

Für diese Formulierung sprechen neben zahlreichen neuen Analysen die leichte Aufspaltbarkeit der Substanz in Hippursäure und die Reaktion mit Benzaldehyd, die zu dem bekannten 2-Phenyl-4-benzal-oxazolon<sup>1)</sup> führt (Formel III). Die nicht sehr beträchtlichen Abweichungen der früheren Analysen<sup>2)</sup> von den jetzt gefundenen, dürften sich durch die leichte Veränderlichkeit der Substanz erklären; nur frische, nicht bei höherer Temperatur getrocknete Präparate liefern richtige Analysenergebnisse.

C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> N	Ber. C 67,07	H 4,38	N 8,70%
	Gef. „ 66,91; 67,04	„ 4,24; 4,44	„ 8,78%

Das 2-Phenyl-oxazolon ist der Grundkörper der zahlreichen, aus aromatischen Aldehyden und Hippursäure mittels Essigsäure dargestellten 2-Phenyl-4-arylid-oxazolone. Es dürfte sich als reaktionsfähiges Hippursäure-anhydrid zur Einführung des Hippursäurerestes in andere Verbindungen nützlich erweisen.

Die Einwirkung von Diazomethan auf Hippursäurechlorid nimmt somit einen anderen Verlauf als die Reaktionen des Diazomethans mit den meisten anderen Säurechloriden. Diazomethan wirkt hier Chlorwasserstoff-entziehend.

Die Überführung des 2-Phenyl-oxazolons in 2-Phenyl-4-benzal-oxazolon geschieht durch kurzes Erwärmen von 1 Mol der Verbindung mit 1 Mol Benzaldehyd, 1 Mol Natriumacetat und 3 Mol Essigsäure-anhydrid. Nach dem Umkrystallisieren aus Alkohol schmolz das 2-Phenyl-4-benzal-oxazolon bei 165°.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

## 78. Über die enzymatische Oxydation des Carotins

von H. Süllmann.

(14. V. 41.)

Die sogenannte „Carotin-oxydase“<sup>3)</sup> aus Leguminosensamen oxydiert aerob in Gegenwart von ungesättigten Fetten oder Fettsäuren<sup>4) 5) 6)</sup> Carotin und andere Polyene. Das Enzym bewirkt eine peroxydartige Anlagerung von Sauerstoff an die ungesättigten Kohlenstoffbindungen der Fette bzw. Fettsäuren. Die durch Einwirkung des Enzyms auf ungesättigte Fette erhaltenen Fett-

<sup>1)</sup> Erlenmeyer jun. A. **275**, 1 (1893); **337**, 265 (1904); B. **33**, 2036 (1900).

<sup>2)</sup> P. Karrer und Rose Widmer, Helv. **8**, 203 (1925).

<sup>3)</sup> J. B. Sumner und A. L. Dounce, Enzymol. **7**, 130 (1939).

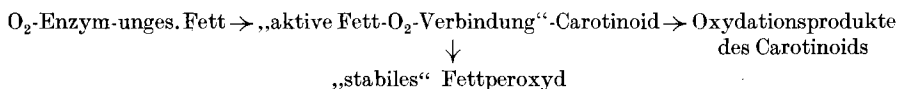
<sup>4)</sup> J. B. Sumner und R. J. Sumner, J. Biol. Chem. **134**, 531 (1940).

<sup>5)</sup> H. Tauber, Am. Soc. **67**, 2251 (1940).

<sup>6)</sup> H. Süllmann, Helv. **24**, 465 (1941).

peroxyde sind ziemlich stabil; für sich — ohne Enzym — verändern sie Carotin nur sehr langsam<sup>1)</sup>. Darum darf angenommen werden, dass die in Gegenwart des Enzyms schnell verlaufende Oxydation des Carotins mittels aktiver Fett-Sauerstoffverbindungen erfolgt, die in die stabileren Fettperoxyde übergehen können.

Schematisch kann der Vorgang etwa folgendermassen dargestellt werden:



In Betracht zu ziehen ist, ob auch eine Bindung des schliesslichen Sauerstoffakzeptors, des Carotinoids, an das Enzym erfolgt. Ferner ist das Schicksal des ungesättigten Fettes bei dieser „gekoppelten Oxydation“<sup>1)</sup> offen gelassen. Hierfür können allgemein folgende Möglichkeiten in Frage kommen:

1. „akt. Fett-O<sub>2</sub>“ + Carotinoid = unges. Fett + Carotinoid-O<sub>2</sub>
  2. „akt. Fett-O<sub>2</sub>“ + Carotinoid = Fett-O + Carotinoid-O.
- (Carotinoid-O<sub>2</sub> und Carotinoid-O = oxydiertes Carotinoid,  
Fett-O = irreversibel oxydiertes ungesättigtes Fett.)

Im ersten Falle übt das ungesättigte Fett (bzw. die ungesättigte Fettsäure) bei der Oxydation des Carotinoids eine echte katalytische Funktion aus, da es unverändert regeneriert wird. Im zweiten Falle unterliegt es selber dem oxydativen Abbau; das Carotinoid induziert seinerseits die (irreversible) Oxydation des Fettes. Ob neben Carotinoiden auch andere Verbindungen als Sauerstoffakzeptoren auftreten können, bleibt zu untersuchen (s. unten). Im Anschluss an Überlegungen über den Mechanismus der Autoxydation ungesättigter Fette ist zu erwägen, dass die „aktive Fett-O<sub>2</sub>-Verbindung“ auch mit noch nicht oxydierten Molekeln des ungesättigten Fettes in Wechselwirkung treten kann.

In einer vorhergehenden Mitteilung<sup>2)</sup> wurde bereits auf Beziehungen hingewiesen, die vermutlich zwischen der „Carotinoxydase“ und einem sowohl in Leguminosen<sup>3)</sup> als auch in tierischen Geweben<sup>4)</sup> nachgewiesenen Enzym, der „Lipoxydase“<sup>3) 4)</sup>, bestehen. Die Lipoxydase oxydiert ungesättigte Fette unter Bildung von Peroxydverbindungen. Demnach dürfte es sich hier um die gleichen Enzyme handeln; es ist jedoch noch nachzuweisen, dass mit Lipoxydasen verschiedener Herkunft auch eine Oxydation von Carotinoiden erreicht werden kann. Die Frage, ob mehrere Enzyme bei den hier betrachteten Vorgängen zusammenwirken, steht ebenfalls noch offen.

<sup>1)</sup> J. B. Sumner und R. J. Sumner, J. Biol. Chem. **134**, 531 (1940).

<sup>2)</sup> H. Süllmann, Helv. **24**, 465 (1941).

<sup>3)</sup> E. André und K. Hou, C. r. **194**, 645 (1932); **195**, 172 (1932).

<sup>4)</sup> C. H. Lea, J. Soc. chem. Ind. **56**, Trans. 376 (1937); Chem. and Ind. **58**, 479 (1939).

Nach den bisherigen Feststellungen kann die Bezeichnung des Enzyms als „Carotin-oxydase“ nur eine vorläufige sein, da das eigentliche Substrat des Enzyms offenbar ungesättigte Fette oder Fettsäuren sind und die Oxydation des Carotins indirekt erfolgt.

Es liegt nahe, anzunehmen, dass dieses Enzym dort, wo es vorkommt, ein Bestandteil des Atmungssystems ist. Das gilt also zunächst für Leguminosensamen. Hier könnte es bei der Keimung von besonderer Bedeutung sein. Die Fähigkeit einiger Mikroorganismen, Peroxydverbindungen von ungesättigten Fetten und Fettsäuren zu bilden, dürfte ebenfalls auf Enzyme von der Art der Lipoxydasen (bzw. Carotin-oxydase) zurückzuführen sein. Der Nachweis von Lipoxydasen in tierischen Geweben lässt an die Wichtigkeit ungesättigter Fettsäuren denken, wie sie in den letzten Jahren für den tierischen Stoffwechsel aufgezeigt wurden.

Das Enzym wurde von uns in anderen Untersuchungen zur Kennzeichnung der Farbgruppe des Schpurpurs verwendet. Die für die chromophore Gruppe des Netzhautfarbstoffes angenommene Natur eines Carotinoids<sup>1)</sup> ist noch nicht sicher erwiesen. Deshalb erscheint uns das Verhalten des Farbstoffes gegenüber dem Enzym von Interesse. Die Ergebnisse sollen später an anderer Stelle mitgeteilt werden.

Im folgenden werden einige Ergebnisse von Versuchen zur allgemeinen Charakterisierung des in wässriger Lösung aus der entfetteten Sojabohne gewonnenen Enzyms wiedergegeben.

### Versuche.

**Methodisches.** Die Gewinnung der Enzymlösungen und die allgemeine Versuchsanordnung entsprach den Angaben von *Sumner* und denen in unserer vorhergehenden Mitteilung. Wir dialysierten die Enzymlösung meist über 12 Stunden im Cellophan-schlauch gegen fließendes Leitungswasser und zentrifugierten vom ausgefallenen Niederschlag ab. Die Versuchslösungen waren in der Regel folgendermassen zusammengesetzt: Carotin, Fett bzw. Fettsäure (in organischen Lösungsmitteln), 100 cm<sup>3</sup> Wasser, 5 cm<sup>3</sup> Phosphatpuffer (p<sub>H</sub> etwa 6,5), 2 cm<sup>3</sup> Enzymlösung. Die Menge des verwendeten organischen Lösungsmittels wurde in den meisten Versuchen gleich gross gehalten (nicht über 5%).

Als organische Lösungsmittel wurden verwendet: Alkohol, Aceton und Dioxan. Letzteres erlaubt besonders die Herstellung relativ konzentrierter Lösungen von Carotin. Als Carotinpräparat gelangte Carotin cryst. (*Hoffmann-La Roche & Co. A.G.*) zur Verwendung.

In der Regel wurde die bis zur vollständigen Entfärbung des Carotins notwendige Zeit bestimmt. Daraus lässt sich ein für die hier vorgelegten Fragen und gezogenen Schlussfolgerungen hinreichend genaues Bild über das Ausmass des Oxydationsvorganges gewinnen. Messungen mit dem Stufenphotometer haben ergeben, dass die Carotinlösungen im vollständigen Versuchsansatz ohne Enzym mit der Zeit eine Abnahme der Lichtabsorption zeigen; sie nahm z. B. in einem Versuch mit 0,5 mg Carotin in 75 Minuten auf 92%, in 195 Minuten auf 85% und in 16 Stunden auf 35% der anfänglichen Extinktion ab. Diese nichtenzymatische Bleichung der Carotinlösungen ist in den meisten Ver-

<sup>1)</sup> *G. Wald, J. Gen. Physiol.* **19**, 351 (1935); **21**, 795 (1938).

suchen mit Entfärbungszeiten von einigen Minuten ohne Bedeutung, bedarf aber der Berücksichtigung bei längeren Versuchszeiten, z. B. in Versuchen mit nichtoptimalen Fett- oder Enzymmengen. Die sich hieraus bei langen Versuchszeiten ergebenden Schwierigkeiten sind teilweise durch passende Wahl der Carotinmenge zu beheben. In bestimmten Versuchsreihen wurden die über 90—120 Minuten hinausgehenden Entfärbungszeiten nicht mehr bewertet, da von hier ab die erwähnten nichtenzymatischen Vorgänge eine wesentliche Rolle spielen könnten.

Versuche zur Ausarbeitung einer photometrischen Methode, die den Entfärbungsvorgang quantitativ zu erfassen gestattet, sind im Gange. Dabei haben sich vorerst noch einige Schwierigkeiten in der Behebung des Einflusses von Trübungen ergeben.

### 1. Dialyse.

Nach der ersten Extraktion (von 5 g entfettetem Sojabohnenpulver mit 200 cm<sup>3</sup> Wasser) lassen sich aus dem Rückstand noch aktive Enzymlösungen gewinnen. Die hier verwendeten Enzymlösungen enthalten also nicht die gesamte in der Sojabohne vorhandene Menge Enzym. Die Dialyse gegen fließendes Wasser wurde bis zu 24 Stunden ausgedehnt. Die dialysierten Enzymlösungen erwiesen sich als ebenso oder doch nahezu ebenso aktiv wie die nicht dialysierten Lösungen. Die folgende Tabelle I enthält hierfür ein Beispiel. Eine Abspaltung eines niedrig-molekularen, für die Enzymwirkung wesentlichen Stoffes erfolgt also durch die einfache Dialyse nicht. Zugleich lässt der aufgeführte Versuch die Wirkung steigender Enzymmengen auf die Entfärbungszeiten erkennen. Mit der geringsten (0,5 cm<sup>3</sup>) und der nächst höheren Enzymmenge (1 cm<sup>3</sup>) ist bei diesem Versuch die Spanne in den Entfärbungszeiten bedeutend höher als dem Unterschied der Enzymmengen entspricht. Diese Verhältnisse können sich jedoch z. B. mit Änderung der Menge des ungesättigten Fettes und des Carotins verschieben.

Tabelle I.

0,8 mg Carotin; 5 mg Leinöl; 4,5 cm<sup>3</sup> Aceton. Dialyse 16 Stunden im Cellophanschlauch gegen fließendes Leitungswasser.

	cm <sup>3</sup> Enzymlösung	Entfärbungszeit Minuten	
		mit undialys. Enzym	mit dial. Enzym.
I.	0,5	40	40
II.	1	9	13
III.	2	3,5	4

### 2. Quantitative Beziehungen zwischen Fett- bzw. Fettsäuremengen und Carotinumsatz.

Um Anhaltspunkte über die hier vorliegenden Beziehungen zu gewinnen, wurden sowohl die Carotin- als auch die Fett- bzw. Fettsäuremengen variiert. Aus Tabelle II ist zu entnehmen, dass mit

2,5 mg Leinöl 1 mg Carotin in 12 Minuten vollständig entfärbt wird, mit 1,25 mg Leinöl die ursprünglich rot-gelbe Lösung nach 90 Minuten noch tief-gelb ist. Diese Lösung zeigte auch nach 240 Minuten noch tief-gelbe Färbung. Hieraus schliessen wir, dass mit einer gegebenen Menge Leinöl nur ein beschränkter Carotinumsatz erzielt wird. Unter den Bedingungen der in Tabelle II aufgeführten Versuche kann die zur vollständigen Entfärbung von 1 mg Carotin eben ausreichende Leinölmenge als zwischen 1,25 und 2,5 mg liegend geschätzt werden.

**Tabelle II.**

Leinöl und Leinölsäure.

2 cm<sup>3</sup> Enzym; 1 mg Carotin (in 1 cm<sup>3</sup> Dioxan); 4 cm<sup>3</sup> Aceton.

	mg Leinöl bzw. Leinölsäure	Entfärbungs- zeit Minuten	Beurteilung nach 90 Min.
A:	Leinöl		
I.	0,5		rot-gelb
II.	1,25		tief-gelb
III.	2,5	12	
IV.	5,0	12	
B:	Leinölsäure		
V.	0,5		rot-gelb
VI.	1,25		rot-gelb
VII.	2,5		tief-gelb
VIII.	5,0		ausgebleicht; n. 45 Min. noch gelb
IX.	10,0	17	
X.	15,0	10	

In mehreren Versuchsreihen zeigte sich übereinstimmend, dass diese „Minimalmengen“ für Leinölsäure nicht unbeträchtlich höher liegen, für 1 mg Carotin etwa bei 5 mg Leinölsäure. Diese Differenz ist nicht auf eine etwaige stärkere Ungesättigtheit des Leinöls zurückzuführen. Die Jodzahl des verwendeten Leinöls ergab sich zu 172, die der Leinölsäure zu 190.

Entsprechende Unterschiede ergeben sich auch zwischen Ricinusöl und Ricinolsäure (Tabelle III und IV), die beide von geringerer Wirkung sind als Leinöl und Leinölsäure. Für Ricinusöl liegt die Minimalmenge zur Bleichung von 1 mg Carotin zwischen 5 und 10 mg, für Ricinolsäure etwa bei 20 mg. Mit den Glyceriden<sup>1)</sup> kann also ein relativ grösserer Carotinumsatz erreicht werden als mit den freien ungesättigten Fettsäuren.

<sup>1)</sup> Die hier verwendeten natürlichen Öle stellen keine reinen Glyceride dar, sondern enthalten Beimengungen, deren Einfluss auf den untersuchten Vorgang unbekannt ist.

**Tabelle III.**

Ricinusöl und Ricinolsäure.

2 cm<sup>3</sup> Enzym; 1 mg Carotin (in 1 cm<sup>3</sup> Dioxan); 4 cm<sup>3</sup> Aceton.

	mg Ricinusöl bzw. Ricinolsäure	Entfärbungs- zeit Minuten	Beurteilung nach 90 Min.
A:	Ricinusöl		
I.	2,5		rötlich-gelb
II.	5		rötlich-gelb
III. <sup>1)</sup>	10	20	
IV. <sup>2)</sup>	20	etwa 25	
B:	Ricinolsäure		
V.	2,5		rot-gelb
VI.	5		rot-gelb
VII.	10		gelb (deutlich aufgehellt)
VIII.	20		fast ausgebleicht

**Tabelle IV.**

Ricinolsäure.

0,5 mg Carotin (in 0,5 cm<sup>3</sup> Dioxan); 4 cm<sup>3</sup> Aceton; 2 cm<sup>3</sup> Enzym.

	mg Ricinol- säure	Entfärbungs- zeit Minuten	Beurteilung nach 90 Minuten
I.	2,5		tief-gelb
II.	5		blass-gelb
III.	10		ausgebleicht
IV.	20	30	

Die Versuche mit Ricinusöl wurden auch deshalb unternommen, weil von *Sumner* und *Dounce*<sup>3)</sup> angegeben wird, dass es von der „Carotin-oxydase“ nicht oxydiert wird. Hieraus würde sich eine auffallende spezifische Einstellung des Enzyms zu den verschiedenen ungesättigten Fetten ergeben. Unsere Versuche, für die sowohl Ricinusöl des Handels (D.A.B. 6) als auch aus Ricinussamen selbst gewonnenes Öl verwendet wurde, haben ergeben, dass auch mit Ricinusöl, ebenso wie mit Ricinolsäure (*Kahlbaum*), die enzymatische Oxydation des Carotins erzielt werden kann<sup>4)</sup>.

Im Zusammenhang mit den Unterschieden, die sich hier in quantitativer Beziehung zwischen Öl und Säure ergeben haben, ist

<sup>1)</sup> geringe, <sup>2)</sup> stärkere Ausscheidung von Carotin.

<sup>3)</sup> *J. B. Sumner* und *A. L. Dounce*, *Enzymol.* **7**, 130 (1939).

<sup>4)</sup> Die Jodzahl des Ricinusöls ergab sich zu 82, die der Ricinolsäure zu 87,5 (berechnet 85).

auf ein Ergebnis vorhergehender Versuche<sup>1)</sup> hinzuweisen, in denen Lecithin<sup>2)</sup> die durch das Soja-Enzym bewirkte Oxydation des Carotins stark hemmte, wenn ein ungesättigtes Fett verwendet wurde, den Oxydationsvorgang aber überhaupt nicht beeinträchtigte bei Verwendung freier ungesättigter Fettsäuren. Eine gewisse Analogie ergibt sich zu Untersuchungen von *Franke*<sup>3)</sup> über die Autoxydation ungesättigter Fettsäuren, in denen er beobachtete, „dass die freien Fettsäuren einer katalytischen Beeinflussung viel leichter, d. h. in viel stärkerem Ausmass und vor allem in ungleich besser reproduzierbarer Weise zugänglich waren als die neutralen Öle.“ Dass sich in unseren oben angeführten Versuchen mit dem Soja-Enzym und Carotin Leinöl mengenmässig wirksamer erwies als die freien Leinölsäuren, könnte damit zusammenhängen, dass letztere leichter in irreversibler Weise oxydiert werden und damit als „Katalysatoren“ der Carotinoxidation ausschalten. (S. weiter unten bei den Versuchen mit Guajakharz.) Soweit „lipoxydatische“ Enzyme von der Art des Soja-Enzyms und Hemmungsstoffe mit dem Verhalten des Lecithins von biologischer Bedeutung sind, ist die Fettsäuren- und Carotinoid-oxydation unter Umständen in hohem Masse von der Tätigkeit der Lipasen abhängig.

### 3. Verhalten der Enzymlösung gegenüber Guajakharz.

Die dialysierten Enzymlösungen vermögen eine alkoholische Lösung von Guajakharz (frisch bereitet) nicht zu bläuen. „Direkte Oxydasen“, die das Guajak mittels des Luftsauerstoffs oxydieren könnten, sind also nicht vorhanden. Nach Zusatz von Wasserstoffperoxyd erfolgt eine starke Bläuung der Guajaklösung. Die Enzymlösung enthält somit Peroxydase<sup>4)</sup>. Das Wasserstoffperoxyd lässt sich nun in dieser Probe durch eine der ungesättigten Fettsäuren oder Öl und Luftsauerstoff ersetzen. Nach Zusatz z. B. von Leinölsäure zur Enzymlösung tritt mit der Guajaklösung an der Luft eine schnell einsetzende und intensive Blaufärbung auf. Zusatz von Leinöl zur Enzymlösung bewirkt ebenfalls eine positive Guajakprobe, jedoch entwickelt sich in diesem Falle die blaue Farbe viel langsamer und erreicht in vergleichbaren Versuchen nicht die Intensität wie mit Leinölsäure (vgl. Protokoll in Tabelle V). Ähnliche Unterschiede im Ausfall der Guajakprobe werden zwischen Ricinolsäure und Ricinusöl beobachtet.

<sup>1)</sup> *H. Süllmann*, *Helv.* **24**, 465 (1941).

<sup>2)</sup> Verwendet wurde „Lecithin aus Eigelb reinst“ (*Kahlbaum*). Nach *Olcott* und *Matthill* (*Oil and Soap* **13**, 98 (1936)) ist die antioxygene Wirkung von Handelslecithinen bei Autoxydationen auf ihren Gehalt an Cephalin zurückzuführen. Ob das auch in unseren Versuchen mit dem Soja-Enzym und Carotin gilt, wurde noch nicht untersucht.

<sup>3)</sup> *W. Franke*, *A.* **498**, 129 (1932).

<sup>4)</sup> Vgl. *André* und *Hou*, *C. r.* **195**, 172 (1932).

Tabelle V.

Guajakharz als Akzeptor.

Je 2 cm<sup>3</sup> 1-proz. alkoholische Guajakharzlösung; Fett und Fettsäuren in Aceton.

	cm <sup>3</sup> Enzym	Öl bzw. Fettsäure	Beobachtung
I.	—	2,5 mg Leinöl	} nach 60 Minuten noch weiss
II.	—	2,5 mg Leinölsäure	
III.	2	—	
IV.	2	5 mg Leinöl	allmählich blau in 10 Minuten
V.	2	5 mg Leinölsäure	tief-blau in 1 Minute
VI.	2	10 mg Ricinusöl	nach 20 Minuten noch weiss; nach 60 Minuten schwach-blau
VII.	2	10 mg Ricinolsäure	allmählich blau in 10 Minuten

Aus diesen Beobachtungen ergibt sich, dass in dem System der „Carotin-oxydase“ an die Stelle des Carotinoids eine andere Substanz, in diesem Falle Guajakharz, als Sauerstoffakzeptor treten kann. Weiter zeigen sich wieder auffallende Unterschiede zwischen Öl und Säure, nur sehen wir hier — was die in der Beobachtungszeit erreichte Farbintensität der Guajaklösung betrifft — mit letzterer eine grössere Wirkung als mit dem Öl. Hier scheint eine grössere Reaktionsfähigkeit des Akzeptors (Guajakharz) zum Ausdruck zu kommen.

Die hier mit den beiden Akzeptoren Carotin und Guajakharz beobachteten Verhältnisse können vielleicht durch folgende Annahme erklärt werden. Die Verbindung des Sauerstoffs mit der ungesättigten Fettsäure ist aktiver und neigt stärker zum Zerfall als diejenige mit dem Öl. Mit einem sehr reaktionsfähigen Sauerstoffakzeptor, etwa Guajakharz, tritt die grössere Aktivität der Fettsäuren-Sauerstoffverbindung, mit einem träger reagierenden Akzeptor (Carotin) ihre stärkere Zerfallsneigung gegenüber den Fett-Sauerstoffverbindungen in Erscheinung. Diese Annahme setzt u. a. voraus, dass der Oxydation des Carotins und des Guajakharzes gleiche Vorgänge zugrunde liegen. Es ist aber auch denkbar, dass hier noch andere Reaktionen als die in der Einleitung aufgeführten eine Rolle spielen. So ist an die Mitwirkung von Wasserstoffperoxyd, das bei der Autoxydation ungesättigter Fettsäuren beobachtet wurde<sup>1)</sup>, zu denken. Zur Aufklärung des in den einzelnen Stufen höchstwahrscheinlich sehr komplizierten Reaktionsmechanismus bedarf es weiterer Untersuchungen, die in verschiedenen Richtungen durchgeführt werden.

#### 4. Der Einfluss von Wasserstoffperoxyd.

Zur genaueren Kenntnis des Vorgangs der enzymatischen Carotin-Oxydation war es von Interesse, festzustellen, ob an die Stelle des ungesättigten Fettes bzw. der Fettsäure Wasserstoffperoxyd treten kann. Für eine solche Möglichkeit wurden keine Anhaltspunkte gefunden. Zugefügtes Wasserstoffperoxyd scheint demnach nicht die Rolle der „aktiven Fett-Sauerstoffverbindung“ bei der Carotin-Oxydation übernehmen zu können. Andererseits wirkt es auf die

<sup>1)</sup> Vgl. W. Franke, in H. v. Euler, „Chemie der Enzyme“, Teil II, 3. Abschnitt, S. 176.



unter Verwendung von Leinölsäure erzielbare Carotin-Oxydation deutlich hemmend (Tabelle VI). Bereits 0,005 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  verzögern die Entfärbung sichtbar, und mit 0,02 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  erfolgt die Entfärbung von 0,4 mg Carotin erst nach Stunden (im Vergleich zu einer Entfärbungszeit von 3,5 Minuten im Parallelversuch ohne Wasserstoffperoxyd).

**Tabelle VI.**

Hemmung der Carotinentfärbung durch  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

2 cm<sup>3</sup> Enzym; 0,4 mg Carotin; 5 mg Leinölsäure; 5 cm<sup>3</sup> Aceton; 0,5 cm<sup>3</sup> Alkohol.  
Volumen: 115 cm<sup>3</sup>.

	mg $\text{H}_2\text{O}_2$	Entfärbungs- zeit Minuten
I.	—	8
II.	5	20
III.	20	etwa 240

Wir lassen vorerst unerörtert, ob diese hemmende Wirkung des Wasserstoffperoxyds auf einer direkten Reaktion mit dem Enzym beruht, oder ob hieran auch ein Einfluss des Wasserstoffperoxyds auf die Zwischenreaktionen beteiligt ist. Die hier beschriebene hemmende Wirkung zugefügten Wasserstoffperoxyds auf die Carotinoxidation schliesst nicht aus, dass etwa im Verlaufe der Reaktionen entstehendes Wasserstoffperoxyd (s. oben) sich anders verhält.

### 5. Wirkung von Natriumcyanid.

Aus einer grösseren Anzahl von Versuchen, in denen einige Faktoren, z. B. die Art und Menge des organischen Lösungsmittels und die Menge des Phosphatpuffers variiert wurden, ergibt sich folgendes Bild. In den meisten Versuchen zeigte Natriumcyanid in Konzentrationen bis zu 0,04-m. keinen Einfluss auf die Entfärbungsgeschwindigkeit (Tabelle VII); in den übrigen Versuchen war eine deutliche Verzögerung der Entfärbung festzustellen (Beispiel in Tabelle VIII). Die Ursache dieser Unterschiede kann noch nicht angegeben werden. Aber in keinem Versuch wurde selbst mit den hohen Cyanid-Konzentrationen eine auch nur als annähernd vollständig anzusprechende Hemmung beobachtet. (Wie bekannt, hemmt Cyanid die Wirkung einer Anzahl schwermetallhaltiger Sauerstoff aktivierender Enzyme bereits in Konzentrationen, die meist bedeutend niedriger als 0,001-m. liegen, völlig oder doch nahezu völlig.) In Ansätzen, die eine rein wässrige Carotin-Fettsäuresuspension — also kein organisches Lösungsmittel — enthielten, wurde keine Hemmung der Carotinentfärbung durch Cyanid beobachtet. In den Fällen, in denen eine Verzögerung der Entfärbung in Gegenwart des Cyanids beobachtet wurde, kann eine unspezifische, auf Milieuänderungen beruhende Wirkung vorliegen. Diese Verhältnisse bedürfen natürlich noch der weiteren Aufklärung. Im ganzen kann aus unseren Ver-

suchen auf eine ziemliche Unempfindlichkeit des Systems der enzymatischen Carotin-Oxydation gegenüber dem Cyanion geschlossen werden. Diese Annahme wird durch die folgenden Versuche mit Guajakharz gestützt.

**Tabelle VII.**

Einfluss von Cyanid auf die Oxydation des Carotins.

0,5 mg Carotin; 2 cm<sup>3</sup> Enzym; Organ. Lösungsmittel: 3 cm<sup>3</sup> Dioxan. In dieser Reihe wurden nur 2 cm<sup>3</sup> Phosphatpuffer verwendet. NaCN wurde mit äquivalenten Mengen Essigsäure annähernd neutralisiert.

	mg Leinöl	Molarität NaCN	Entfärbungszeit Minuten
I.	2,5	—	5
II.	5	—	8
III.	2,5	0,0025	5
IV.	2,5	0,02	5
V.	2,5	0,04	5

**Tabelle VIII.**

0,25 mg Carotin, Leinölsäure, Alkohol; 0,5 cm<sup>3</sup> Enzym. NaCN mit 0,1-n. HCl neutralisiert.

	mg Leinölsäure	Molarität NaCN	Entfärbungszeit Minuten
I.	2,5	—	7
II.	2,5	0,002	20
III.	5	—	7
IV.	5	0,002	15
V.	10	—	4
VI.	10	0,002	12

**Tabelle IX.**

Einfluss von Cyanid auf die Oxydation von Guajakharz.

2 cm<sup>3</sup> Enzym; 2 cm<sup>3</sup> 0,5-proz. Guajakharzlösung; überall 4 cm<sup>3</sup> Aceton. Gesamtvolumen: 120 cm<sup>3</sup>.

	Zusätze	Beobachtung
I.	—	nach 15 Minuten: weiss
II.	10 mg H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	in 1 Minute: tief-blau
III.	10 mg H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 25 mg NaCN	nach 15 Min.: bläulicher Schein
IV.	10 mg H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 100 mg NaCN	nach 15 Minuten: weiss
V.	5 mg Leinölsäure	in 1 Minute: tief-blau
VI.	5 mg Leinölsäure, 100 mg NaCN	in 1 Minute: tief-blau

Die erwähnte peroxydatische Wirkung der Enzymlösung mit Wasserstoffperoxyd auf Guajakharz wird durch Cyanid völlig gehemmt (Tabelle IX). (Die Blausäure-Empfindlichkeit ist für die Peroxydasen verschiedener Herkunft wiederholt beschrieben worden.)

Dagegen wird unter den gleichen Bedingungen die Reaktion mit Guajak durch Cyanid nicht gehemmt, wenn an Stelle von Wasserstoffperoxyd Leinölsäure verwendet wird.

Diese Versuche mit Cyanid vermögen folgendes zu zeigen. Der Oxydation des Carotins und des Guajakharzes in Gegenwart ungesättigter Fettsäuren liegen gleichartige Vorgänge zugrunde, die durch Cyanid nicht oder nicht bedeutend beeinflusst werden. Die durch Cyanid stark hemmbare Peroxydase, die die Oxydation des Guajakharzes mit Hilfe von Wasserstoffperoxyd bewirkt, ist an der durch das Soja-Enzym in Gegenwart ungesättigten Fettes erfolgenden Oxydation des Carotins oder Guajakharzes nicht beteiligt.

Für die sich aus unseren Ergebnissen ableitende wenigstens verhältnismässige Unempfindlichkeit des Soja-Enzyms finden sich zum Vergleich anregende Befunde in Arbeiten von *M. E. Robinson*<sup>1)</sup> sowie von *R. Kuhn* und *K. Meyer*<sup>2)</sup>. Danach wird die durch Hämin sehr wirksam katalysierte Oxydation von Leinöl und Olivenöl durch Cyanid nicht gehemmt, obwohl das Hämin in der Versuchslösung als Cyanverbindung vorliegt<sup>2)</sup>. Auf Grund dieser Beobachtung vermuten *Kuhn* und *Meyer*, dass die wiederholt nachgewiesene, gegen Blausäure unempfindliche Atmung mancher Algen und von Keimlingen, besonders im Hungerzustande, in erster Linie auf die Oxydation von Fetten zurückgeht. Für die gegen Cyanid unempfindliche Restatmung tierischer Gewebe wird ähnliches angeführt. Wenn auch hinsichtlich der Resistenz eines Teils der Gesamtatmung pflanzlicher und tierischer Gewebe gegenüber Blausäure noch eine Reihe von Fragen und Unsicherheiten besteht, kann in diesem Zusammenhang das Verhalten des Soja-Enzyms gegenüber Cyanid doch einige Aufmerksamkeit beanspruchen.

### Zusammenfassung.

1. Die Wirksamkeit des Enzyms aus der Sojabohne, das in Gegenwart eines ungesättigten Fettes oder einer ungesättigten Fettsäure die Oxydation von Carotin bewirkt, bleibt nach 24-stündiger Dialyse erhalten.
2. In diesem System ist als ungesättigtes Fett auch Ricinusöl und als ungesättigte Fettsäure auch Ricinolsäure wirksam.
3. Der mit einer bestimmten Menge Fett bzw. Fettsäure erzielbare Carotinumsatz ist begrenzt. Leinöl ist mengenmässig wirksamer als Leinölsäure.
4. Die Enzymlösung aus Sojabohnen enthält Peroxydase.
5. Zugewetztes Wasserstoffperoxyd kann die Rolle des ungesättigten Fettes bzw. der ungesättigten Fettsäure bei der Oxydation des Carotins nicht übernehmen.

<sup>1)</sup> *M. E. Robinson*, Biochem. J. **18**, 255 (1924).

<sup>2)</sup> *R. Kuhn* und *K. Meyer*, Z. physiol. Ch. **185**, 193 (1929).

6. Wasserstoffperoxyd hemmt die durch ungesättigtes Fett vermittelte Carotinoxydation.

7. Ungesättigte Fette bzw. Fettsäuren sind in Gegenwart des Enzyms auch bei der Oxydation von Guajakharz wirksam. Mit Fettsäuren (Leinölsäure) wird eine in der Zeiteinheit intensivere Blaufärbung erreicht als mit Fett (Leinöl).

8. Mit Natriumcyanid wurde in den meisten Versuchen keine, in einigen eine Verzögerung der Carotinentfärbung festgestellt. Eben-  
sowenig erscheint die Oxydation von Guajakharz in Gegenwart von  
Leinölsäure durch Cyanid gehemmt. Die Peroxydasewirkung wird  
unter den gleichen Bedingungen durch Cyanid vollständig gehemmt.

Basel, Augenklinik der Universität.

## 79. Etude critique des réactifs qualitatifs des cations du cobalt

par Paul Wenger et Roger Duckert.

(Collaboratrice M.-L. Busset.)

(15. V. 41.)

La « Commission Internationale des Réactions et Réactifs Analytiques Nouveaux » de l'Union Internationale de Chimie a publié en 1938 un premier rapport<sup>1)</sup> donnant une liste aussi complète que possible des réactifs analytiques des cations et des anions. Cette Commission, à laquelle l'un de nous appartient, s'est donné pour tâche de compléter cette liste par les nouvelles données de la littérature et de faire un choix aussi judicieux que possible des réactifs utilisables pour chaque ion dans les diverses conditions qu'exige la pratique. Il est évident, en effet, qu'actuellement le chimiste se trouve fort embarrassé devant une énumération souvent très longue de réactifs qu'il est très difficile de juger à la simple lecture. D'autre part, nous devons reconnaître que malheureusement très souvent, les réactifs ont été étudiés d'une façon beaucoup trop sommaire, ou qu'ils ont été simplement signalés parce que trouvés au hasard de recherches n'ayant pas un but analytique.

Nous pensons rendre service à la technique analytique en publiant ici l'ensemble des travaux qui nous ont amenés à faire le choix des réactifs demandé par la Commission pour l'élaboration de son prochain rapport. Tandis que dans ce dernier il ne sera signalé que quelques réactions par ion, il nous semble que les résultats des travaux préliminaires peuvent présenter un intérêt réel.

<sup>1)</sup> « Commission Internationale des Réactions et Réactifs Analytiques Nouveaux » de l'Union Internationale de Chimie, 1er rapport 1938, Tableau des réactifs pour l'Analyse minérale.