

Untersuchungen über bakteriostatische Chinone und andere Antibiotika.

VIII. Mitteilung: Wirkungen verschiedener Chinone auf die Stärkespaltung durch Amylasen tierischen Ursprungs.

Von

O. Hoffmann-Ostenhof und Elisabeth Biach.

Aus dem I. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

(Eingelangt am 6. Okt. 1947. Vorgelegt in der Sitzung am 9. Okt. 1947.)

In Fortsetzung unserer in den früheren Mitteilungen dieser Reihe berichteten Versuche über den Einfluß verschiedener Chinonderivate auf die Aktivität von Enzymsystemen haben wir nunmehr Untersuchungen über die Wirkungen dieser Substanzen auf die Amylasen des Speichels und des Pankreassaftes durchgeführt.

Über Hemmungs- bzw. Aktivierungerscheinungen bei Amylasen wurde bereits von verschiedenen Autoren berichtet; eine Reihe organischer Stoffe, wie insbesondere Formaldehyd, Tannin sowie einige Amine einerseits, Schwermetallsalze anderseits, erweisen sich als typische Hemmstoffe der Amylasewirkung. Hingegen sind als Aktivatoren für die Stärkespaltung durch Amylasen vor allem Chlor- und Bromionen, weiters in geringerem Maße auch andere Anionen, und schließlich auch manche Proteine und Aminosäuren erkannt worden. Hopkins¹ schreibt allerdings in einem jüngst erschienenen Referat über dieses Gebiet die aktivierenden Wirkungen sogenannten Salzeffekten zu; die Aktivierung würde also durch Erhöhung der Löslichkeit, der Dispersion oder der Stabilität des Enzymkomplexes zustande kommen.

Das Verhalten der Chinone gegenüber der Wirksamkeit von Amylasepräparaten erschien uns vor allem aus zwei Gründen von Interesse: wir wollten analog zur Problemstellung unserer früheren Arbeiten über die Wirkung von Chinonen auf die Aktivität bestimmter Enzyme untersuchen, ob eine Parallelität zwischen der Beeinflussung der Enzymaktivität durch unsere Substanzen und ihren biologischen Effekten besteht;

¹ R. H. Hopkins, Adv. Enzymology 6, 389 (1946).

zweitens ist über den Einfluß von redoxaktiven Substanzen auf die Amylasen so gut wie gar nichts bekannt und unsere Chinone, die genau bestimmte Oxydations-Reduktionspotentiale haben, erschienen für eine derartige Untersuchung sehr geeignet.

Methodik.

Die Bestimmung der Amylaseaktivität wurde auf zwei verschiedene Arten durchgeführt: nach der Methode von *Wohlgemuth*,² bei welcher das Verschwinden des Substrats bestimmt wird, sowie nach der Hypojoditmethode von *Willstätter* und *Schudel*,³ welche auf einer Bestimmung der Menge der auftretenden Reaktionsprodukte beruht. Eine Kombination dieser beiden Verfahren erschien uns besonders günstig, um den Verlauf der durch unsere Stoffe beeinflußten Stärkespaltung zu verfolgen.

Als Fermentlösungen verwendeten wir 1. eine filtrierte Lösung menschlichen Speichels, die 1 : 10 verdünnt war, 2. dieselbe Lösung gegen destilliertes Wasser dialysiert und 3. eine Lösung von 0,6 g Pankreatin (*Merck*) in 100 ccm destilliertem Wasser, welche gut durchgeschüttelt und vom Unlöslichen abfiltriert wurde.

Als Substrat diente in allen Fällen eine 1%ige wäßrige Lösung von *Amylum solubile*, als Reaktionstemperatur wurde immer 40° gewählt. Auf eine Pufferung der Reaktionsgemische mußte aus Gründen, die weiter unten erörtert werden sollen, im allgemeinen verzichtet werden.

Bei der Messung nach *Wohlgemuth* wurden in vier Reagenzgläser je 5 ccm Stärkelösung und 1 ccm Chinonlösung der zu untersuchenden Konzentration oder destilliertes Wasser (Blindversuch) pipettiert und dann der Reihe nach 2, 3, 4 und 5 exakt abgemessene Tropfen Fermentlösung hinzugefügt, nach Umschütteln in den Thermostaten gestellt und die Beobachtungen entsprechend der Originalvorschrift durchgeführt.

Für eine Bestimmung nach *Willstätter* und *Schudel* wurde jeder Ansatz mit 40 ccm Stärkelösung, 10 ccm Lösung des entsprechenden Wirkstoffs oder destilliertem Wasser (Blindversuch) und 5 ccm Fermentlösung durchgeführt. Während die erstgenannte Methode ziemlich ungenaue Resultate ergibt und wohl nur als halbquantitativ bezeichnet werden darf, ist die Messung nach *Willstätter* und *Schudel* recht genau und liefert ausgezeichnet reproduzierbare Werte. Die Fehlergrenze liegt etwa bei $\pm 2\%$ der Hemmwerte bzw. Aktivierungswerte.

Ergebnisse und Diskussion.

Die Ergebnisse unserer Hauptversuchsreihe sind in Tabelle I dargestellt.

² *J. Wohlgemuth*, Biochem. Z. 9, 1 (1908).

³ *R. Willstätter* und *G. Schudel*, Ber. dtsch. chem. Ges. 51, 780 (1918).

Tabelle 1. Beeinflussung der Aktivität von Speichelamylase durch wäßrige Lösungen verschiedener Chinone. (Messungen nach Willstätter und Schudel, Versuchstemperatur 40°, ungepufferte Lösungen.)

Substanz	Molare Konzentration im Versuchsansatz	Aktivierung (+) bzw. Hemmung (-) in Prozenten
p-Benzochinon	10 ⁻³	+ 10
	10 ⁻⁴	0
Toluchinon	10 ⁻³	+ 42
	10 ⁻⁴	0
p-Xylochinon	3 · 10 ⁻³	+ 26
	10 ⁻³	+ 3
	10 ⁻⁴	0
4-Methoxytoluchinon	1,5 · 10 ⁻³	+ 31
	10 ⁻³	+ 26
	10 ⁻⁴	0
2,6-Dimethoxybenzochinon ..	5 · 10 ⁻⁴	+ 32
	10 ⁻⁴	+ 13
	10 ⁻⁵	0
2,6-Dichlorbenzochinon	5 · 10 ⁻⁴	- 25
	10 ⁻⁴	0
1,2-Naphthochinon	5 · 10 ⁻⁴	+ 63
	10 ⁻⁴	+ 17
1,4-Naphthochinon	5 · 10 ⁻⁴	+ 14
	10 ⁻⁴	+ 5
Naphthazarin	5 · 10 ⁻⁵	+ 40
	10 ⁻⁵	+ 14
Methylnaphthazarin	5 · 10 ⁻⁵	+ 35
	10 ⁻⁵	+ 7
Lawson	3 · 10 ⁻⁴	- 76
	10 ⁻⁴	- 24
Isonaphthazarin	3 · 10 ⁻⁴	- 50
	10 ⁻⁴	- 12

Anmerkung: Die erstgenannten Konzentrationen sind (außer bei p-Benzochinon und Toluchinon) die höchstmöglichen Konzentrationen; die Effektoren wurden in gesättigten Lösungen zum Versuchsansatz zugegeben, weshalb die Konzentrationsangabe weniger genau ist als bei den anderen Werten.

Die in Tabelle 1 angeführten Werte stimmen gut mit den durch Parallelversuche nach der Methode von *Wohlgemuth* erhaltenen überein. Die einzige Ausnahme bildet das 1,2-Naphthochinon; in diesem Falle zeigte bei der Höchstkonzentration des Effektors die Methode von *Wohlgemuth* eine starke Hemmung (fast 100%) an. Es scheinen hier zwei verschiedene Prozesse nebeneinander zu laufen, von welchen der eine als Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit des fermentativen Prozesses zu deuten ist, während anderseits durch das 1,2-Naphthochinon ein Teil der Stärke dem fermentativen Abbau entzogen wird, was durch die Blaufärbung nach Jodzusatz bei der Messung nach *Wohlgemuth* erkennbar ist.

Versuche mit dialysierten Speichellösungen und mit einer Lösung von Pankreasamylase ergaben weitgehendst übereinstimmende Resultate. Speichelamylase und Pankreasamylase sind ja nach den Untersuchungen verschiedener Forscher sehr nahe miteinander verwandt.

Das Ergebnis, daß die meisten Chinone imstande sind, die Amylasen zu aktivieren, erschien uns sehr überraschend, da bei allen bisher von uns untersuchten Fermentsystemen die Chinone eine mehr oder minder stark *hemmende* Wirkung oder, wie bei der Pankreaslipase, keine Effekte auf die Fermentaktivität zeigten. Eine theoretische Deutung dieser Effekte erscheint uns um so schwieriger, als über den Wirkungsmechanismus der Amylasen noch wenig gesicherte Kenntnisse vorliegen. Ein gewisser Hinweis sollte vielleicht darin liegen, daß unsere Aktivierungen nur in ungepufferten Lösungen ohne Zusatz von Chlor- oder anderen Säureionen zu beobachten sind. Bei Aktivierung der Amylaselösung durch Chlorionen oder bei Zusatz einer der gebräuchlichen Pufferlösungen läßt sich keinerlei Aktivierung mehr nachweisen; unter diesen Bedingungen verschwinden auch die durch 2,6-Dichlorbenzochinon, Lawson und Isophthazarin verursachten Hemmeffekte. Eine quantitative Untersuchung dieser Erscheinungen wollen wir in nächster Zeit durchführen. Es scheint uns nicht unwahrscheinlich, daß die aktivierenden Chinone zu einem gewissen Grade imstande sind, eine ähnliche Wirkung wie die Chlorionen auszuüben, wobei allerdings in keinem Falle die Aktivierung durch Chinone eine so starke ist wie die der optimalen Chlorionenkonzentration. Ob der Mechanismus der Chinonaktivierung der Amylaseaktivität demjenigen der Chlorionenaktivierung derselben analog ist, kann in Anbetracht der geringen Kenntnisse über letzteren Vorgang sicher noch nicht entschieden werden, denn auch die eingangs zitierte Meinung von Hopkins, daß die Amylaseaktivierung durch Halogenanionen auf Salzeffekten beruhe, scheint kaum genügend gesichert zu sein.

Ein Zusammenhang zwischen der Höhe der Oxydations-Reduktionspotentiale der angewandten Effektoren und deren Wirkung auf die Amylase läßt sich in keinem Falle feststellen. Hingegen beeinflussen die biologisch aktivsten Chinone, nämlich die stark antibakteriellen Naphthazarine, das 4-Methoxy-toluchinon und das 2,6-Dimethoxy-benzochinon, die Aktivität der Amylasen besonders stark; wir können also hier das erste Mal im Verlauf unserer Untersuchungen eine gewisse Übereinstimmung zwischen Fermentbeeinflussung und antibakterieller Wirkung feststellen. Trotzdem sind wir hinsichtlich der biologischen Bedeutung der geschilderten Effekte einigermaßen skeptisch. Es muß nämlich bedacht werden, daß in wohl allen Medien, in denen die Chinone zur Wirkung gelangen sollen, wie z. B. Cytoplasma von Mikroorganismen oder Körperfüssigkeiten, die Anionen- und insbesondere Chlorionenkonzentration nicht viel geringer ist als diejenige, die zur maximalen Aktivierung der

Amylasen notwendig ist, weshalb in diesen Medien die Chinone auf Amylasen sicher keine Wirkung ausüben. Den erhaltenen Ergebnissen dürfte deshalb nur ein theoretisches Interesse zukommen.

Wir beabsichtigen, unsere Untersuchungen auch auf Amylasen pflanzlicher und bakterieller Herkunft, so auch auf β -Amylasen auszudehnen.

Zusammenfassung.

Es wurde die Wirkung verschiedener synthetisch dargestellter Chinone auf die Stärkespaltung durch Speichel- und Pankreasamylase gemessen. Dabei konnte festgestellt werden, daß in salzarmen, ungepufferten Versuchsansätzen viele Chinone eine merklich aktivierende Wirkung auf den fermentativen Vorgang ausüben. Einige wenige Chinone sind hingegen ausgesprochene Hemmstoffe der Amylasewirkung. Wenn Anionen, insbesondere Chlorionen, oder auch Pufferlösungen zu den Versuchsansätzen hinzugefügt werden, verschwinden die aktivierenden Wirkungen. Eine biologische Bedeutung dürfte den geschilderten Erscheinungen nicht zu kommen.