁾ Farbstoffe natürlicher Herkunft.

hydriert, die zwei Hydroxylgruppen in 2- und 3-Stellung besitzen. Damit haben wir ein einfaches Mittel der Konstitutionsforschung in der Hand. So unterscheiden sich z. B. die beiden Stachelfarbstoffe der Seeigel *Arbacia pustulosa* und *Paracentrotus lividus* eindeutig dadurch, daß der erste sogleich entfärbt wird und durch H_2S wieder zurückgehalten werden kann, während der letzte nicht entfärbbar ist.

Beschreibung der Versuche.

1) Dehydrierung und Wiedergewinnung durch H_2S -Reduktion.

2 ccm Echinochrom-Lösung (16 mg in 100 ccm Wasser) werden in einer Cuvette mit 2 ccm 0.04-n. Acetattpufferlösung von pH 4.7 und 2 ccm H_2O_2 (2×10^{-4} molar) vermischt. Nach Zufügen von 2 ccm einer sehr verd. Peroxydase-Lösung wird im Stufenphotometer die Zunahme der Lichtdurchlässigkeit verfolgt. Filter S 47, Temperatur: 19^0 .

Zeit (Min.)	E	mg Echinochrom je 100 ccm	Zeit (Min.)	E	mg Echinochrom je 100 ccm
0.5	0.205	3.83	4.5	0.618	1.38
1	0.274	3.42	5	0.644	1.23
1.5	0.328	2.89	6	0.717	0.80
2	0.398	2.68	7	0.738	0.67
2.5	0.445	2.40	8	0.770	0.48
3	0.495	2.11	9	0.810	0.24
3.5	0.552	1.77	10	0.830	0.18
4	0.588	1.56	15	0.830	0.18

Der erhaltene Endwert rührt von der blaßgelben Farbe des Dehydroechinochroms her. Es sind also am Schluß nicht 0.18 mg Echinochrom/100 ccm vorhanden, sondern 0.0. Dies läßt sich leicht durch Ätherextraktion feststellen.

Nachdem am Stufenphotometer Konstanz des Farbwertes erreicht war, wurde noch weitere 5 Min. abgewartet und dann Schwefelwasserstoff in die Lösung geleitet. Nach kurzer Zeit begann langsam Rotfärbung. Es wurde noch einige Minuten stehengelassen und dann der rote Farbstoff mit 5 ccm Äther extrahiert. Diese Lösung a zeigte am Löwe-Schumm-Spektroskop die Absorptionsbanden 530 und 500—490 $m\mu$, die mit denen von Echinochrom übereinstimmten. Es wurde nun ein Kontrollansatz, bestehend aus 2 ccm derselben Echinochromlösung, 2 ccm Acetattpuffer und 2 ccm H_2O_2 -Lösung und 2 ccm Wasser, bereitet. Die Farbe änderte sich nicht im Verlauf von $\frac{1}{2}$ Stde. Die Lösung wurde dann ebenfalls mit 5 ccm Äther extrahiert. Die Ätherlösung b hatte die Echinochrombanden und wurde im Stufenphotometer mit der Lösung a des durch Schwefelwasserstoff reduzierten Dehydrierungsansatzes verglichen. Die Lösungen a und b hatten praktisch die gleiche Farbstärke ($\pm 1\%$). Die Durchlässigkeit war 99%. Die Oxydation zum Dehydroechinochrom und die Zurückhydrierung zum Echinochrom gehen also ohne Verlust an Substanz vor sich.

2) Bestimmung der Fermentaktivität.

Um die Aktivität des für die Messungen benutzten Peroxydasepräparates zu bestimmen, wurde nach R. Willstätter und A. Stoll¹⁷⁾ die Purpurgallinbildung aus Pyrogallol colorimetrisch gemessen. Die erste Alkohol-

¹⁷⁾ A. 416, 21 [1928].

fällung der Peroxydase aus Meerrettich wurde für die Untersuchungen benutzt. Die Ausgangslösung mußte für die Echinochromversuche noch auf das 250-fache verdünnt werden. Von dieser Lösung wurden 5 ccm zu einer Lösung von 0.5 g Pyrogallol und 5 mg H_2O_2 bei 20° zugegeben. Nach 5 Min. wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 ccm 2-n. Schwefelsäure beendet. Das gebildete Purpurogallin wurde mit Äther extrahiert und im Stufenphotometer bestimmt.

5 ccm Peroxydase (1:250), $E = 0.177$ entsprechen 0.735 mg Purpurogallin; 1 ccm Peroxydaselösung bildet in 5 Min. 0.147 mg Purpurogallin und enthält also 0.000147 Peroxydase-Einheiten.

3) Bestimmung des p_H -Optimums.

Zur Bestimmung der Aktivität bei verschiedenem p_H wurde 1 ccm Echinochrom-Lösung der Konzentration 1.5×10^{-4} mit 1 ccm 0.04-n. Acetatpuffer und 1 ccm H_2O_2 -Lösung der Konzentration 1.17×10^{-4} mit 1 ccm der verd. (1:250) Peroxydaselösung vermischt.

	Min. nach Zugabe der d. Peroxydase	E	mg Echinochrom in 100 ccm	% Umsatz	k
p_H 3.19	0	0.165	4.0	0	
	1	0.319	3.12	22.0	0.108
	1.5	0.382	2.76	31.0	0.107
	2	0.434	2.46	38.5	0.106
	2.5	0.492	2.13	46.8	0.107
	3	0.526	1.94	51.5	0.105
	3.5	0.552	1.78	55.2	0.101
	4	0.583	1.61	59.5	0.099
	4.5	0.616	1.42	64.2	0.100
	5	0.638	1.29	67.5	0.098
	5.5	0.662	1.16	71.0	0.098
	6	0.686	1.02	74.5	0.099
	6.5	0.699	0.94	76.2	0.097
	7	0.717	0.83	79.0	0.098
p_H 3.8	7.5	0.742	0.69	82.9	0.102
	8	0.750	0.65	83.5	0.099
	9	0.780	0.48	88.0	0.102
	11	0.801	0.36	91.0	0.095
	12	0.804	0.34	91.5	0.090
p_H 4.4	1	0.377	2.81	29.9	0.154
	1.5	0.441	2.46	38.6	0.141
	2	0.520	2.01	49.9	0.149
	2.5	0.585	1.65	48.7	0.154
	3	0.654	1.25	68.8	0.168
	3.5	0.690	1.06	73.4	0.165
p_H 4.4	4	0.717	0.90	77.4	0.151
	1.5	0.469	2.26	43.6	0.165
	2	0.547	1.80	55.0	0.173
	2.5	0.616	1.04	65.0	0.181
	3	0.690	0.97	75.8	0.205
	3.5	0.717	0.80	80.0	0.199
p_H 4.4	4	0.762	0.54	86.4	0.217
	5	0.788	0.39	90.6	0.222

	Min. nach Zugabe der Peroxydase	E	mg Echinochrom in 100 ccm	% Umsatz	k
pH 4.7	1.5	0.509	2.02	49.5	0.198
	2	0.582	1.56	61.2	0.204
	2.5	0.650	1.19	72.7	0.213
	3	0.682	0.97	75.8	0.212
	3.5	0.724	0.75	81.2	0.213
	4	0.740	0.66	83.6	0.195
	5	0.793	0.35	91.3	0.216
pH 5.0	1.5	0.458	2.22	44.5	0.184
	2	0.552	1.73	56.8	0.184
	2.5	0.602	1.46	63.4	0.175
	3	0.658	1.17	70.7	0.180
	3.5	0.706	0.92	76.8	0.182
	4	0.728	0.80	80.0	0.175
	4.5	0.757	0.64	84.0	0.177
	5	0.770	0.58	85.5	0.166
pH 5.6	1.5	0.345	2.79	30.2	0.104
	2	0.424	2.37	40.7	0.114
	2.5	0.497	1.98	50.6	0.121
	3	0.545	1.72	57.2	0.122
	3.5	0.580	1.54	61.4	0.119
	4	0.623	1.31	67.2	0.112
	4.5	0.652	1.15	71.3	0.120
	5	0.676	1.02	74.4	0.119
	5.5	0.684	0.98	75.7	0.111
	6	0.701	0.89	77.6	0.109
pH 5.9	1.5	0.280	2.90	27.4	0.093
	2	0.352	2.57	35.7	0.096
	2.5	0.409	2.29	42.8	0.097
	3	0.480	1.95	50.6	0.104
	3.5	0.523	1.74	56.7	0.103
	4	0.569	1.51	62.3	0.105
	4.5	0.595	1.38	65.3	0.103
	5	0.623	1.25	68.8	0.101
	5.5	0.638	1.17	70.7	0.097
	6	0.678	0.97	75.8	0.102
	6.5	0.699	0.87	78.1	0.102
	7	0.714	0.80	80.0	0.100
	8	0.733	0.68	83.0	0.096
pH 6.22	1.5	0.222	3.01	24.7	0.062
	2	0.284	2.74	31.5	0.082
	2.5	0.352	2.42	39.6	0.086
	3	0.418	2.13	46.8	0.091
	3.5	0.458	1.94	51.5	0.088
	4	0.492	1.79	55.4	0.082
	4.5	0.535	1.60	60.0	0.088
	5	0.569	1.44	64.0	0.089
	5.5	0.595	1.33	66.8	0.087
	6	0.635	1.14	71.7	0.091
	6.5	0.642	1.11	72.5	0.086
	7	0.658	1.04	74.2	0.089

Aus den angegebenen k-Werten errechnen sich folgende Durchschnittswerte:

pH	3.19	3.80	4.40	4.70	5.00	5.60	5.90	6.22
k	0.100	0.155	0.195	0.213	0.178	0.115	0.100	0.085

4) Wasserstoffperoxyd-Konzentration bei p_H 4.7, $-\log [\text{Ech.}] = 3.82$

t	E	mg Echinochrom	% Umsatz	k
$-\log [\text{H}_2\text{O}_2] = 1.9$				
1.5	0.339	3.03	24.3	0.080
2	0.388	2.74	31.5	0.082
2.5	0.431	2.49	37.8	0.082
3	0.468	2.28	43.6	0.081
3.5	0.502	2.07	48.2	0.082
4	0.522	1.84	54.1	0.084
4.5	0.549	1.78	55.5	0.078
5	0.569	1.67	58.2	0.076
5.5	0.595	1.52	62.0	0.076
6	0.604	1.46	63.4	0.073

$-\log [\text{H}_2\text{O}_2] = 2.2$				
1.5	0.392	2.71	32.4	0.112
2	0.462	2.30	42.6	0.120
2.5	0.499	2.08	48.7	0.114
3	0.544	1.82	54.5	0.114
3.5	0.578	1.61	59.7	0.113
4	0.613	1.41	64.8	0.113
4.5	0.634	1.28	68.2	0.110
5	0.658	1.14	71.8	0.109

$-\log [\text{H}_2\text{O}_2] = 2.45$				
1.5	0.444	2.41	39.8	0.147
2	0.508	2.03	49.3	0.147
2.5	0.565	1.69	57.9	0.150
3	0.588	1.54	61.4	0.138
3.5	0.631	1.27	68.4	0.142
4	0.676	1.04	74.2	0.146
4.5	0.682	0.99	75.3	0.135
5	0.712	0.82	79.5	0.138
5.5	0.726	0.74	81.6	0.133
6	0.760	0.55	86.3	0.144

$-\log [\text{H}_2\text{O}_2] = 2.7$				
1.5	0.469	2.26	43.5	0.165
2	0.514	1.99	50.2	0.151
2.5	0.585	1.57	60.5	0.162
3	0.623	1.35	66.3	0.157
3.5	0.678	1.02	74.5	0.168
4	0.699	0.89	77.9	0.163
4.5	0.733	0.70	82.5	0.168
5	0.750	0.60	85.0	0.165
5.5	0.772	0.47	88.2	0.175
6	0.791	0.37	90.7	0.172

t	E	mg Echinochrom	% Umsatz	k
- log [H ₂ O ₂] = 2.9				
1.5	0.446	2.40	40.0	0.148
2	0.537	1.86	53.4	0.171
2.5	0.588	1.56	61.1	0.164
3	0.637	1.26	68.3	0.167
3.5	0.678	1.02	74.7	0.170
4	0.717	0.80	80.0	0.174
4.5	0.745	0.62	84.4	0.180
5	0.765	0.52	87.3	0.177
5.5	0.770	0.49	87.8	0.166
6	0.791	0.37	90.6	0.172
- log [H ₂ O ₂] = 3.12				
1.5	0.431	2.50	37.5	0.136
2	0.517	1.98	50.5	0.152
2.5	0.576	1.63	59.4	0.157
3	0.650	1.19	70.3	0.177
3.5	0.703	0.87	78.4	0.189
4	0.726	0.74	81.5	0.183
4.5	0.742	0.63	84.2	0.179
5	0.767	0.51	87.1	0.179
5.5	0.770	0.49	87.8	0.166
6	0.791	0.37	90.6	0.172
- log [H ₂ O ₂] = 3.3.				
1.5	0.446	2.40	40.0	0.148
2	0.502	2.07	48.3	0.143
2.5	0.567	1.68	58.1	0.152
3	0.629	1.31	67.2	0.162
3.5	0.682	0.99	75.7	0.175
4	0.710	0.84	79.2	0.169
4.5	0.752	0.59	85.4	0.185
5	0.772	0.47	88.2	0.186
- log [H ₂ O ₂] = 3.6				
1.5	0.378	2.80	30.0	0.103
2	0.441	2.43	39.4	0.108
2.5	0.522	1.93	51.8	0.126
3	0.550	1.78	55.6	0.117
3.5	0.611	1.42	64.5	0.128
4	0.656	1.16	71.0	0.134
4.5	0.682	0.99	75.5	0.135
5	0.721	0.77	80.6	0.143
- log [H ₂ O ₂] = 3.9				
1.5	0.317	3.16	21.0	0.069
2	0.365	2.88	28.4	0.071
2.5	0.408	2.62	34.7	0.074
3	0.438	2.45	38.8	0.069
3.5	0.495	2.01	49.7	0.085
4	0.523	1.94	51.5	0.079
4.5	0.556	1.75	56.3	0.080
5	0.601	1.48	63.1	0.086
5.5	0.618	1.38	65.6	0.084
6	0.642	1.24	69.3	0.085

t	E	mg Echinochrom	% Umsatz	k
$-\log [\text{H}_2\text{O}_2] = 4.1$				
1.5	0.276	3.40	15.0	0.047
2	0.310	3.21	19.8	0.048
2.5	0.339	3.03	24.3	0.048
3	0.379	2.80	30.0	0.052
3.5	0.408	2.62	34.6	0.052
4	0.432	2.48	38.2	0.052
4.5	0.457	2.32	42.0	0.053
5	0.484	2.17	45.8	0.053
$-\log [\text{H}_2\text{O}_2] = 4.3$				
1.5	0.233	3.66	8.5	0.026
2	0.259	3.50	12.5	0.029
2.5	0.278	3.39	15.3	0.029
3	0.300	3.26	18.5	0.030
4	0.337	3.04	24.0	0.030
5	0.367	2.84	29.0	0.030
6	0.382	2.77	30.7	0.027
7	0.411	2.60	35.0	0.027

Aus den angegebenen k-Werten wurden folgende Durchschnittswerte berechnet:

$-\log [\text{H}_2\text{O}_2]$	1.9	2.2	2.45	2.7	2.9	3.12	3.3	3.6	3.9	4.1	4.3
k	0.081	0.113	0.142	0.162	0.168	0.169	0.165	0.124	0.082	0.051	0.028

Da bei mittlerer H_2O_2 -Konzentration (2.9—3.6) ein langsames Ansteigen der Reaktionskonstante festzustellen ist und wir dieses auf eine Aktivierung des Fermentes während des Versuches zurückführten, wurde bei diesen Konzentrationen mit einem Fermentpräparat höheren Reinheitsgrades erneut gemessen. Nunmehr waren die Reaktionskonstanten auch hier in Übereinstimmung mit Gleichung (1).

t	E	mg Echinochrom	% Umsatz	k
$-\log [\text{H}_2\text{O}_2] = 2.9$				
1.5	0.382	2.77	30.8	0.107
2	0.455	2.35	41.3	0.115
2.5	0.523	1.94	51.4	0.126
3	0.561	1.72	56.9	0.122
3.5	0.597	1.50	62.5	0.121
4	0.620	1.37	65.8	0.117
4.5	0.658	1.14	71.7	0.121
5	0.678	1.02	74.3	0.119
5.5	0.699	0.89	77.9	0.119
6	0.714	0.81	79.6	0.116
6.5	0.726	0.74	81.8	0.113
7	0.735	0.69	82.9	0.109

t	E	mg Echinochrom	% Umsatz	k
$-\log [\text{H}_2\text{O}_2] = 3.3$				
1.5	0.364	2.88	28.0	0.095
2	0.439	2.44	39.0	0.107
2.5	0.494	2.12	47.0	0.110
3	0.547	1.80	55.0	0.116
3.5	0.585	1.57	60.6	0.116
4	0.606	1.45	63.7	0.110
4.5	0.642	1.23	69.3	0.114
5	0.672	1.05	73.8	0.116
5.5	0.693	0.94	76.7	0.114
6	0.701	0.88	78.0	0.110
6.5	0.721	0.77	80.7	0.110
7	0.733	0.70	82.5	0.108

5) Kontrollversuche ohne Peroxydase und mit inaktivierter Peroxydase.

Ansatz: 1 ccm Echinochrom (1.5×10^{-4}), 1 ccm H_2O_2 (1.2×10^{-4}), 1 ccm H_2O

t	E	mg Echinochrom
2	0.173	4.02
4	0.171	4.01
6	0.171	4.01
8	0.171	4.01
10	0.173	4.02
12	0.173	4.02

Ansatz: 1 ccm Echinochrom, 1 ccm H_2O_2 , 1 ccm Peroxydase, die 15 Min. auf 95° erhitzt war.

t	E	mg Echinochrom
2	0.191	3.92
4	0.182	3.97
6	0.185	3.95
8	0.184	3.95
10	0.186	3.94

6) Dehydrierung von 2.3.5.8-Tetraoxy-naphthochinon-(1.4).

Da die Dehydrierung des 2.3-Dioxy-naphthazarins langsamer geht als bei Echinochrom, wurde zur Messung eine Peroxydaselösung höherer Konzentration benutzt.

Ansatz: 2 ccm Dioxynaphthazarin-Lösung (6×10^{-5} molar) 2 ccm Puffer pH 4.7, 2 ccm H_2O_2 (5×10^{-4} molar), 2 ccm Peroxydase (0.000294 P. E.).

t	E	mg Dioxy- naphthazarin	% Umsatz	k
1	0.268	0.750	43.8	0.250
1.5	0.357	0.550	58.8	0.256
2	0.420	0.415	69.0	0.254
2.5	0.444	0.360	73.1	0.224
3	0.469	0.305	77.2	0.218
3.5	0.480	0.280	79.0	0.194
4	0.484	0.275	79.4	0.170