

Über die Beziehungen der Hämoglobinderivate und Peroxydasen zu anorganischen Katalysatoren.

Von

Dr. W. Madelung, Heidelberg.

(Der Redaktion zugegangen am 18. Februar 1911.)

Die Frage nach den Beziehungen der in pflanzlichen und tierischen Organismen vorkommenden Oxydationsfermente zu anorganischen Katalysatoren¹⁾ ist bisher meistens nur in Hypothesen allgemeiner Natur erörtert worden. Daß mancherlei Ähnlichkeiten bei fermentativen und sonstigen katalytischen Vorgängen vorkommen, ist seit den Untersuchungen von Berzelius und Schönbein schon vielen Forschern aufgefallen: in neuerer Zeit haben besonders kinetische Untersuchungen G. Bredigs und seiner Schüler über «anorganische Fermente» auf sehr auffallende Analogien aufmerksam gemacht, zu deren Erklärung hauptsächlich der ähnliche physikalische Zustand herangezogen wird. Der direkte Nachweis anorganischer Katalyse bei fermentativen Prozessen ist aber bisher nur in seltenen Fällen gelungen. Zwar konnte Bertrand²⁾ die Wirksamkeit einzelner Pflanzenoxydasen auf ihren Mangangehalt zurückführen und für Einzelfälle hat sich auch durch Untersuchungen anderer Forscher³⁾ bestätigt, daß bei gewissen Oxydasen das wirksame «Enzym» nichts anderes ist als Mangansalz in Gegenwart von Alkali resp. Erdalkalisalzen schwacher

¹⁾ Über die in vorstehender Abhandlung angewandte Nomenklatur vgl. Engler und Herzog, Diese Zeitschrift, Bd. LIX, S. 327 (1909).

²⁾ Compt. rend., Bd. CXXIV, S. 1032 und 1355 (1897).

³⁾ Trillat, Compt. rend., Bd. CXXXVII, S. 922 (1903); Bd. CXXXVIII, S. 94 und 274 (1904). — Dony Henault, Bull. Acad. Royale de Belg., 1908, Bd. CV. — Euler und Bolin, Diese Zeitschrift, Bd. LVII, S. 80 (1908).

organischer Säuren und kolloidalen, das Ausfallen von Mangansuperoxyhydrat verhindernden Stoffen. Eine Verallgemeinerung der Entdeckung Bertrands zur Erklärung anderer Oxydationsfermente hat sich jedoch nicht durchführen lassen und speziell die indirekten Oxydasen, die als Peroxydasen (Linossier), auch Peroxydiastasen (Bertrand) bezeichneten, auf Peroxyde aktivierend wirkenden Enzyme dürften wohl wenig mit Mangan zu tun haben.

Es ist nun wohl häufig die Vermutung ausgesprochen worden, es könnte der des öfteren festgestellte Eisengehalt für die Wirksamkeit der Oxydasen verantwortlich gemacht werden. Da nach der Theorie von Bach und Chodat¹⁾ Oxydasen sich zusammensetzen aus Oxygenasen, d. h. durch Sauerstoffaufnahme Peroxyde bildenden Stoffen, und Peroxydasen, müßte das auch für letztere gelten. Indessen sind solche Vermutungen wieder zweifelhaft geworden, einmal dadurch, daß sich nach den Untersuchungen mehrerer Forscher²⁾ wirksame Peroxydasepräparate gewinnen lassen sollen, die nicht nur völlig mangan-, sondern auch eisenfrei sind, dann aber wohl auch deshalb, weil unter den Bedingungen, die für die Wirksamkeit der Peroxydasen maßgebend sind, es nicht gelingt, mit den gewöhnlichen Eisenverbindungen die für Peroxydasen typischen Reaktionen zu erhalten.

Seit Schönbeins³⁾ Untersuchungen wissen wir, daß Ferrosalze Peroxyden z. B. Wasserstoffperoxyd außerordentlich stark oxydierende Eigenschaften zu übertragen vermögen. Gibt man z. B. zu einer Lösung von Wasserstoffperoxyd bei Gegenwart eines geeigneten Acceptors ein wenig Ferrosalz, so wird unter gleichzeitiger Überführung des Eisens in die Ferriform eine gewisse Menge des als Acceptor bezeichneten Stoffes oxydiert.

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVI, S. 607 (1903).

²⁾ Rosenfeld, Diss. Petersburg 1906. zit. nach Sammelreferat von A. Bach, Biochem. Zentralbl., 1909. — E. de Stoecklin, Thèse Genève, zit. nach dem gleichen Referat. — Bach und Tscherniak, Ber. der Deutsch. chem. Ges., Bd. XLI, S. 2345 (1908).

³⁾ Verhandl. der naturwiss. Ges. in Basel. Journ. f. prakt. Chem., Bd. LXXIX, S. 65 (1860).

Im Gegensatz zu dem Verhalten bei Gegenwart von Peroxydasen findet der Vorgang sehr rasch statt und ist in neutraler Lösung binnen kurzer Zeit beendet. In der Tat haben Manchot und Wilhelms¹⁾ gezeigt, daß es sich bei der Aktivierung des Wasserstoffperoxyds durch Ferrosalze in neutraler Lösung gar nicht um eine eigentliche katalytische Reaktion handelt; der Vorgang findet vielmehr nach kurzer Zeit mit der Oxydation einer bestimmten Menge des Acceptors, im von ihnen untersuchten Falle Jodkalium, sein Ende. Die Reaktion bei der Aktivierung durch Ferrosalze ist also grundverschieden von dem Verhalten der grade in neutraler Lösung katalytisch wirkenden Peroxydasen, und das wird noch einleuchtender, wenn man die Menge des in letzteren bestenfalls enthaltenen Eisens in Betracht zieht. Die geringen in Peroxydasen eventuell enthaltenen Eisenmengen sind sicher nicht befähigt, in Form einfacher Salze derartig weitgehende Oxydationen zu vermitteln. Wenn das Eisen in den Peroxydasen das wirksame Prinzip ist, so müssen seine Eigenschaften in dieser «organischen» Bindung wesentlich verschieden sein von seinem Verhalten in gewöhnlichen Eisensalzen.

J. Wolff²⁾ ist es nun tatsächlich gelungen, eine künstliche Peroxydase zu erhalten, die Eisen als wirksames Prinzip enthält. Er konnte zeigen, daß frisch dargestelltes, in kolloidaler Lösung befindliches Berlinerblau, d. h. das Ferricyanid des kolloidalen Eisens mit den Peroxydasen große Ähnlichkeit besitzt, sowohl in der Art des Verlaufs der Reaktion mit verschiedenen Stoffen, als auch hinsichtlich der Menge des sich bei der katalytischen Oxydation von Pyrogallol bildenden Purpurogallins. Ähnliche Eigenschaften wies E. de Stoecklin³⁾ bei dem Ferritannat nach. Wolff betont die Analogie, die in dem kolloidalen Zustand seines künstlichen Fermentes mit dem der natürlichen Fermente liegt. Man hat wohl auch sonst Spekulationen angestellt, wonach der kolloidale Zustand für die Wirksamkeit der Oxydationsfermente von ausschlaggebender Bedeutung sei.

Jedenfalls wird man, wenn schon feststeht, daß künstliche

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXIV, S. 2479 (1901).

²⁾ Compt. rend., Bd. CXLVI, S. 781, 1217 und 1415 (1908).

³⁾ Compt. rend., Bd. CXLVII, S. 1489 (1908).

Eisenverbindungen peroxydasenartige Eigenschaften besitzen können, es als mindestens wahrscheinlich ansehen müssen, daß ein Naturstoff, das Hämoglobin, seine Fähigkeit, Peroxyde nach Art der Peroxydasen zu aktivieren, wirklich seinem Eisengehalt verdankt. Es ist bekannt, daß das Hämoglobin ebenso wie alle eisenhaltigen Blutfarbstoffderivate die Fähigkeit hat, mit Wasserstoffperoxyd bzw. peroxydhaltigen Stoffen, wie altem Terpentinöl, die Reaktion mit Guajak zu geben, d. h. dessen Oxydation zu Guajakblau zu vermitteln. Die eisenfreien Derivate haben aber diese Fähigkeit nicht mehr. So gibt z. B. Hämin die Reaktion mit Guajak, Hämatoporphyrin nicht.

Carlson¹⁾ hat in einem Versuche, die Ursache der Guajakblaufärbung mit Blut aufzuklären, diese Umstände auch in Betracht gezogen. Sein Schluß, daß das im Blut enthaltene Eisen nicht für die Blaufärbung maßgebend sei, weil er nach der Zerstörung des Blutfarbstoffes mit dem daraus entstandenen Eisenchlorid bei entsprechenden Verdünnungen keine Reaktion erhalten habe, kann nach dem vorher Gesagten nicht als stichhaltig angesehen werden. Die Frage, die man sich vorlegen muß, lautet vielmehr:

Welchen Ursachen ist es zuzuschreiben, daß eine Eisenverbindung wie das Hämoglobin sich bei der z. B. durch Bildung von Guajakblau kenntlich gemachten Aktivierung von Peroxyden anders verhält als gewöhnliche Eisensalze?

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVIII, S. 69 (1906) und Bd. LV, S. 260 (1908).

Carlsons Versuch, die Guajakreaktion aufzuklären, indem er sie mit allen möglichen Hydroxylgruppen enthaltenden oder bildenden Stoffen in Beziehung setzt, dürfte als vollkommen verunglückt bezeichnet werden. Bei einer Nachprüfung seiner Angaben konnte die Guajakreaktion bei Abwesenheit von Peroxyden nur in solchen Fällen beobachtet werden, in denen Stoffe angewandt wurden, deren oxydierende Eigenschaften schon bekannt sind — Quecksilberoxyd, Silberoxyd, Kobalt-superoxyd, salpetrige Säure. Die Beobachtung, daß die Neutralisation von Natronlauge ein Oxydationsvorgang sei, wäre ja sehr interessant, konnte aber leider auch mit Hilfe der Guajakreaktion nicht bestätigt werden. Die Angabe Carlsons, daß bei der Elektrolyse einer Magnesiumsulfatlösung die Guajakreaktion an der Kathode auftrate, kann nur durch eine Verwechslung von Anode und Kathode ihre Erklärung finden.

Eine Beantwortung dieser Frage, im weiteren Sinne eine mögliche Erklärung der Peroxydase-wirkung überhaupt, wird sich ergeben aus der qualitativen und quantitativen Untersuchung folgender Teilfragen:

1. Wie und unter welchen Umständen wirken Eisensalze für sich auf oxydierbare Stoffe, im speziellen Chromogene?
2. Wie verhalten sie sich bei gleichzeitiger Anwesenheit von oxydierbaren Stoffen und Peroxyden?
3. Wodurch unterscheidet sich unter den angegebenen Bedingungen die Wirkung der Blutfarbstoffe und der Eisensalze?
4. In welchem Verhältnis stehen die verschiedenen Blutfarbstoffderivate zu einander hinsichtlich ihrer Aktivierungsfähigkeit?
5. Von welchen Bedingungen ist die katalytische Aktivierung von Peroxyden bei rein anorganischen Fällen abhängig und werden dieselben bei der Reaktion derselben mit Blutfarbstoffen erfüllt?

Da ich mich bei der Untersuchung dieser Fragen einer bisher unbekanntenen Methode bedient habe, soll im folgenden das Prinzip meiner Untersuchungsmethode behandelt werden.

Die Benzidinreaktion und ihre Verwendung zur Bestimmung der Aktivierung von Peroxyden.

Bei der Untersuchung der Oxydationsfermente haben von jeher die Chromogene, d. h. Stoffe, die bei ihrer Oxydation in stark gefärbte Verbindungen übergehen, eine beträchtliche Rolle gespielt. Unter ihnen hat das von Schönbein zuerst angewandte Guajakharz wohl hauptsächlich aus Tradition bei weitem die verbreitetste Anwendung gefunden. Um für die Wirksamkeit des katalysierenden Stoffes ein Maß zu haben, benutzten viele Untersucher bisher nur die ganz rohe Methode der Verdünnung und stellten fest, bei welchem Grade der Verdünnung noch eine deutliche Reaktion sichtbar ist. Eine wesentlich exaktere Methode scheint die kolorimetrische zu sein, die auch von verschiedenen Forschern benutzt worden ist. Sie hat den Vorteil für sich, daß sie erlaubt, den Verlauf der Reaktion annähernd zu verfolgen. Die Reaktion verläuft nun in

der Regel in der Weise, daß die als Maß der Reaktion dienende Färbung sich bis zu einem Maximum vertieft, um dann wieder abzublassen. Es erklärt sich das einfach dadurch, daß der gebildete Farbstoff durch dasselbe oxydierende Agens, dem er seine Bildung verdankt, unter Entfärbung zerstört wird. Der Vorgang der Zerstörung des Farbstoffes setzt nun natürlich von dem Momente seiner Bildung ein, und es folgt daraus, daß die jeweilige Intensität der Farbe abhängig ist von der Geschwindigkeit einerseits der Bildung, anderseits der Zerstörung des Farbstoffes. Im Falle des Überschusses von Chromogen wird die Menge des in der Zeiteinheit gebildeten Farbstoffes überwiegen gegenüber dem in derselben Zeit zerstörten. Im Maße der Zunahme des Farbstoffes wird die zweite Reaktion der Farbstoffzerstörung überwiegen. Da man nun nicht wissen kann, von welchen Faktoren die nebeneinander verlaufenden Reaktionen abhängig sind, muß man der kolorimetrischen Methode wohl in den meisten Fällen nur einen beschränkten Wert zuschreiben.

Für eine einfache Wertbestimmung von Oxydationsfermenten verdienen ganz allgemein gesprochen diejenigen Reaktionen den Vorzug, bei denen das als Maß für die Wirksamkeit dienende Produkt, ohne selber den weiteren Verlauf der Reaktion zu beeinflussen, seinerseits der weiteren Einwirkung oxydierender Agenzien entzogen wird. Diesen Forderungen können, genau genommen, auch nicht die sonst vielfach angewandten Reaktionen genügen, die mit einer Änderung des Gehaltes der Lösung an H-Ionen verbunden sind, wie die Oxydation von Aldehyden zu Säuren und von Jodwasserstoff unter Bildung von Jod; letzteres besonders dann, wenn, wie es gerade beim Blut der Fall ist, das Jod selber auf die die Reaktion einleitende Substanz einwirkt. Es erscheint überhaupt im hohen Grade wünschenswert, bei der Bestimmung des Wirkungswertes von Fermenten die Möglichkeit dauernd neutraler Reaktion in der Hand zu haben.

Eine diesen Anforderungen entsprechende Reaktion haben Bach und Chodat¹⁾ in der Oxydation des Pyrrogallols zu

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVII, S. 1342 (1904).

Purpurogallin gefunden. Das sich bildende Purpurogallin scheidet sich als sehr schwach lösliches Produkt ab und kann seiner Menge nach auf gewogenem Filter bestimmt werden. Der Verlauf der Reaktion läßt sich bei der besonders im Anfang sehr großen Reaktionsgeschwindigkeit nicht feststellen; die unter gleichen Umständen erhaltenen Werte scheinen aber eine große Verlässlichkeit zu haben. Bach und Chodat fanden nach dieser Methode, daß bei Überschuß von Wasserstoffsperoxyd die Menge des sich bildenden Purpurogallins proportional der Menge der Peroxydase ist, bei Überschuß von Peroxydase proportional der Menge des Wasserstoffperoxyds, während die Menge des Pyrrogallols ohne Einfluß auf die Reaktion ist.

Die Reaktion von Bach und Chodat dürfte theoretisch einwandfrei sein. Sie hat nur den Nachteil, daß gewichtsanalytische Bestimmungen auf gewogenem Filter immer zeitraubend und unbequem sind; auch scheint die Ausscheidung des Purpurogallins nicht so vollständig zu erfolgen, daß nicht ein, wenn auch vielleicht nur kleiner Teil einer weit ergehenden Oxydation anheimfiele. Es ist mir nun gelungen, eine Methode zur Wertbestimmung von Peroxydasen auszuarbeiten, die das gleiche Prinzip der Ausscheidung eines unlöslichen Reaktionsproduktes zugrunde hat, sich aber dadurch unterscheidet, daß die gewichtsanalytische Bestimmung durch ein einfaches jodometrisches Verfahren ersetzt wird.

Das Verfahren ist eine weitere Ausgestaltung einer Reaktion, die in letzter Zeit vielfach Anwendung zur qualitativen Bestimmung von Blut und Peroxydasen gefunden hat, nämlich der zuerst von O. und R. Adler¹⁾ angegebenen Benzidinreaktion. Diese Reaktion hat vor anderen Reaktionen, z. B. gerade der sonst in den meisten Beziehungen ganz analogen Guajakreaktion, das voraus, daß es sich bei Ausgangs- und Endprodukten um relativ einfache, in ihrer Konstitution bestimmbare Stoffe handelt, wodurch uns das Verständnis der Bedingungen der Reaktion sehr erleichtert wird. Die blaue, bei der Benzidinreaktion auftretende Farbe ist nämlich Verbindungen zuzuschreiben, die sich unter geeigneten Umständen bei Einwirkung

¹⁾ Diese Zeitschrift. Bd. XLI, S. 59 (1904).

beliebiger oxydierender Agenzien auf Lösungen des Benzidins bilden können. Willstätter¹⁾ sprach zuerst die Ansicht aus, die dann auch von Schlenk²⁾ bestätigt wurde, daß es sich bei diesen ersten Oxydationsprodukten des Benzidins um chinoide Stoffe handele, die zu dem Benzidin in ähnlicher Beziehung stehen, wie das Chinhydron zum Hydrochinon, doch konnte ich, wie an anderer Stelle ausgeführt wird,³⁾ zeigen, daß dieses erste Oxydationsprodukt bei Einwirkung größerer Mengen von Oxydationsmitteln in dem Chinon direkt entsprechende Körper übergeht, ohne sich von dem ersten Produkt anders als durch stärkere Farbenintensität zu unterscheiden. Die blauen Substanzen sind indessen nicht die sehr unbeständige chinoide Base, das Diphenochinon-diimin, sondern es sind Farbsalze, Diphenochinon-diimoniumsalze bzw. chinhydronartige Verbindungen derselben mit Benzidin. Wir wollen, da sich die verschiedenen Salze für den vorliegenden Zweck völlig gleichartig verhalten, die blauen Verbindungen, um den unhandlichen Namen zu vermeiden, unter dem Sammelnamen Benzidinblau zusammenfassen. Während nun die Salze organischer Säuren, z. B. der Essigsäure, recht unbeständige Lösungen geben, scheiden sich im Gegensatz dazu die Salze von Mineralsäuren als sehr schwerlösliche, in Gegenwart von wenig Mineralsalz völlig unlösliche Körper aus, die unter Einhaltung neutraler Reaktion bei Zimmertemperatur völlig beständig sind. Bei Gegenwart von Mineralsäuren zersetzen sie sich unter Zerfall in Benzidin und höher oxydierte Verbindungen, z. B. in Gegenwart von Salzsäure das von Schlenk beschriebene Dichlorimid.

Das im folgenden beschriebene Verfahren zur Bestimmung des Wirkungswertes von Peroxydase aktivierenden Substanzen beruht nun wesentlich darauf, daß das chinoide Dichlorimid des Benzidins, sowie analoge, durch Säurezugabe sich bildende Stoffe ebenso wie Chinone ein hohes Oxydations-

¹⁾ Willstätter und Kalb, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXIX, S. 3476 (1906), Willstätter und Piccard, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XLI, S. 3245 (1908).

²⁾ Annalen d. Chem. u. Pharm., Bd. CCCLXIII, S. 313 (1908).

³⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XLIV, H. 5 (1911).

potential besitzt und dementsprechend aus Jodwasserstoff Jod unter Rückbildung von Benzidin in Freiheit setzt.

Wenn man auf eine neutrale wässrige Benzidinlösung ein Oxydationsmittel einwirken läßt, so fällt bei Anwesenheit selbst geringer Mengen eines neutralen Mineralsalzes das Benzidinblau in Form mikroskopischer verfilzter Nadelchen völlig unlöslich und in gut filtrierbarer Form aus der Lösung aus. Das Filtrat davon ist absolut farblos. Wenn man nun den gebildeten Farbstoff mit Salzsäure übergießt, so verschwindet die blaue Farbe sofort und es finden sich jetzt die braunen Flocken des Dichlorimids vor, das sich zum Teil mit gelber Farbe löst. Auf Zusatz von Jodkalium lösen sich die Flocken; die Lösung bleibt jedoch gelbbraun durch in Freiheit gesetztes Jod. Das Jod kann dann in bekannter Weise durch Thiosulfatlösung unter Zusatz von Stärkelösung titriert werden. Es kommt also im Endresultat auf dasselbe hinaus, wie wenn das Oxydationsmittel direkt auf den Jodwasserstoff eingewirkt hätte. Am einfachsten läßt sich das zeigen, wenn als Oxydationsmittel zur Benzidinblaubildung eine wässrige Lösung von Jodjodkalium angewandt wird. Man gebraucht, wie sich mir aus vielen Versuchen ergab, zur Titration bis zum Verschwinden der blauen Jodstärkefärbung genau gleiche Mengen Thiosulfat, gleichgültig, ob man in saurer Lösung direkt titriert, oder erst in neutraler Lösung Benzidinblau niederschlägt und dieses nach seiner Zersetzung titriert.

Da das Benzidin nur eine ziemlich geringe Löslichkeit in Wasser besitzt, empfiehlt es sich, gesättigte Lösung desselben anzuwenden, die ca. 0,04% enthalten. Man stellt sich leicht größere Mengen gesättigten Benzidinwassers her, wenn man die heißgesättigte Lösung in ungefähr die zehnfache Menge kalten Wassers gießt und nach dem Erkalten durch ein großes Faltenfilter abfiltriert. Die Benutzung reiner Präparate ist für genaue Bestimmungen wesentlich. Um das Benzidinblau unlöslich zu machen, versetzte ich die Lösung in allen Fällen mit 1% Kochsalz. Wie später ausgeführt werden soll, ist es bei den Versuchen mit Blut und Peroxydasen unumgänglich, immer Lösungen gleichen Salzgehaltes anzuwenden. Bei allen

Versuchen unter Verwendung der Benzidinblaureaktion ist es nötig, einen hinreichenden Überschuß von Benzidinlösung anzuwenden. Man muß daher in dem Filtrat des Benzidinblaus prüfen, ob aus demselben etwa durch Jodlösung noch eine reichliche Menge Benzidinblau ausgefällt wird. Als Anhaltspunkt sei erwähnt, daß für $\frac{1}{100}$ n-Jodlösung oder andere Oxydationsmittel entsprechender Wirksamkeit mindestens die zehnfache Menge gesättigter Benzidinlösung notwendig ist.

Über die Oxydations- und Aktivierungsfähigkeit der Eisensalze.¹⁾

Untersucht wurde die Oxydationswirkung von Salzen des zwei- und dreiwertigen Eisens unter Verwendung von Benzidinlösung für sich und in Kombination mit Wasserstoffperoxyd.

Salze des dreiwertigen Eisens können bekanntlich auch für sich oxydierende Eigenschaften besitzen. Schlenk²⁾ stellte z. B. gerade die von ihm untersuchten Homologen des Benzidinblaus dar durch Einwirkung von Ferrichlorid auf die alkoholische Lösung der entsprechenden Basen.

Wenn man indessen versucht in wässriger Lösung Benzidin durch bestimmte Mengen eines Salzes des dreiwertigen Eisens zu oxydieren, so zeigt sich sogleich, daß die gebildete Menge Benzidinblau auch nicht annähernd der Menge des Eisensalzes entspricht. Wenn man die verdünnte Lösung eines dreiwertigen Eisensalzes einige Zeit stehen läßt, so besitzt sie gar keine oxydierenden Eigenschaften mehr, ebensowenig wenn man sie mit einem Salz einer organischen Säure, z. B. Natriumacetat versetzt. So lange Ferrisalzlösung für sich oxydierende Eigenschaften besitzt, wird ihre Oxydationsfähigkeit durch Zusatz von Wasserstoffperoxyd enorm verstärkt. Es ist mir in diesem Falle nicht gelungen, die Oxydation des Benzidins auf der Stufe des Benzidinblaus zu halten. Es entstanden vielmehr immer braunrote, vielleicht dem Dichlorimid entsprechende Produkte. Wenn man indessen der Lösung des Ferrisalzes durch Zusatz von Natriumacetat seine Oxydationsfähigkeit nimmt,

¹⁾ Für die qualitative Untersuchung des Gegenstandes vgl. E. d. Schaefer, Arch. d. Pharm., Bd. CCXXXIX, S. 257, 340, 610 (1901); Annalen d. Chem. u. Pharm., Bd. CCCXXIII, S. 32 (1904).

²⁾ loc. cit.

so bleibt ein Zusatz von Wasserstoffperoxyd ohne jeden Einfluß.

Ferrosalze haben natürlich keine oxydierenden Eigenschaften, vermögen aber, wie zuerst Schönbein¹⁾ gezeigt hat, Wasserstoffperoxyd zu aktivieren. Die Aktivierungsfähigkeit der Ferrosalze auf Wasserstoffperoxyd ist in ihren quantitativen Beziehungen bisher fast nur hinsichtlich der Einwirkung dieser Stoffe auf Jodwasserstoff untersucht worden. Brode²⁾ zeigte in einer wertvollen Untersuchung über die Katalyse bei der Reaktion zwischen Wasserstoffperoxyd und Jodwasserstoff, daß die Zersetzung des Jodwasserstoffs durch Wasserstoffperoxyd zwar an und für sich durch Vermehrung der H-Ionen beschleunigt wird, daß dagegen die katalytische Beschleunigung dieser Zersetzung durch Ferrosalz bei Vermehrung der Säure herabgesetzt wird. Für diese Herabsetzung sind nicht die H-Ionen, sondern die Anionen verantwortlich zu machen, denn die gleiche Herabsetzung der katalytischen Beschleunigung durch Ferrosalze wird auch durch Neutralsalze bewirkt.

Manhot³⁾ wies, wie schon angeführt wurde, nach, daß in neutraler Lösung Ferrosalze gar keine eigentlich katalytische Wirkung auf Lösungen von Jodalkali und Wasserstoffperoxyd besitzen. Er fand, daß das freiwerdende Jod sich nach kurzer Zeit nicht mehr vermehrt und daß dann ein Molekül Ferrosalz unter Übergang in Ferrisalz zwischen ein und zwei Atomen Jod in Freiheit gesetzt hat. Manhot erklärt diesen Befund in der Weise, daß er die Existenzfähigkeit fünfwertigen Eisens annimmt, das sich zunächst bilden soll und unter Übergang in dreiwertiges bis zu zwei Atomen Jod in Freiheit setzt.

Für die quantitative Bestimmung der Aktivierung des Wasserstoffperoxyds durch Ferrosalz in neutraler Lösung ist nun die Benzidinmethode vorzüglich geeignet. Man muß jedoch, um brauchbare Resultate zu erhalten, unter den nötigen Vorichtsmaßregeln arbeiten. Diese bestehen darin, daß man bei reichlichem Überschuß von Benzidin arbeitet und es vermeidet,

¹⁾ loc. cit.

²⁾ Zeitschrift f. physikal. Chem., Bd. XXXVII, S. 257 (1901).

³⁾ loc. cit.

größere Mengen Wasserstoffperoxyd zuzusetzen, durch die das Benzidinblau weiter oxydiert werden kann, bevor es sich in unlöslichem Zustande ausgeschieden hat. Andernfalls bilden sich die braunen, vorher erwähnten Produkte.

Zu einem reichlichen Überschuß von Benzidinwasser wird eine abgemessene Menge einer $\frac{1}{100}$ -n-Ferroammoniumsulfatlösung gegeben und unter gutem Rühren eine sehr verdünnte $\frac{1}{10}$ — $\frac{1}{100}$ 0/0ige Lösung von Wasserstoffperoxyd tropfenweise hinzugefügt. Auf jeden Tropfen bildet sich sofort eine bestimmte Menge Benzidinblau, das nach seiner Ausscheidung durch weitere Mengen von Wasserstoffperoxyd nicht mehr verändert wird. Der Niederschlag, der neben dem gebildeten Benzidinblau das gesamte Eisen enthält, wird vom überschüssigen Wasserstoffperoxyd filtriert und mit salzhaltigem Wasser gut gewaschen. Der Niederschlag wird vom Filter abgespritzt, ein wenig Jodkalium hinzugefügt, mit Salzsäure übergossen und sofort mit $\frac{1}{100}$ -n-Thiosulfatlösung unter Zusatz von Stärkelösung titriert.

10 ccm $\frac{1}{100}$ -n-Ferroammonsulfat setzen Jod in Freiheit entsprechend Kubikzentimer $\frac{1}{100}$ -n-Thiosulfat:

sofort	im Verlauf einer $\frac{1}{2}$ Stunde
9,6 ccm	19,0 ccm
9,8 »	19,2 »
10,0 »	19,0 »

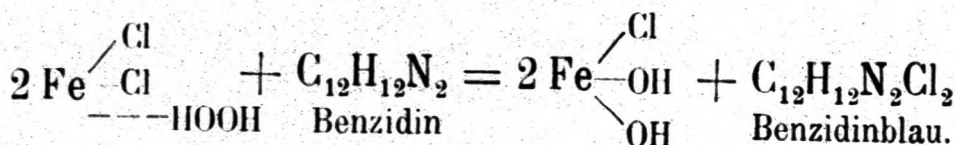
Wie die Bestimmungen zeigen, wird bei der Bestimmung des Oxydationswertes des Niederschlags sofort eine der molekularen Menge angewandten Ferrosalzes entsprechende Menge Jod frei. Die Lösung bläut aber sofort wieder nach, und man muß noch etwa die gleiche Menge Thiosulfat zusetzen, bis kein Jod mehr frei wird. Bei leichtem Anwärmen auf dem Wasserbad unter Luftabschluß scheidet sich noch annähernd die gleiche Menge Jod innerhalb einer halben Stunde ab. Das dem angewandten Molekül Ferrosalz entsprechende, zuerst sich bildende Atom Jod ist auf das gebildete Benzidinblau, das zweite auf das gebildete Ferrisalz zu beziehen.

Diese Befunde lassen die Deutung Manchots für seine Resultate sehr unwahrscheinlich erscheinen, denn es ist nicht einzusehen, warum in diesem Falle sich nicht auch fünfwertiges Eisen bilden soll. Die einfachste Erklärung scheint mir die zu sein, daß, wie auch Brode in seiner Untersuchung andeutet, ein Molekül Wasserstoffperoxyd sich primär zu einer

additionellen Verbindung an das Ferrosalz anlagert. Das erscheint um so wahrscheinlicher, als ja die Ferrosalze überhaupt zum Eingehen lockerer molekularer Verbindungen z. B. mit Stickoxyd, im ersten Stadium der Autoxydation sicher auch mit Sauerstoff, befähigt sind, andererseits die Neigung des Wasserstoffperoxyds, Molekularverbindungen einzugehen, in einer Reihe von Fällen nachgewiesen ist.¹⁾

Eine wesentliche Stütze dieser Auffassung findet sich in den Untersuchungen von Pellini und Meneghini.²⁾ Es gelang diesen Forschern, die ersten Einwirkungsprodukte des Wasserstoffperoxyds auf Eisenverbindungen aus alkoholischer Lösung bei sehr tiefer Temperatur als leicht zersetzliche Körper zu isolieren. Sie erhielten auf diese Weise aus Ferrohydroxyd, Ferro- und Ferrichlorid Körper von superoxydartigen Eigenschaften, deren Oxydationsstufe, gemessen an der Wirkung auf Jodwasserstoff, sich einer solchen vierwertigen Eisens bzw. einer Vereinigung der Ferroverbindung mit einem Molekül Wasserstoffperoxyd näherte, sie jedenfalls nicht übertraf. Ferrhydroxyd blieb auch in den Versuchen ohne Einwirkung auf Wasserstoffperoxyd; Ferrichlorid muß jedenfalls zunächst zur Ferroform reduziert worden sein, also selber auf Wasserstoffperoxyd oxydierend wirken können.

Das zunächst nur molekulare Bindung an Nebervalenzen etwa im Wernerschen³⁾ Sinne aufweisende Anlagerungsprodukt zerfällt, indem sich bei Anwesenheit von Benzidin unter Abgabe je eines Atomes Chlor Benzidinblau bildet.



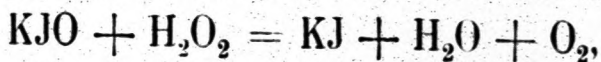
Das sich nach diesem Schema bildende basische Ferri-

¹⁾ Willstätter, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVI, S. 1828 (1903). — F. Wiede, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXI, S. 516 und Bd. XXXII, S. 378 (1898). — Tanatar, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXII, S. 1544, und Zeitschrift f. anorg. Chem., Bd. XXVIII, S. 255 (1901). — W. Staedel, Zeitschrift f. angew. Chem., Bd. XV, S. 642 (1902.)

²⁾ Zeitschrift für anorg. Chem., Bd. XLII, S. 203.

³⁾ A. Werner, Neuere Anschauungen auf dem Gebiete der anorganischen Chemie, Braunschweig 1909, bei Vieweg.

chlorid kann natürlich noch weiter hydrolytisch zerfallen. Jedenfalls schaltet es wie anderes z. B. mit Natriumacetat versetztes und also hydrolytisch zerfallenes Ferrisalz für eine weitere Aktivierung von Wasserstoffperoxyd vollkommen aus. Bei dem Versuche Manchots bildet sich indessen unter Zerfall des ersten Anlagerungsproduktes Jod und basisches Ferrijodid. Letzteres zerfällt nun weiter hydrolytisch unter Bildung von Jodwasserstoff. Da Jodwasserstoff aber auch ohne Mitwirkung von Eisen durch Wasserstoffperoxyd zersetzt wird, ist der Befund von mehr als einem Atom Jod auf das Molekül Ferrosalz weiter nicht überraschend. Aus einer wirklich neutralen Lösung von Jodalkali wird durch Wasserstoffperoxyd Jod nur unwesentlich, vermutlich nur in dem Maße, als dieses selber saure Eigenschaften besitzt, in Freiheit gesetzt werden können. In gleichem Maße wie Jod bildet sich nämlich Alkalihydrat und daraus Hypojodit. Hypojodit reagiert aber mit Wasserstoffperoxyd gerade im umgekehrten Sinne nach dem Schema



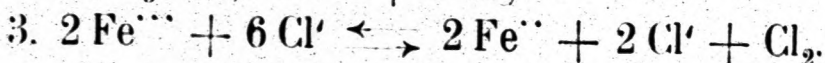
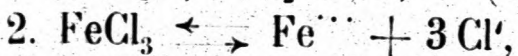
eine Reaktion, die nach Rupp¹⁾ als die bequemste Methode zur quantitativen Bestimmung des Wasserstoffperoxyds dienen kann.

Wenn man jetzt nach dem Grunde fragt, warum in neutraler Lösung die Oxydation oxydierbarer Stoffe in Gegenwart des Systems Ferrosalz-Wasserstoffperoxyd als einfache induzierte Reaktion verläuft, in saurer Lösung als katalytische Reaktion, so erklärt sich diese Tatsache dadurch, daß in neutraler Lösung das Eisen mit dem Übergange zur Dreiwertigkeit als basisches Salz oder Hydroxyd aus der Reaktion ausscheidet. In saurer Lösung wird sich dagegen immer eine gewisse Menge nicht hydrolysierten Ferrisalzes bilden, das ja auch als solches oxydierende Eigenschaft hat.

Da es durch seine oxydierende Tätigkeit wieder die Zweiwertigkeit zurück erlangt, kann eine weitere Menge Wasserstoffperoxyd in Aktion treten. Die Tätigkeit jedes einzelnen Eisensalzmoleküls wird also gekennzeichnet sein als ein fortwährendes Pendeln zwischen direkter Oxydation und induzierter Oxydation.

¹⁾ Archiv f. Pharm., 1907, S. 6.

Wenn man ein Salz des dreiwertigen Eisens z. B. Ferrichlorid in Wasser löst, so enthält die Lösung ein sehr kompliziertes Gemisch, nämlich erstens den in verschiedenen Graden hydrolytisch zerfallenden Anteil, dessen eisenhaltige Bestandteile als Hydroxyd und basisches Salz wohl nur kolloidal gelöst und zu keiner oxydierenden Tätigkeit befähigt sind, zweitens den nicht hydrolysierten Anteil, der aber zum Teil in die Ionen des dreiwertigen Eisens und Chlorionen zerfallen kann. Damit nicht genug, muß man auch noch das Vorhandensein zweiwertigen Eisens in der Lösung, sowie der anderen Komponente, des Chlors, in nicht ionisiertem Zustande annehmen. Es wird sich zwischen allen diesen Bestandteilen ein kompliziertes Gleichgewicht herstellen, das man sich unter Vernachlässigung verschiedener Zwischenglieder etwa folgendermaßen schematisch darstellen kann:



In diesem komplizierten System kommt für die direkte wie für die induzierte Oxydation wesentlich die dritte Gleichung in Betracht; es ist aber klar, daß irgend ein Faktor, der andere Bestandteile des Systems beeinflusst, auch auf diesen Teil von Einfluß sein muß.

Es wird also verständlich, daß nicht nur Abwesenheit von Säure, bei der das Gleichgewicht in der ersten Gleichung nach der rechten Seite, sondern auch eine größere Menge Säure oder Salz, die das Gleichgewicht in der zweiten Gleichung nach links verschiebt, eine oxydierende Tätigkeit dreiwertiger Eisen-salze überhaupt, sowie auch bei Gegenwart von Wasserstoffperoxyd die Geschwindigkeit der Katalyse behindert. Die Geschwindigkeit der Katalyse selber muß, da die induzierte Oxydation mittels Wasserstoffperoxyd faßt momentan zu Ende geführt wird, außerdem wesentlich davon abhängen, mit welcher Geschwindigkeit der Reaktionsverlauf der dritten Gleichung von links nach rechts erfolgt. Aus der Zeit, die für vollständige Zersetzung von Jodwasserstoff durch Eisenchlorid erforderlich ist, läßt sich nur auf mäßige Reaktionsgeschwindigkeit schließen.

Von den bisherigen Ausführungen nicht berührt bleibt die schon von Schönbein¹⁾ beobachtete Tatsache, daß schon äußerst geringe Säuremengen die Aktivierung des Wasserstoffperoxyds durch Ferrosalze enorm beeinträchtigen. So wird die außerordentlich empfindliche Reaktion der Bläuung von Guajak in Gegenwart von Ferrosalz und Spuren von Wasserstoffperoxyd durch sehr geringe Säuremengen unterdrückt. Ferner ist nach Manchots Befund¹⁾ die Anfangsgeschwindigkeit der Katalyse des Jodwasserstoffs in Gegenwart von Wasserstoffperoxyd und Säure, die mit Ferrosalz als Katalysator wohl erheblich größer ist, als mit Ferrisalz, doch nicht annähernd so groß, wie die der fast momentan erfolgenden Zersetzung des Jodkaliums durch Wasserstoffperoxyd in Gegenwart von neutralem Ferrosalz; auch hat Manchot²⁾ gefunden, daß bei Anwesenheit von Säure Ferrosalz sich noch minutenlang neben Wasserstoffperoxyd nachweisen läßt.

Es liegt nahe, diese Erscheinungen mit der hydrolytischen Komponente gelöster Ferrosalze in Beziehung zu bringen und dieser eine größere Reaktionsgeschwindigkeit mit Wasserstoffperoxyd zuzuschreiben als dem nicht hydrolytisch zerfallenen Ferrosalz. Eine solche Erklärung scheint aber im Widerspruch zu stehen mit den schon erwähnten Resultaten von Pellini und Meneghini. Wenn man das erste Einwirkungsprodukt des Wasserstoffperoxyds auf Ferrosalz als Molekularverbindung im Wernerschen Sinne auffaßt, gewinnt eine andere Deutung sehr an Wahrscheinlichkeit. Bekanntlich sind gerade die Säuren befähigt, mit vielen Salzen, die zur Komplexbildung überhaupt befähigt sind, auch zu Komplexverbindungen zusammen zu treten. Die Annahme eines Komplexes in der Lösung von Ferrosalz und Säure ist zum mindesten nicht unwahrscheinlich. Wenn also die Nebervalenzen des Ferrosalzes durch Säuremoleküle besetzt sind, wird für das Wasserstoffperoxyd kein Platz mehr vorhanden sein. Das letztere muß also, entsprechend der anwesenden Menge und der Affinität, sich mit der Säure in das disponible Ferrosalz teilen. Diese Auffassung vom Ein-

¹⁾ loc. cit.

²⁾ loc. cit.

fluß der Säure gewinnt an Wahrscheinlichkeit dadurch, daß auch in Fällen, in denen sicher die Bildung von Molekularverbindungen erfolgt, diese durch Säure hintangehalten oder beschränkt wird. So wird z. B. die Aufnahme von Kohlenoxyd oder Äthylen durch Cuprosalz bei Anwesenheit von Säure eingeschränkt, Beobachtungen Manchots,¹⁾ die dieser im gleichen Sinne erklärt. Die Verhinderung der Autoxydation von Ferrosalzen, die in erster Phase vermutlich über ein Moloxyd führt, bei Gegenwart von Säure läßt sich vielleicht in ähnlicher Weise deuten.

Andere Beispiele anorganischer Oxydationskatalyse.

Die im Vorstehenden zur Darstellung gebrachten Anschauungen über die Oxydationskatalyse finden ihre Bestätigung durch das Verhalten anderer auf Wasserstoffperoxyd aktivierend wirkender Stoffe. Die Kupfersalze stimmen in ihrem Verhalten mit den Eisensalzen insofern vollständig überein, als sie in zwei um eine Valenz verschiedenen Wertigkeiten vorkommen. Wie die Ferrosalze sind ferner auch die Cuprosalze besonders zur Bildung molekularer Anlagerungsverbindungen befähigt. Wie bei den Ferrisalzen muß man auch in der Lösung von Cuprisalzen ein Gleichgewicht zwischen undissoziiertem Cuprisalz bzw. dessen Ionen einerseits und Cuprosalz plus dessen entladenen Kationen andererseits annehmen.

Dagegen unterscheiden sich die Cuprisalze sehr wesentlich von den Eisensalzen dadurch, daß sie keinen hydrolytischen Zerfall erleiden, der zur Bildung nicht mehr oxydierender Produkte führt. Im Gegenteil hat Schaer²⁾ gezeigt, daß durch manche Stoffe alkalischer Natur — Ammoniak, Alkaloide — die oxydierenden Eigenschaften der Kupfersalze wesentlich vermehrt werden. Man wird also schon von vornherein annehmen dürfen, daß eine Aktivierung von Wasserstoffperoxyd durch Kupfersalze auch in neutraler Lösung katalytisch verlaufen wird. Das ist in der Tat der Fall.

¹⁾ Annalen der Chem. und Pharm., Bd. CCCLIX, S. 100 (1908); Bd. CCCLXX, S. 286 (1909).

²⁾ Arch. d. Pharm., Bd. CCXXXIX, S. 610 (1901).

Auch Cuprisalze wirken schon für sich auf Benzidin unter Benzidinblaubildung: die Geschwindigkeit und der Umfang der Oxydation ist aber natürlich nicht nur von der Konzentration der Kupferionen, sondern mehr noch von der Natur der in Lösung befindlichen Anionen abhängig. Während durch Kupfernitrat allein auch nach längerer Zeit keine Benzidinblaubildung auftritt, wird nach Zugabe eines Chlorids etwa binnen einer Minute eine erhebliche Menge gebildet. Auf Zusatz eines Jodids, Cyanids oder Rhodanids fällt fast momentan die Gesamtmenge des sich bildenden Benzidinblaus aus. Eine genaue Bestimmung des Benzidinblaus ist wegen des gleichzeitigen Ausfallens von Kupfersalz auf titrimetrischem Wege nicht möglich; doch wird man wohl in letzterem Falle entsprechend dem fast vollständigen Zerfall des Kupferjodids bzw. Cyanids auf Bildung annähernd molekularer Mengen Benzidinblau schließen können. Wenn man zu einer salzhaltigen Lösung von überschüssigem Benzidin und Wasserstoffperoxyd eine abgemessene Menge Kupfersalz gibt, so vermehrt sich dauernd die Menge des ausgeschiedenen Benzidinblaus und man findet nach einiger Zeit die vielfach molekulare Menge des angewandten Kupfers. So fand ich z. B. nach einstündiger Einwirkung die 65fach molekulare Menge des angewandten Kupferbromids an Benzidinblau. Wie bei den Eisensalzen als einfache induzierte Reaktion, wird die Oxydation in diesem Falle als Katalyse durch sehr kleine Säuremengen enorm behindert.

Es gibt noch verschiedene andere anorganische Stoffe, die die Fähigkeit haben, Wasserstoffperoxyd unter Benzidinblaubildung katalytisch zu aktivieren, so z. B. komplexe Cobaltsalze, sowie Chrom- und Molybdänsäure; sie haben alle die Eigenschaft, in mehreren Oxydationsstufen aufzutreten und in der höheren auch für sich oxydierende Wirkung auszuüben.

Das gleiche gilt auch nach den Untersuchungen von Engler und Wöhler¹⁾ für fein verteiltes Platin und Palladium: nur wird man, ebenso wie diese Forscher, die Aktivierung des Sauerstoffs durch die primäre Anlagerung dieses und Bildung eines Peroxyds oder Peroxyhydrats erklären, für die Aktivie-

¹⁾ Zeitschrift f. anorg. Chem., Bd. XXIX, S. 1 (1902).

zung des Wasserstoffperoxyds eine primäre Anlagerung des letzteren annehmen können. In beiden Fällen müssen die ersten Anlagerungsprodukte zerfallen unter Bildung niederer Oxyde, die aber für sich auch noch oxydierende Eigenschaften besitzen.

Mangansalze sind in den künstlichen Oxydasen von Trillat¹⁾ und Dony-Henault¹⁾ und ebenso in der durch ihren Mangan-gehalt wirksamen Lakkase nur in schwach alkalischer Lösung wirksam. Alkalische Reaktion schließt aber Benzidinblaubildung aus und man kann mit Sicherheit sagen, daß, wann immer eine Oxydase oder Peroxydase Benzidinblaubildung verursacht, dies jedenfalls nicht durch einen allenfalls vorhandenen Mangan-gehalt erklärt werden kann.

Über die Aktivierung des Wasserstoffperoxyds durch Blut- oder Peroxydasen.

Wie schon in der Einleitung erwähnt, ist es mir gelungen, die Benzidinblaureaktion zu einer einfachen Bestimmungsmethode der Aktivierungsfähigkeit von Peroxydasen und Hämoglobin auszubilden. Die verschiedenen recht auffälligen Erscheinungen bei der Bildung des Benzidinblaus, die ohne Kenntnis der Natur desselben nur schwer eine Deutung zuließen, finden jetzt eine einfache Erklärung. Wenn man zu einer wässerigen Benzidinlösung Wasserstoffperoxyd und ein wenig Blutlösung oder Peroxydase, z. B. Malzextrakt, gibt, so kann man unter Voraussetzung vollständigen Fehlens von Säure oder Salz auch nach längerer Zeit keine Spur von Blaufärbung beobachten. Wenn man jetzt zu der Lösung eine Spur Säure hinzufügt, so tritt je nach der Menge der zugesetzten Peroxydase die Blaufärbung mit größerer oder geringerer Intensität auf und blaßt nach Erreichung eines Maximums wieder ab. Die notwendige Säuremenge ist äußerst minimal. Es genügt ein Tropfen verdünnter Essigsäure; ja sogar Einleiten von Kohlensäure genügt, um bei Anwesenheit hinreichender Menge Peroxydase intensive Färbung hervorzurufen. Größere Mengen Säure dagegen, besonders Mineralsäure, verhindern die Reaktion.

Es zeigte sich nun, daß nicht nur Säure, sondern auch

¹⁾ loc. cit.

Neutralsalze von Mineralsäuren Bildung des Benzidinblaus veranlassen; aber in diesem Falle scheidet sich das Benzidinblau in Form mikroskopischer Nadelchen aus und der einmal ausgeschiedene Körper wird nicht wieder zerstört. Er kann jetzt vom überschüssigen Wasserstoffperoxyd getrennt und seine Menge jodometrisch bestimmt werden. Die quantitativen Bestimmungen zeigen nun, daß bei hinreichendem, aber nicht notwendig gleichbleibendem Überschuß von Benzidin und Wasserstoffperoxyd die in gleichen Zeiten gebildeten Mengen Benzidinblau genau proportional der Menge angewandten Blutes oder Peroxydase sind unter gleichen Bedingungen des Salz- oder Säuregehaltes, daß dagegen die gleichzeitig in der Lösung enthaltene Menge Salz bzw. Säure von starkem Einfluß auf die Geschwindigkeit der Reaktion, sowie die Menge des sich bildenden Benzidinblaus ist. Für die Untersuchung der Aktivierungsfähigkeit des Hämoglobins wurden verschiedene Proben einprozentiger Lösungen von defibriniertem Kaninchenblut benutzt.¹⁾

Die Bestimmungen wurden, soweit nicht anders angegeben, alle in der Weise angestellt, daß die Blutlösung aus einer graduierten Pipette zu etwa einem halben Liter einer ein Prozent Kochsalz enthaltenden Benzidinlösung gegeben und etwa 5 ccm, d. i. ein großer Überschuß einer einprozentigen Wasserstoffperoxydlösung hinzugefügt wurde. Die Bildungsgeschwindigkeit des Benzidinblaus, die in den ersten Minuten recht erheblich ist, wird nach kurzer Zeit nur noch ziemlich geringfügig, so daß es nach etwa 10 Minuten nicht mehr sehr viel ausmacht, ob sofort die Bestimmung ausgeführt wird, oder ein paar Minuten später. Der Grund dafür ist darin zu suchen, daß das

¹⁾ Man hat Grund, in solchen Lösungen die aktivierenden Eigenschaften fast ausschließlich dem darin enthaltenen Hämoglobin zuzuschreiben, da das Serum völlig unwirksam ist, während die jedenfalls wirksamen, aber sehr spärlichen Leukocyten ebenso wie die Stromata der Erythrocyten sich zu Boden senken, ohne daß dadurch die Wirksamkeit merkbar beeinträchtigt wird. In den Erythrocyten neben dem Hämoglobin noch das Vorhandensein einer Peroxydase zu vermuten, liegt kein Anlaß vor. Von Interesse ist an dieser Stelle der kürzlich von R. Fischel gerade mittels der Benzidinreaktion durchgeführte Nachweis, daß die Peroxydase der Leukocyten in den Granulis lokalisiert ist. Wiener klin. Wochenschrift, Bd. XXIII, S. 1557 (1910).

Die Versuchsreihe zeigt, daß schon geringe Mengen Mineralsäure die Bildung von Benzidinblau überhaupt verhindern, daß dagegen, wenn die Konzentration der Wasserstoffionen durch Zusatz von Natriumacetat hinreichend herabgedrückt wird, die Menge des gebildeten Benzidinblaus bis zur doppelten Menge der ohne Säurezusatz gebildeten Menge steigen kann; dasselbe gilt, wenn in die Lösung Kohlensäure eingeleitet wird.

Versuchsreihe 3.

An verschiedenen Blutlösungen wurde die Wirkung des Einleitens von Kohlensäure bestimmt.

Je 1 ccm Blutlösung verursachte Benzidinblaubildung entspr. Kubikzentimeter $\frac{1}{100}$ -n-Thiosulfatlösung.

	Ohne Einleiten von CO_2	Mit Einleiten von CO_2
a)	4,2 ccm	8,4 ccm
b)	4,8 »	9,5 »
c)	2,8 »	5,5 »
d)	3,5 »	7,6 »
e)	5,1 »	10,2 »

Die Versuchsreihe zeigt, daß das unter Kohlensäureeinleiten ausgefällte Benzidinblau ziemlich genau die doppelte Menge dessen beträgt, was ohne Kohlensäureeinleiten ausfällt. Wenn der Körper ohne Einleiten von Kohlensäure schon ausgefallen ist, so erhält man bei nachträglichem Einleiten ebenfalls noch einmal die gleiche Menge. Da das Benzidinblau unter Kohlensäureeinleiten meistens in besonders gut filtrierbarer Form ausfiel und unter sicherstem Einhalten gleicher Bedingungen bezüglich der Acidität der Lösung, wurden die weiteren Versuche immer unter Kohlensäureeinleiten ausgeführt.

Versuchsreihe 4.

Die Versuchsreihe bezieht sich auf Bestimmungen verschiedener Mengen der gleichen Blutlösung unter Einleiten von Kohlensäure.

Menge Blutlösung	entspr. $\frac{1}{100}$ -n-Thiosulfatlösung
0,5 ccm	3,2 ccm
0,5 »	3,2 »
1 »	6,4 »
1 »	6,3 »
2 »	12,6 »

Versuchsreihe 5.

Der Einfluß des Salzgehaltes der Lösung wurde bestimmt bei Anwendung von 1 ccm Blutlösung.

NaCl-Gehalt der Benzidinlösung

NaCl-Gehalt	entspr. $\frac{1}{100}$ -n-Thiosulfatlösung
1% NaCl	7,6 ccm
1% »	7,5 »
2% »	5,1 »
Annähernd gesättigt	2,9 »

Die Versuchsreihe zeigt, daß für die Geschwindigkeit der Benzidinblaubildung ein Optimum des Salzgehaltes besteht, das bei einem Gehalt von einem Prozent vermutlich schon überschritten ist. Diese Konzentration wurde für alle Versuche beibehalten, weil sie geeignet ist, die Löslichkeit des Benzidinblaus völlig zu unterdrücken, wenigstens bei Abwesenheit größerer Mengen kolloidaler Substanz, durch welche die Abscheidung in krystallinischer, unlöslicher Form behindert wird.

Versuchsreihe 6.

Benzidinblaubildung in verschiedenen Zeiten durch je 1 ccm mehrerer Blutlösungen.

Blutlösung a)	nach 10 Min.	entspr. 8,3 ccm	$\frac{1}{100}$ -n-Thiosulfatlösung
»	»	20 »	» 9,2 »
»	»	6 Std.	» 11,9 »
»	»	22 »	» 18,2 »
»	»	48 »	» 18,4 »
»	b)	10 Min.	» 5,5 »
»	»	24 Std.	» 15,4 »
»	c)	10 Min.	» 4,5 »
»	»	10 »	» 4,6 »
»	»	20 Std.	» 12,7 »
»	»	20 »	» 12,5 »
»	»	20 »	» 13,0 »

Die Versuche zeigen, daß noch während einer Reihe von Stunden die Menge des ausgeschiedenen Benzidinblaus sich vermehrt, nach 24 Stunden aber anscheinend keine weitere Vermehrung stattfindet. In den ersten Minuten findet die Ausscheidung von etwas über einem Drittel des überhaupt sich bildenden Benzidinblaus statt. Die Verhältnisse verschieben sich bei Anwesenheit von etwas freier Säure in der Lösung. Die Bildung des Körpers ist in diesem Falle anfangs langsam, doch scheiden sich beim Stehen größere Mengen aus. Gleichzeitig zeigt aber die dunkle Farbe der Mutterlauge, daß auch andersartige Oxydationen stattgefunden haben.

Interessant ist in diesem Zusammenhange eine Berechnung, welche Menge aktivierten Wasserstoffperoxyds annähernd auf ein Atom Eisen im Blut fällt. Nach Analysen Abderhaldens und anderer kann man Blut hinsichtlich seines Eisengehaltes als annähernd $\frac{1}{100}$ -normal ansehen. Da das Blut in 1%iger Lösung angewandt wurde, war es also für Eisen ca. $\frac{1}{10000}$ -normal. 1 ccm dieser Lösung entsprachen ca. 18 ccm $\frac{1}{100}$ -n-Thiosulfat = ca. 9 ccm $\frac{1}{100}$ -n-Wasserstoffperoxyd, d. h. also, es kann unter den angegebenen Bedingungen mehr als die neunhundertfache, rund die tausendfache molekulare Menge des im Blut enthaltenen Eisens an Wasserstoffperoxyd aktiviert werden.

Wenn man bedenkt, daß stark gefärbte Lösung von Benzidinblau

beim Ausfällen durch Salz kaum messbare Mengen des festen Körpers geben, kann man daraus ferner auf die enorme Empfindlichkeit der Benzidinblaureaktion als qualitativer Reaktion schließen.

Versuchsreihe 7.

Einfluß der Einwirkung von Kohlenoxyd.

Je 1 ccm Blutlösung entspr. Kubikzentimeter $\frac{1}{100}$ -n-Thiosulfatlösung.

Nach Einleiten von CO

a)	5,5 ccm	7,0 ccm
b)	8,4 »	9,5 »
c)	6,0 »	6,0 »
d)	4,6 »	4,5 »
e)	5,4 »	6,1 »

Nach diesen Versuchen scheint Kohlenoxydblut in einzelnen Fällen etwas stärkere Wirkung zu haben als das entsprechende kohlenoxydfreie Blut.

Versuchsreihe 8.

Vergleich der Wirksamkeit mit dem Hämoglobingehalt.

Je 1 ccm Blutlösung entspr. Kubikzentimeter $\frac{1}{100}$ -n-Thiosulfatlösung.

	Thiosulfatlösung	Hb-Zahl nach Haldane
a)	9,0 ccm	88
b)	9,0 »	87
c)	7,1 »	75
d)	5,0 »	65

In dieser Versuchsreihe wurde versucht, die Benzidinmethode praktisch für die Bestimmung des Hämoglobingehaltes verschiedener Blutproben zu verwenden, deren Gehalt zur Kontrolle kolorimetrisch nach der Haldaneschen ¹⁾ Methode bestimmt war. Die Versuche zeigen weitgehenden Parallelismus, wenn auch vielleicht kein völliges Zusammenfallen des Aktivierungsvermögens mit dem kolorimetrisch bestimmten Hämoglobingehalt.

Versuchsreihe 9.

Einfluß der Zersetzung des Hämoglobins auf das Aktivierungsvermögen desselben.

1 ccm der gleichen Blutlösung entspr. Kubikzentimeter $\frac{1}{100}$ -n-Thiosulfatlösung:

Am	1. Tag	6,4 ccm
»	3. »	5,5 »
»	4. »	5,3 »
»	6. »	5,5 »
»	8. »	5,4 »
»	10. »	5,7 »

¹⁾ Journ. of physiol., Bd. XXVI, S. 497.

Diese Reihe bezieht sich auf eine Untersuchung, in welcher Weise das Aktivierungsvermögen des Blutes durch Selbstverdauung und Zersetzung beeinflusst wird. Die Versuche zeigen, daß das Aktivierungsvermögen auch durch ziemlich weitgehende Zersetzung — Farbumschlag und Fäulnis — nicht wesentlich beeinflusst wird. Die relativ starke Abnahme am ersten Tage scheint auf einem Versehen zu beruhen, da in anderen Fällen unter gleichen Bedingungen keine Abnahme konstatiert wurde.

Versuchsreihe 10.

Einwirkung überschüssiger Blutlösung auf Wasserstoffperoxyd.

Die Benzidinlösung wurde mit 10 ccm Blutlösung und Wasserstoffperoxyd entspr. 8 ccm $\frac{1}{100}$ -n-Jodlösung versetzt. Das ausgeschiedene Benzidinblau entspr. Kubikzentimeter $\frac{1}{100}$ -n-Thiosulfatlösung:

Nach 10 Minuten	4,4 ccm	
» 10 »	4,3 »	
» 10 »	2,6 »	ohne CO ₂ -Einleiten
» 4 Stunden	7,0 »	
» 20 »	6,9 »	
» 20 »	3,9 »	ohne CO ₂ -Einleiten.

Die Bestimmungen bezweckten eine Untersuchung über die Frage, ein wie großer Teil des Wasserstoffperoxyds bei Überschuß von Blut im Sinne der Oxydation des Benzidins wirksam ist. Die Versuche zeigen, daß $\frac{7}{8}$ des anwesenden Wasserstoffperoxyds in diesem Sinne ausgenützt sind, also höchstens $\frac{1}{8}$ durch Katalasewirkung zersetzt sein kann. Bei Abwesenheit von Kohlensäure kann nur die Hälfte des Wasserstoffperoxyds aktiviert werden.

Versuchsreihe 11.

Beeinflussung der Wirksamkeit von Blutlösung durch vorhergehende Einwirkung von Wasserstoffperoxyd.

Je 1 ccm Blutlösung entspr. nach Vorbehandlung mit 1 ccm 1%iger Wasserstoffperoxydlösung Kubikzentimeter $\frac{1}{100}$ -n-Thiosulfatlösung.

Dauer der Einwirkung des Wasserstoffperoxyds:

0 Min.	5,7 ccm
5 »	4,0 »
10 »	6,7 »
15 »	8,0 »

Da durch längere Einwirkung von Wasserstoffperoxyd die Aktivierungsfähigkeit vom Blut ganz aufgehoben wird, könnte man annehmen, daß das schließliche Erlahmen der Katalyse auf die Einwirkung des Wasserstoffperoxydes selber zurückzuführen sei. Die Versuche zeigen, daß, wenn diese Vermutung vielleicht auch richtig ist, die Einwirkung von Wasserstoffperoxyd doch keine kontinuierlich abschwächende sein kann, das Aktivierungsvermögen von Blut sogar unter der Einwirkung von Wasserstoffperoxyd gesteigert werden kann.

Theorie der Oxydationskatalyse durch Hämoglobin.

Die theoretische Deutung der im Vorstehenden beschriebenen Resultate wird einerseits bedingt durch die bekannten Eigenschaften des Benzidinblaus, andererseits durch die Eigenschaften des Hämoglobins und seiner Umwandlungs- und Spaltungsprodukte, über die wir in letzter Zeit durch die Untersuchungen Willstätters, Küsters und anderer Forscher doch ziemlich klare Vorstellungen bekommen haben, sowie schließlich durch die Kenntnisse und Anschauungen, die wir über die anorganische Oxydationskatalyse gewonnen haben.

Die Eigenschaften des Benzidinblaus sind, soweit sie in Betracht kommen, hauptsächlich dadurch gegeben, daß dieses Oxydationsprodukt des Benzidins ein Salz ist. Die Möglichkeit seiner Entstehung liegt daher nur bei Gegenwart eines Stoffes vor, der geeignet ist, die Anionen des zu bildenden Salzes zu liefern. Durch Blut und Wasserstoffperoxyd allein kann daher ohne Mithilfe eines solchen Stoffes Benzidin nicht in wahrnehmbaren Mengen zu Benzidinblau oxydiert werden.

Als solche Stoffe kommen Säuren und Salze in Betracht, für das unlösliche Benzidinblau nur die Mineralsäuren und ihre Salze. Bei Anwendung von Säure verschwinden bei der Oxydation H-Ionen aus der Lösung, bei der von Salzen muß dementsprechend die Menge der OH-Ionen sich vermehren.

Vermehrung der OH-Ionen wirkt nun aber der Benzidinblaubildung gerade entgegen. Es wird also nur in dem Maße bei der Oxydation von Benzidin sich das blaue Farbsalz bilden können, als die Wirkung der OH-Ionen paralysiert werden kann, vermutlich durch das schwach saure Eigenschaften besitzende Wasserstoffperoxyd im Verein mit schon gebildetem Benzidinblau. Durch Neutralisieren der freien OH-Ionen muß also die Menge des entstehenden Benzidinblaus vermehrt werden. Da aber auch freie Säure schädlich wirkt, erhält man ein Optimum unter Bedingungen, die eine größere Konzentration von H-Ionen ausschließen, also etwa bei Gegenwart von Essigsäure und überschüssigem Natriumacetat, durch das die Menge der freien H-Ionen auf ein Minimum herabgedrückt wird, oder auch durch eine an und für sich so schwache Säure wie Kohlensäure.

Der starke Einfluß sehr geringer Mengen freier Säure, die die Aktivierung des Wasserstoffperoxyds ausschließen unter Bedingungen, die für die Wirkung direkter Oxydationsmittel, z. B. Jodlösung, ohne jeden Einfluß sind, ebenso auch der Einfluß der Salzkonzentration und andere Beobachtungen können nur aus der Natur der Oxydationskatalyse selber erklärt werden. Soweit für diese die Eigenschaften des Blutfarbstoffes in Betracht kommen, möchte ich auf die Ausführungen Küsters¹⁾ «Über die Valenz des Eisens in den Komponenten des Blutfarbstoffes und die Beziehungen derselben zu den Modifikationen des Hämoglobins» hinweisen, in denen die alte Frage nach den Beziehungen der Hämoglobinderivate auf Grund eigener und fremder Arbeiten in den Hauptpunkten wohl ihre endgültige Deutung findet.

Vom Hämoglobin dürfte feststehen, daß es eine Verbindung des zweiwertigen Eisens ist,²⁾ die als infolge der einen freien Valenz ungesättigte Verbindung befähigt ist, ebenso wie Ferro- und Cuproverbindungen sich mit ganzen Molekülen zu mehr oder minder lockeren, aber im Gegensatz zu analogen Verbindungen mit gesättigten Hauptvalenzen auch in wässriger Lösung existenzfähigen additionellen bzw. Molekularverbindungen zu vereinigen. Bekannt und leicht erkennbar ist dieses Verhalten hinsichtlich der Aufnahme von Gasen, wie Sauerstoff, Kohlenoxyd, Cyan, Stickoxyd, Äthylen und Acetylen, doch wird man ohne weiteres annehmen dürfen, daß auch andere Stoffe, wie das Wasserstoffperoxyd, ebenso wie es bei anderen Ferroverbindungen angenommen wurde, an das Eisen in eine engere Sphäre herangezogen werden können.

Methämoglobin, das bekanntlich auch durch Einwirkung von Wasserstoffperoxyd entstehende Oxydationsprodukt des Hämoglobins, ist dagegen eine Verbindung des dreiwertigen Eisens, in dem die freie Valenz des Hämoglobineisens durch eine Hy-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LXVI, S. 232 (1910).

²⁾ Die von W. Manchot auf Grund seiner Untersuchungen über das Gasbindungsvermögen von Salzlösungen und Blut ausgesprochene Ansicht, das Eisen im Hämoglobin sei als dreiwertig anzusprechen, glaube ich auf unrichtige Deutung seiner Resultate zurückführen zu können und werde eventuell an anderer Stelle darauf zurückkommen.

droxylgruppe abgesättigt ist, dafür aber die Fähigkeit zur Bildung von Molekularverbindungen verloren geht. Andererseits muß das Methämoglobin oxydierende Eigenschaften besitzen, wie aus seiner leichten Reduzierbarkeit zu Hämoglobin hervorgeht.

Die entsprechenden eiweißfreien Spaltungsprodukte sind dann das Hämochromogen, das dem Hämoglobin, und das α -Hämatin, das dem Methämoglobin entspricht. Hämin ist als salzsaures Salz des α -Hämatins zu betrachten. Man wird also in der Lösung des Hämins auch einen teilweisen Zerfall in Ionen annehmen müssen.

Hinsichtlich der Bindungsweise des Eisens erscheint die auch von Küster angenommene Vorstellung Willstätters¹⁾ am wahrscheinlichsten. Nach Willstätter ist im Blutfarbstoff das Eisen, wie im Chlorophyll das Magnesium, komplex, d. h. mit Haupt- und Nebervalenzen an die stickstoffhaltigen Gruppen des Moleküls gebunden, «in Übereinstimmung mit den Anschauungen von A. Werner²⁾ über die Konstitution von komplexen Metallverbindungen und in Analogie mit den von H. Ley³⁾ und von L. Tschugaeff⁴⁾ erforschten Metallderivaten der Säureimide, des Biurets und des Dicyandiamidins.» Im Falle des Blutfarbstoffes kann es sich nur um die Imidgruppen von Pyrrolgruppen handeln, aus denen sich nach den Untersuchungen von Piloty⁵⁾ das ganze Hämatinmolekül zusammensetzt.

Für die hier in Betracht kommende Frage ist jedenfalls maßgebend, daß in den Modifikationen des Hämoglobins und seiner ersten Zersetzungsprodukte das Eisenatom seine Wertigkeit wechseln kann, ohne daß hinsichtlich seiner Bindungsverhältnisse für zwei Hauptvalenzen eine wesentliche Änderung eintritt. Das Methämoglobin bzw. Hämatin unterscheidet sich also sehr wesentlich vom Ferrihydroxyd dadurch, daß es nicht oder wenigstens nicht so leicht wie dieses in neutraler Lösung sich polymerisiert und damit die oxydierenden Eigenschaften

1) Annalen der Chem. u. Pharm., Bd. CCCLXXI, S. 48 (1909).

2) loc. cit.

3) Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XL, S. 705 (1908).

4) Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XL, S. 1973 (1908).

5) Annalen der Chem. u. Pharm., Bd. CCCLXVI, S. 237 (1909).

des dreiwertigen Eisens einbüßt. Bei Gegenwart von Chlorionen wird aus Hämatin in wässriger Lösung sich immer zum Teil Hämin bilden müssen, das mit Hämatin in einem Gleichgewichtszustand stehen muß. Ferner muß man, da im Blutfarbstoff die Überführung des zweiwertigen Eisens in dreiwertiges auch in neutraler Lösung reversibel ist, auch in einer neutralen Methämoglobin- bzw. Hämatinlösung auf das Bestehen oder Streben nach Erreichung eines Gleichgewichtszustandes zwischen zwei- und dreiwertigem Eisen bestehen. Wie man sieht, sind beim Blutfarbstoff alle schon besprochenen Bedingungen der anorganischen Oxydationskatalyse erfüllt, und zwar entsprechen diese mehr denjenigen, die man bei dem Kupfer, als denen, die man bei anorganischen Eisenverbindungen vorfindet.

Wenn wir die Momente ins Auge fassen, die hier auf die Katalyse von Einfluß sind, so zeigt sich ebenfalls, daß sie in allen Fällen im Prinzip völlig die gleichen sind wie bei der anorganischen Oxydationskatalyse. Schon sehr kleine Säuremengen drücken die Geschwindigkeit der Katalyse enorm herab bzw. verhindern sie vollständig. Ähnliche Wirkung, wenn auch dem Grade und der Ursache nach verschieden, haben auch die Neutralsalze. Die bei der Besprechung der oxydierenden Eigenschaften der Eisensalze und der anorganischen Oxydationskatalyse versuchte Deutung dafür kann auch hier im vollen Maße ihre Anwendung finden. Daß tatsächlich nur der eisenhaltige Bestandteil des Hämoglobins für die Aktivierungsfähigkeit des Hämoglobins in Betracht kommt, geht daraus hervor, daß die bei vorsichtiger Zersetzung wie bei der Selbstverdauung sich bildenden Spaltungsprodukte, unter denen sich Hämochromogen bzw. das Zeynecksche oder α -Hämatin befinden müssen, annähernd die gleiche Wirksamkeit besitzen, wie frisches Hämoglobin. Die Spaltungs- und Umwandlungsprodukte brüsker Einwirkungen haben allerdings ihr Aktivierungsvermögen größtenteils eingebüßt. So erhält man mit gekochten Blutlösungen, und auch wenn das Blut mit Säure (Eisessig) oder Lauge zersetzt und nachher wieder sorgfältig neutralisiert wird, bei der Benzidinblaureaktion nur geringfügige Ausschei-

dungen. Nach Küster¹⁾ befindet sich ja auch das gewöhnliche oder β -Hämatin in einem polymeren Zustande und läßt sich auch nicht in Hämin umwandeln. Dagegen kann man vielleicht annehmen, daß bei einer teilweisen Lockerung der komplexen Bindung des Eisens durch Wasserstoffperoxyd zunächst eine Verbindung von stärker katalytischer Eigenschaft entsteht, als sie das Hämoglobin selber besitzt.

Für das allmähliche Schwächerwerden und Aufhören der katalytischen Wirksamkeit sind theoretisch zwei Erklärungen möglich. Entweder rührt es daher, daß sich Produkte der Katalyse bilden, die dieser entgegen wirken und sie schließlich zum Stillstand bringen, oder daß der Katalysator selber verändert und zerstört wird. Die bisher vorliegenden Beobachtungen können darüber zwar keine sichere Deutung zulassen, doch spricht wohl die Wahrscheinlichkeit in diesem Falle für die zweite Erklärung.

Schlußfolgerungen und Hypothesen allgemeinerer Natur.

Es liegt nahe, die Frage aufzuwerfen: Ist die Aktivierung von Peroxyden durch den Blutfarbstoff etwas funktionell Wesentliches, oder hat sie mehr zufällige, vom biologischen Gesichtspunkt unwesentliche Bedeutung? Ich glaube, daß man sich dafür entscheiden muß, der Aktivierungsfähigkeit des Hämoglobins eine zufällige Bedeutung zuzusprechen. Sie rührt nur daher, daß sich der Organismus zur Erfüllung eines bestimmten Zwecks, nämlich des Transportes von Sauerstoff zu den Geweben, der Fähigkeit einer komplexen Eisenverbindung bedient, Gase unter Bildung lockerer Additionsprodukte aufzunehmen.

Einfache Ferroverbindungen sind bekanntlich auch befähigt, Sauerstoff aufzunehmen, können ihn aber nicht wieder abgeben, weil die vielleicht zunächst sich bildenden hypothetischen Molekularverbindungen sich sehr schnell in nicht mehr zum Sauerstofftransport geeignete Ferriverbindungen umlagern. Hinsichtlich dieser Eigenschaft unterscheidet sich das komplexe Hämoglobinmolekül von der einfachen Eisenverbindung aber nur dem Grade, nicht der Art nach; Methämoglobin entsteht aus Oxyhämoglobin bei der Hämolyse spontan.

¹⁾ loc. cit.

Wenn man sich frägt, warum diese Umwandlung im Blut lebender Tiere nicht meßbare Grade annimmt, so ist der Grund dafür wohl in dem Umstand zu suchen, daß sich der Blutfarbstoff in großer Konzentration innerhalb der roten Blutkörperchen in einem von den sonstigen Körperflüssigkeiten hinsichtlich der Art und Konzentration völlig abweichenden Milieu befindet, innerhalb dessen vielleicht für das Oxyhämoglobin das Optimum der Existenzfähigkeit vorliegt.

Eine andere Frage ist die, ob es im Organismus komplexe Eisenverbindungen nach Art des Hämoglobins gibt, deren wesentliche Funktion die Verwertung superoxydartig gebundenen Sauerstoffs für weitere Oxydation sei. Die Wahrscheinlichkeit spricht sehr dafür, daß die tierischen Oxydationsfermente komplex gebundenes Eisen enthalten. Der von verschiedenen Forschern in den Nucleoproteiden gefundene, wenn auch nur locker gebundene Eisengehalt dürfte z. B., wie schon Spitzer¹⁾ annimmt, solche Funktion haben. Die bekannten tierischen Peroxydasen prinzipiell wegen ihrer leichteren Zerstörbarkeit durch Hitze und des schnelleren Abklingens der Katalyse²⁾ als wesensverschieden vom Hämoglobin zu betrachten, scheint mir ein willkürliches Verfahren. Dieses Verhalten würde sich in ungezwungener Weise aus der größeren Labilität eines Komplexes erklären, ebenso auch vielleicht wie bei anderen Fermenten aus der mit der Reaktion verbundenen Änderung eines mikroheterogenen Zustandes. Das außerdem noch als Beweis für die Wesensverschiedenheit von Peroxydase und Blutfarbstoff angeführte Ausbleiben der katalytischen Beschleunigung der Jodwasserstoffzersetzung bei Gegenwart von Wasserstoffperoxyd erklärt sich vielleicht aus der sofortigen Bindung ausgeschiedenen Jods. J. Wolff und E. de Stoecklin³⁾ konnten im Gegenteil für das Hämatin außerordentlich stark katalytische Wirksamkeit auch gegenüber Jodwasserstoff nachweisen.

Für die pflanzlichen Peroxydasen gilt dasselbe. Daß in

¹⁾ Pflügers Archiv der Physiol., Bd. LXVII, S. 615 (1897).

²⁾ v. Czyhlarz und v. Fürth, Hofmeisters Beitr., Bd. X, S. 358 (1907).

³⁾ Compt. rend., Bd. CLI, S. 483 (1910).

den Pflanzen die leichte Möglichkeit der Bildung komplexer Eisenverbindungen vorliegt, geht daraus hervor, daß das Chlorophyll eine dem Blutfarbstoff vollkommen analoge komplexe Verbindung, und daß das Eisen ein notwendiger und niemals fehlender Bestandteil der Pflanze ist. So ist auch in stark wirksamen Pflanzenauszügen Eisen gefunden worden. Von Bedeutung scheint mir ferner, daß Zersetzungsprodukte von gereinigten Peroxydasen mehrfach die Pyrrolreaktionen gaben, also dieselben stickstoffhaltigen Atomgruppen zu enthalten scheinen, aus denen sich auch der Blutfarbstoff zusammensetzt.

Nun geben allerdings Bach und Tscherniak¹⁾ an, gereinigte wirksame Peroxydasepräparate völlig eisenfrei gefunden zu haben. Wenn man indessen weiß, wie geringe Eisenmengen im Blutfarbstoff intensive Peroxydasereaktion verursachen, so erscheint es nicht als ausgeschlossen, daß sich bei der Analyse von reinen Peroxydasepräparaten gerade das der Menge nach äußerst geringfügige, durch seine Bindungsweise aber sehr wirksame Eisen dem Nachweise entzogen hat. Ich möchte daher weitere Untersuchungen über diesen Punkt nahelegen. Immerhin ist es denkbar, der Annahme rein organischer Verbindungen bei dem Fehlen irgendwelcher Analoga sogar vorzuziehen, daß andere Stoffe mit wechselnder reversibler Oxydationsstufe als Basis solchen Peroxydasen zugrunde liegen.

Ohne der Bach-Chodatschen²⁾ Theorie, nach der sich Oxydasen immer zusammensetzen aus Peroxydasen und Oxygenasen, für viele Fälle ihre Richtigkeit abzuerkennen, möchte ich darauf hinweisen, daß Metallverbindungen mit wechselnder Oxydationsstufe unter Umständen gleichzeitig wie Oxygenasen und Peroxydasen funktionieren können, die genannte Theorie also nicht absolute Alleingültigkeit zu besitzen braucht. Das ist dann der Fall, wenn ein primär sich bildendes anorganisches Moloxyd oder Sauerstoffsanlagerungsprodukt anders, als wie es gerade beim Blutfarbstoffe der Fall ist, in ein wahres Superoxyd übergehen kann oder auch sich leicht mit Wasser zu einer Verbindung höherer Oxydationsstufe umsetzen kann. die

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XLI, S. 2345 (1908).

²⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVI, S. 607 (1903).

ihrerseits noch Oxydationswirkungen auszuüben vermag. Es bildet sich dann neben dieser Wasserstoffperoxyd, das unter geeigneten Umständen, d. h. wenn es nicht selber für Oxydationen verbraucht wird, nachweisbar wird. Das ist z. B. der Fall bei einer schwach salzsauren Kupferchlorürlösung¹⁾ oder einer Lösung von Cobaltocyankalium,²⁾ die beim Schütteln mit Luft reichlich Wasserstoffperoxyd geben.

Eine ammoniakalische Kupferlösung, mit deren Hilfe durch den Luftsauerstoff große Mengen von Traubenzucker oxydiert werden, kann, wenn man von der Abnahme der Wirksamkeit während der Reaktion beim Ferment absieht, als einfachstes anorganisches Modell einer Oxydase bezeichnet werden, bei dem auch irgend welche Mitwirkung kolloidaler Eigenschaften ausgeschlossen ist. Die gleiche Eigenschaft, gleichzeitig wie eine Peroxydase und Oxydase wirksam zu sein, besitzen auch das fein verteilte Platin und Palladium, sowie die schon erwähnte künstliche Peroxydase J. Wolffs.³⁾

Auch für die Katalase, das Wasserstoffperoxyd zersetzende Enzym, ist noch keineswegs bewiesen, daß sie von den Oxydationsfermenten immer verschieden ist. Das fast stets gleichzeitige Vorkommen spricht dagegen, ebenso der Umstand, daß dieselben Stoffe hemmend oder vergiftend wirken, eine Giftwirkung, die wie die Hemmung der Aktivierungsfähigkeit von Ferrosalzen und Blutfarbstoff durch Säure mit der Annahme einer molekularen Anlagerung dieser Stoffe und Verhinderung einer Anlagerung von Sauerstoff oder Wasserstoffperoxyd ihre Erklärung finden kann. Das Versagen dieser oder jener Reaktion beweist nicht unbedingt dagegen. Wenn z. B. durch Katalase aus Jodwasserstoff kein Jod frei gemacht wird,⁴⁾ so erklärt sich das sehr wohl dadurch, daß eventuell in Freiheit gesetztes Jod sofort wieder absorbiert wird oder vergiftend wirkt; bei Gegenwart von Eiweißstoffen ist ersteres selbstver-

¹⁾ W. Traube, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XV, S. 671 (1882).

²⁾ Manchot u. Herzog, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXIII, S. 1742 (1900).

³⁾ Compt. rend., Bd. CXLVII, S. 745 (1908).

⁴⁾ Lesser, Zeitschrift f. Biol., Bd. XLVIII, S. 1 (1906).

ständig. Im fein verteilten Platin und Palladium haben wir bekanntlich Beispiele, in denen der gleiche Stoff gleichzeitig wie eine Peroxydase, Oxydase und Katalase wirksam ist. Daß auch hier nicht der kolloidale Zustand wesentlich ist, wir erwiesen dadurch, daß eine Lösung vom Bichromat oder eine ammoniakalische Kupferlösung das gleiche Verhalten zeigt. Bei Gegenwart eines geeigneten Acceptors wird dessen Oxydation vermittelt, bei Abwesenheit eines solchen wird Wasserstoffperoxyd zersetzt, indem dieses selber als Acceptor dient.

Wenn es nun wohl auch sicher Katalasen ohne Peroxydasenwirkung gibt und umgekehrt, so kann man das vielleicht auf stereochemische Eigentümlichkeiten zurückführen, von denen ja auch bei nicht fermentativen Reaktionen der Verlauf abhängig ist, und die bei den Enzymen wohl hauptsächlich den spezifischen Charakter derselben bedingen.

Nach alledem dürfte wohl hinreichend Material vorliegen, um für den wahrscheinlichen Mechanismus der Oxydasen, Peroxydasen und Katalasen eine wesentlich anorganische Grundlage geben zu können. Wir können sagen, diese Fermentwirkungen sind immer in solchen Fällen zu erwarten, in denen Verbindungen vorliegen, die

1. in mehreren Oxydationsstufen existieren können,
2. die sich unter Bedingungen befinden, bei denen sie mit molekularem Sauerstoff bzw. Wasserstoffperoxyd zu unbeständigen Molekularverbindungen zusammentreten können,
3. deren Oxydierbarkeit unter diesen Bedingungen reversibel ist, d. h. die sowohl aus der niederen in die höhere, wie aus der höheren in die niedere Oxydationsstufe übergeführt werden können.

Daß komplexe Eisenverbindungen unter solchen Bedingungen existenzfähig sind, wurde an dem Beispiel des Blutfarbstoffes bewiesen.

Bei der Allgegenwärtigkeit und physiologischen Notwendigkeit des Eisens spricht die Wahrscheinlichkeit dafür, daß, wenn nicht alle, so doch ein großer Teil dieser Fermente ihre Grundlage in komplexen Eisenverbindungen findet.