

# Über die Rolle des Eisens in der Atmung des Seeigels nebst Bemerkungen über einige durch Eisen beschleunigten Oxydationen.<sup>1)</sup>

Von

**Otto Warburg.**

(Mitglied des Kaiser-Wilhelm-Instituts für Biologie.)

Mit sieben Abbildungen im Text.

(Aus der zoologischen Station in Neapel.)

(Der Redaktion zugegangen am 1. Juni 1914.)

Vor kurzem wurde gezeigt,<sup>2)</sup> daß die Zellstruktur des unbefruchteten Seeigels weitgehend zerstört werden kann, ohne daß Sauerstoffverbrauch und Kohlensäureproduktion verlangsamt werden. Das unbefruchtete Seeigeli ist also — im Gegensatz zu vielen anderen Zellen — eine Maschine, in der die Geschwindigkeit der arbeitliefernden chemischen Reaktion von der Struktur der Maschine weitgehend unabhängig ist.

Erst durch diesen Befund war die Möglichkeit gegeben, mit der Eiatmung, wie mit einer chemischen Reaktion, im Reagenzglas zu experimentieren. Die Versuche — im ganzen mehrere 1000 Messungen — führten mit überwiegender Wahrscheinlichkeit zu der Annahme, daß eine einfache und bekannte chemische Reaktion der erste Schritt im Mechanismus der Sauerstoffatmung ist.

Als Material dienten ausschließlich die Eier von *Strongylocentrotus lividus*.

<sup>1)</sup> Die Kosten dieser Untersuchung wurden zum Teil durch Forschungsbeihilfen der Heidelberger Akademie der Wissenschaften und der Jagor-Stiftung gedeckt.

<sup>2)</sup> Pflügers Archiv, Bd. 158, S. 189 (1914).

## Gasanalytische Methodik.

Die Sauerstoffaufnahme wurde nach der mehrfach beschriebenen manometrischen Methode unter Benutzung der Barcroft-Haldaneschen Blutgasmanometer gemessen.

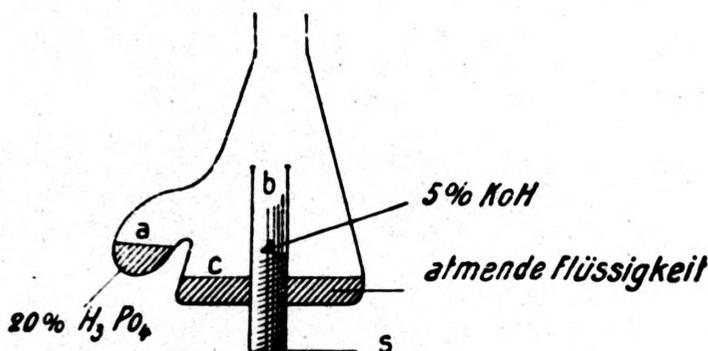


Fig. 1.

Die Volumina, in denen die Druckverminderungen entstanden, betragen ca. 11 ccm, sodaß 1 mm Ausschlag am Wassermanometer einem Sauerstoffverbrauch von 1 cmm entsprach.

Was die Kohlensäurebestimmungen anbetrifft, so wurden einige nach der früher<sup>1)</sup> angegebenen Modifikation des Pettenkoferschen Barytverfahrens ausgeführt. Diese Methode ist von allen wohl die sicherste; sie ist jedoch nicht nur umständlich, sondern erfordert auch Eimengen, wie sie nur selten beschafft werden können. Ich habe deshalb, in Anlehnung an die Haldane-Barcroftsche Methode der CO<sub>2</sub>-Bestimmung im Blut, ein Verfahren eingeschlagen, das CO<sub>2</sub>-Bestimmungen mit sehr kleinen Substanzmengen ermöglicht.

In 3 Gefäße (Nr. 1, 2 u. 3) von der in Figur 1 abgebildeten Form und von je 15 ccm Rauminhalt wurden je 1,5 ccm des atmenden Materials gegeben und zwar in den Raum c der Figur. Der Anhang a des Gläschens Nr. 1 blieb leer, während in den Einsatz b 5%ige Kalilauge, zur Absorption der Kohlensäure, eingefüllt wurde. Die Anhänge a der Gläser Nr. 2 und 3 wurden mit je 0,5 ccm 20%iger wässriger Phosphorsäure beschickt, während ihre Einsätze b leer

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 88, S. 425 (1913).

blieben. Darauf wurde jedes Gläschen mit einem Manometer verbunden, in den Thermostaten eingehängt und 10' lang bei offenem Hahn zwecks Temperaturlausgleich durch Anstoß an einen bei s befestigten Gummischlauch geschüttelt. Dann, nach Schluß der Hähne, wurde sofort in Gläschen Nr. 3 die Phosphorsäure aus dem Anhang a in c umgekippt, wobei ein beim Schütteln bald konstant werdender positiver Druck entstand. Aus der Größe dieses Drucks ergibt sich die «präformierte Kohlensäure». Gläschen Nr. 1 und 2 werden durch Anstoß an den Gummischlauch weiter geschüttelt, wobei in Nr. 1 ein dem Sauerstoffverbrauch entsprechender negativer Druck auftritt, während in Nr. 2, nach Maßgabe der in den Gasraum übergehenden Kohlensäuremengen, ein geringerer negativer Druck (oder kein negativer Druck) auftritt. Durch Vergleich der Druckänderungen in Nr. 1 und Nr. 2 erhält man direkt die  $\text{CO}_2$ -Ausscheidung in den Gasraum; sei der negative Druck in Nr. 1 30 mm, der negative Druck in Nr. 2 nach der gleichen Zeit 2 mm, so ist in den Gasraum entsprechend dem Druck  $30 - 2 = 28$  mm  $\text{CO}_2$  abgegeben worden. Hierzu kommt eine kleine Korrektur, wenn man bedenkt, daß in dem Gefäß sich ca. 2 ccm Flüssigkeit befinden, die merkliche Mengen  $\text{CO}_2$  lösen; für eine Salzlösung, wie Seewasser, und 23° wird diese Korrektur so berechnet, daß man für den Teilungskoeffizienten der  $\text{CO}_2$  zwischen Salzlösung und Gasraum die Zahl 0,7 annimmt.<sup>1)</sup> (Haben wir beispielsweise 2 ccm Salzlösung und 14 ccm Gasraum, so ist in der Salzlösung nach eingetretenem Gleichgewicht  $\frac{1}{7}$  mal 0,7 = 0,1 mal soviel  $\text{CO}_2$ , als im Gasraum.)

Kann man nun auch die  $\text{CO}_2$ -Abgabe durch Vergleich der in Nr. 1 und Nr. 2 auftretenden Druckänderungen sehr einfach messen, so ist die  $\text{CO}_2$ -Produktion auf diese Weise nicht zu ermitteln, vor allem, weil man nicht weiß, wieviel von der an den Gasraum abgegebenen  $\text{CO}_2$  präformierte  $\text{CO}_2$  ist. Um

<sup>1)</sup> Über die Löslichkeit der  $\text{CO}_2$  in Salzlösungen siehe Fox, Publications de Circonstance Nr. 44. Kopenhagen 1909. Der Absorptionskoeffizient der Kohlensäure in einer 3,5%igen NaCl-Lösung ist um ca. 12% kleiner, als in Wasser, unter sonst gleichen Bedingungen.

diese Unsicherheit auszuschalten, kippt man nach Beendigung des Versuchs und nachdem man die Druckänderung in Nr. 1 abgelesen hat, die Phosphorsäure aus dem Anhang a des Gläschens Nr. 2 in c um. Es stellt sich bald ein konstanter Druck ein, der abgelesen wird. Nehmen wir an, wir hätten

in Nr. 1 abgelesen — 20 mm

in Nr. 2 » — 2 mm

in Nr. 3 » + 3 mm

und die Gasräume wären gleich, so wäre  $\text{CO}_2$  neugebildet entsprechend dem Druck

(20 — 2) minus 3

(= nach Atmung und Ansäuern (= ohne Atmung nach Ansäuern an den Gasraum abgegebene  $\text{CO}_2$ .) an den Gasraum abgegebene  $\text{CO}_2$ .)

Dazu kommt dann eine kleine Korrektur wegen der in der Salzlösung gelösten  $\text{CO}_2$ .

Die Methode läuft also hinaus auf 3 Druckablesungen. Voraussetzung ist, daß kein anderes, durch KOH absorbierbares Gas entsteht. Man könnte hier an  $\text{H}_2\text{S}$  als Fehlerquelle denken, ein Gas, das nach der Strukturzerstörung in der Eisubstanz vorhanden ist.<sup>1)</sup> Die Mengen an  $\text{H}_2\text{S}$  jedoch sind so gering, daß sie keinen Fehler verursachen. Man kann das erstens so nachweisen, daß man in den Einsatz b eines Gläschens saure  $\text{CuSO}_4$ -Lösung bringt, die den  $\text{H}_2\text{S}$  absorbiert; zweitens so, daß man die Methode durch die Barytmethode mit vorgeschalteter  $\text{CuSO}_4$ -Lösung kontrolliert; man findet dann, daß Druckmethode und Barytmethode übereinstimmende Resultate geben.

Die Druckmethode ist in dem unten mitgeteilten Beispiel zur Entscheidung der Frage benutzt, ob sich mehr  $\text{CO}_2$  bildet bei Gegenwart von Fe. 4 Gläschen von der in Figur 1 wiedergegebenen Form wurden folgendermaßen beschickt:

Nr. 1 mit 1,5 ccm Material in c; KOH in b

Nr. 2 » 1,5 » » ;  $\text{H}_3\text{PO}_4$  » a

Nr. 3 » 1,5 » » + Fe » c; KOH » b

Nr. 4 » 1,5 » » + Fe » c;  $\text{H}_3\text{PO}_4$  » a

Nach einer passenden Zeit wurden die Druckvermindierungen in Nr. 1 und Nr. 3 abgelesen, dann sofort die in Nr. 2

<sup>1)</sup> Siehe Pflügers Archiv, loc. cit.

und Nr. 4, die Anhänge a umgekippt, und nach eingetretener Druckkonstanz die Drucke in Nr. 2 und Nr. 4 notiert. Man erhält so die unter Fe-Einfluß mehrproduzierte  $\text{CO}_2$ .

Schließlich sei, wie schon früher, auch hier nochmals darauf hingewiesen, daß für alle  $\text{CO}_2$ -Bestimmungen das Material durch Waschen mit einer bicarbonatfreien Flüssigkeit von Seewasser befreit sein muß.

### I. Der Eisengehalt der Eier

ist so gering, daß bei den zur Verfügung stehenden Materialmengen für die Bestimmung nur kolorimetrische Methoden in Betracht kommen. Von diesen erwies sich als sehr brauchbar und bequem die Methode nach Lachs und Friedenthal.<sup>1)</sup> Im einzelnen verfuhr ich folgendermaßen:

Die Eier von reifen Strongylocentrotiden wurden mit Seewasser gewaschen und dann mit  $\text{CO}_2$ -haltigem Seewasser von ihren Gallerthüllen befreit,<sup>2)</sup> sodaß beim Zentrifugieren ein ganz dichtes Eisediment erhalten wurde. 10 ccm Sediment wurden in eine flache Porzellanschale gebracht, zur Trockne verdampft und durch Erhitzen verascht. Die Kohle wurde heiß mit Salzsäure extrahiert, getrocknet, wieder geglüht und ein zweites Mal mit Salzsäure extrahiert. Dann wurden die vereinigten salzsauren Auszüge, nach Zugabe eines Körnchens  $\text{KClO}_3$  zur Überführung des Eisens in die Oxydform, zur Trockne gedampft. Der durch  $\text{FeCl}_3$  schwach gelblich gefärbte Rückstand wurde in wenigen Kubikzentimetern Wasser und einem Tropfen verdünnter Salzsäure aufgenommen und mit Wasser auf ein Volumen von 3 ccm gebracht; davon wurden 1 ccm in ein Reagenzglas gegeben und 1 ccm 6 n-HCl, 1 ccm 10% KCNS und 1 ccm Äther zugefügt.

Beim Schütteln färbte sich der Äther rot. Seine Färbung wurde mit einer Serie von Färbungen verglichen, die durch Vermischen um je 1 ccm abgestuft verdünnter Freseniuscher

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschrift, Bd. 32. S. 130 (1911); ein Vorteil dieser Methode ist unter anderem, daß kleine Mengen  $\text{H}_3\text{PO}_4$  die Färbung im Äther nicht beeinflussen.

<sup>2)</sup> Siehe Pflügers Archiv, Bd. 158 (1914).

Eisenchloridlösung<sup>1)</sup> mit 1 ccm 6 n-HCl, 1 ccm 10% KCNS und 1 ccm Äther entstanden waren. Die unbekannte Eisenkonzentration ließ sich so mit einem Fehler von etwa 30% ablesen.

Um definierte Beziehungen zu erhalten, wurde stets in einem aliquoten Teil des Eisediments, dessen Fe-Gehalt gemessen werden sollte, der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt. 1 ccm enthielt im Mittel ca. 20 mg, also 10 ccm, die zur Bestimmung verwandte Menge, ca. 200 mg N.

In einer größeren Reihe von Versuchen ergab sich, daß in der Substanz der reifen Eier auf 100 mg N 0,02 bis 0,03 mg Eisen kommen (also auf 1 g Trockensubstanz einige Hundertstel milligramme Eisen).

Dreierlei Kontrollen wurden angestellt. Die erste betraf den Eisengehalt der Reagentien. Die verwendete Salzsäure stammte von Kahlbaum und wurde als «eisenfrei» in einer Porzellanflasche geliefert ( $d = 1,19$ ). Eine Probe der Säure wurde durch Verdünnung 6 fach normal gemacht, dann 1 ccm 10% KCNS, 1 ccm destilliertes Wasser und 1 ccm Äther zugefügt. Es trat keine Spur von Rosafärbung auf. Ferner wurden 30 ccm der konzentrierten Salzsäure, 60 ccm destilliertes Wasser und ein Krystall  $KClO_3$  im Wasserbad zur Trockne verdampft und auf 3 ccm gebracht; davon wurde 1 ccm, wie im Versuch, mit HCl, KCNS und Äther vermischt, wobei eine leichte Rosafärbung auftrat, an Intensität nicht in Betracht kommend gegenüber der in der Versuchsflüssigkeit auftretenden Rotfärbung. Die Substanzmengen, die zu dieser Kontrolle verwendet waren, betragen etwa das Doppelte von denjenigen Mengen an Wasser, HCl und  $KClO_3$ , die für die Fe-Bestimmungen verwendet worden waren. — Die zweite Kontrolle betraf den Eisengehalt des Seewassers. Wie erwähnt, wurden 10 ccm Sediment zur Eisenbestimmung verwendet. Diese enthielten schätzungsweise als Zwischenflüssigkeit 1 ccm Seewasser; wurden nun 10 ccm Seewasser wie die Eissubstanz behandelt, so konnte nur eine Spur Rosafärbung wahrgenommen werden, nicht in Betracht kommend gegen die Rotfärbung bei der

<sup>1)</sup> Die Stammlösung enthält 10 mg Fe in 1 ccm. Sie kann von Kahlbaum bezogen werden.

Bestimmung. — Die dritte Kontrolle sollte entscheiden, ob die Eier das Eisen schon in den Ovarien enthalten, oder ob sie es erst außerhalb der Ovarien aus dem Seewasser — sie wurden ja mit großen Mengen Seewasser gewaschen — aufnehmen. Es wurden deshalb reife Ovarien möglichst sauber präpariert, mit destilliertem Wasser abgespült und wie die Eier verascht. Es ergab sich ein Eisengehalt von 0,015 mg : 100 mg N, d. i. dieselbe Größenordnung, aber vielleicht etwas weniger als in den Eiern. Entweder also nehmen die Eier noch ein wenig Eisen beim Waschen mit Seewasser auf, oder aber — das ist die wahrscheinlichere Erklärung — die Eier enthalten mehr Eisen, als das Ovarialgewebe.

Was die Form anbetrifft, in der das Eisen in der Eissubstanz vorkommt, so ist folgender Versuch wichtig: fällt man die Eier mit Aceton und wäscht sie mit Äther (wobei sich die Oxydationsgeschwindigkeit einer gegebenen Menge für die erste Zeit nur wenig ändert, während die Kohlensäureproduktion aufhört), so erhält man ein weißliches Pulver;<sup>1)</sup> übergießt man dieses Pulver mit Rhodankali und dann mit einem Tropfen Salzsäure, so tritt eine rötliche Färbung, offenbar die des Rhodaneisens, auf. Das Eisen oder ein Teil des Eisens liegt also, nach Zugabe von HCl, als Ion vor.

## II. Wirkung von zugesetztem Eisensalz auf die Oxydationsgeschwindigkeit.

Die folgenden Versuche wurden mit der Granulasuspension angestellt, deren Gewinnung aus intakten unbefruchteten Eiern früher ausführlich beschrieben wurde.<sup>2)</sup> Sie ist eine in dünnen Schichten durchscheinende rötliche Flüssigkeit, ziemlich zäh, aber doch so flüssig, daß sie sich gut mit der Pipette abmessen läßt.

<sup>1)</sup> Das Pulver aus unbefruchteten Eiern ist heller, als das aus befruchteten Eiern. Die letzteren geben ihren Farbstoff an Aceton und Äther viel langsamer ab. Es erinnert das an eine Beobachtung von J. Loeb, nach der mit Neutralrot gefärbte Seeigeleier diesen Farbstoff nach der Befruchtung viel langsamer abgeben, als vor der Befruchtung. Bioch. Zeitschr., Bd. 2, S. 34, 1906).

<sup>2)</sup> Pflügers Archiv, Bd. 158, S. 189 (1914).

Die Atmung dieser Flüssigkeit ist nun keineswegs in ihrer Größe so leicht und auf so mannigfache Art beeinflussbar, wie die Atmung der intakten Eier. Ich kenne nur wenige Stoffarten, die bei Zusatz zu der Granulasuspension oxydationsbeschleunigend wirken: zu ihnen gehört Eisensalz, das in sehr kleinen Mengen wirkt, sowohl in der Oxydul-, als auch in der Oxydform. Durch andere Metallsalze wurde bisher eine Beschleunigung nicht erzielt.

a) Das Eisenoxydulsalz, mit dem die meisten Versuche angestellt wurden, wurde in Form einer wässrigen Lösung des Mohrschen Salzes ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4, \text{FeSO}_4, 6 \text{H}_2\text{O}$ ) zugesetzt: um stärkere Verdünnungen der Granulasuspensionen zu vermeiden, waren die Konzentrationen der Eisenlösungen stets so bemessen, daß auf 1 ccm Granulasuspension 0,1 ccm Eisensalz gegeben wurde.

In Hunderten von Versuchen ergab sich, daß Zusatz von 0,01—0,02 mg  $\text{Fe}^{++}$  zu 1,5 ccm Granulasuspension (= 22 mg N), bei 23°, die Oxydationsgeschwindigkeit um 50—110% steigert. Als typisches Beispiel für den Verlauf einer Fe-Beschleunigung soll die graphische Darstellung in Figur 2 dienen.

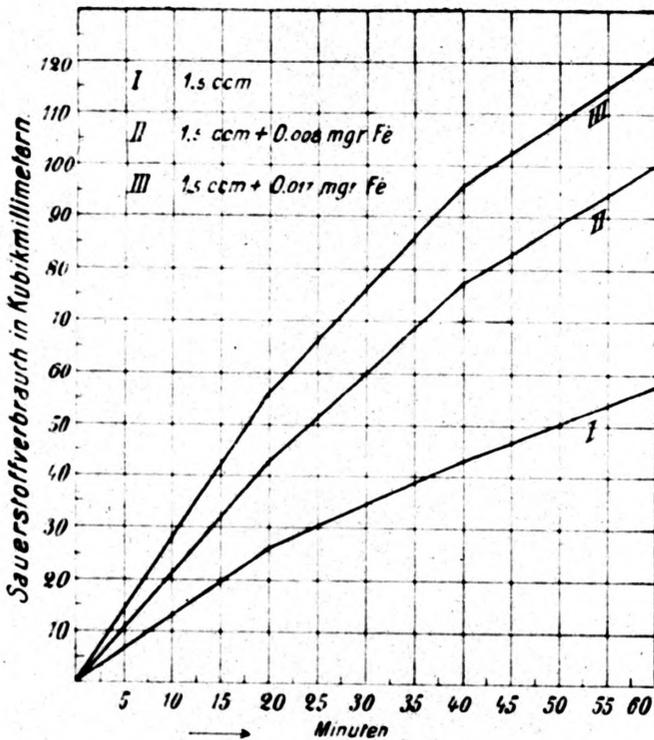


Fig. 2

In diesem Beispiel haben wir nach 60' und bei 23° durch 0,008 mg  $\text{Fe}^{++}$  eine Beschleunigung von 72% und durch 0,017 mg  $\text{Fe}^{++}$  eine Beschleunigung von 109%.

Die Wirkung des Eisens wächst nicht proportional der zugesetzten Menge, sondern langsamer. Zusatz von erheblich

mehr als 0,02 mg Fe<sup>++</sup> zu 20 mg Ei-N hat keinen erheblich größeren Einfluß auf die Oxydationsgeschwindigkeit, Zusatz von erheblich weniger Fe<sup>++</sup> als 0,005 mg hat keinen Einfluß auf die Oxydationsgeschwindigkeit.

Es ist im höchsten Grade bemerkenswert, daß die Oxydationsgeschwindigkeit auf Zusatz von grade solchen Eisenmengen reagiert, wie sie, der Größenordnung nach, in der Eissubstanz natürlich vorkommen. Auf 100 mg Ei-Stickstoff kommen, wie wir in I erfuhren, 0,02 bis 0,03 mg Fe. Setzt man zu 100 mg Ei-Stickstoff Hundertstel-Milligramme Fe<sup>++</sup>, so steigt die Oxydationsgeschwindigkeit sehr erheblich.

b) Die Atmung der Granulasuspension nimmt im Laufe von Stunden ab und wird allmählich sehr klein.<sup>1)</sup> Sie nimmt schneller ab, wenn man zur Herstellung der Suspension eine etwas verdünntere Eisuspension benutzt.

Es ist nun für den Erfolg des Eisenzusatzes keineswegs gleichgültig, ob das Eisen bald oder erst längere Zeit nach der Strukturzerstörung zugesetzt wird. Die Eisenwirkungen, von denen in a) die Rede war, treten nur dann auf, wenn das Eisen zur Zeit der ungeschwächten Atmung zugesetzt wird. Wie aus Figur 2 hervorgeht, beträgt das plus an O<sub>2</sub>-Aufnahme in 60' dann etwa 60 cmm Sauerstoff, bei einem Eisenzusatz von 0,017 mg auf 22 mg Eistickstoff. Setzt man dagegen das Fe-Salz nach 4 bis 5 Stunden zu, wenn der Sauerstoffverbrauch schon sehr klein geworden ist, so ist der Erfolg ein viel geringerer, das plus an Sauerstoffaufnahme beträgt dann unter sonst gleichen Bedingungen nur etwa 16 cmm Sauerstoff. Diese Tatsache legt den Gedanken nahe, daß das zugesetzte Eisensalz den Sauerstoff auf eine im Atmungsprozeß verschwindende Substanz überträgt.

### III. Bildet sich bei Eisenzusatz mehr Kohlensäure?

Wie früher mitgeteilt,<sup>1)</sup> läßt die Kohlensäureproduktion in der Granulasuspension schneller nach als die Sauerstoff-

<sup>1)</sup> Pflügers Archiv. loc. cit.

aufnahme; die Atmung geht also allmählich und spontan in eine Sauerstoffzehrung über.

Dieses Phänomen scheint nun auch das plus an Sauerstoffaufnahme, das sich bei Eisenzusatz einstellt, zu zeigen, nur in noch viel höherem Maße. Denn kurze Zeit nach dem Eisenzusatz wird in der Regel mehr Kohlensäure produziert als ohne Eisenzusatz, wobei die Mehrproduktion an Kohlensäure im Verhältnis zur Mehraufnahme des Sauerstoffs ohne erkennbaren Grund recht wechselnd ist. Zweimal habe ich für das bei Eisenzusatz einsetzende «plus» einen Quotienten  $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$  von nahezu 1 gemessen, öfters einen Quotienten von 0,5; in 2 Versuchen war die Kohlensäureproduktion nicht vermehrt.

Die Messungen nach der manometrischen Methode können erst 10' nach Zusammengeben und Einfüllen des atmenden Materials beginnen, weil erst dann Temperaturlausgleich eingetreten ist. Diese ersten 10' gehen also für die Messung stets verloren.

Schließt man nach 10' die Hähne und beobachtet die Druckänderungen, so sieht man, daß stets 10—15' nach Beginn der Messung, also 20—25' nach Zusatz des Eisens, die Mehrproduktion an  $\text{CO}_2$  sehr schnell nachläßt. Der Versuch darf also nicht länger dauern als 10—15', von dem Augenblick des Hahnschlusses an gerechnet.

Als Beispiel führe ich einen Versuch in extenso an, in dem der Quotient für den bei Eisenzusatz einsetzenden Mehrverbrauch an Sauerstoff etwa 0,5 war (Methodik siehe Anfang dieser Abhandlung):

Temperatur 20°. In 4 Gläschen von der Form der Figur 1 je 1,5 ccm Granulasuspension. Dauer 13 Minuten.

1. Ohne Fe-Zusatz; im Einsatz KOH. Verschwunden 28 cmm Gas; also Sauerstoffverbrauch: 28 cmm.

2. Mit 0,043 mg  $\text{Fe}^{++}$ ; im Einsatz KOH. Verschwunden 41 cmm Gas; also Sauerstoffverbrauch: 41 cmm.

1a) Ohne Fe-Zusatz; im Einsatz keine KOH; im Anhang a 0,5 ccm 20%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Nach 13' umgekippt. 10 cmm Gas waren hinzugekommen.

1b) Mit 0,043 mg Fe<sup>++</sup>; im Einsatz keine KOH; im Anhang a 0,5 ccm 20% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Nach 13' umgekippt. 4 cmm Gas waren entwickelt.

Also, abgesehen von der Korrektur, die hier praktisch nichts ausmacht:

Mehrverbrauch an Sauerstoff bei Zugabe von 0,043 mg Fe<sup>++</sup>: 41—28 = 13 cmm.

Mehrproduktion von Kohlensäure bei Zugabe von 0,043 mg Fe<sup>++</sup>: (41 + 4) — (28 + 10) = 7 cmm.

Quotient für das plus:  $\frac{7}{13} = \text{ca. } 0,5$ .

#### IV. Das Verhalten der durch Eisenzusatz beschleunigten Oxydation gegenüber Äthylurethan.

Wenn dem Mehrverbrauch an Sauerstoff, der nach Eisenzusatz beobachtet wird, dieselben chemischen Prozesse zugrunde liegen wie der Atmung, so ist zu erwarten, daß sich der Mehrverbrauch auch in ähnlicher Weise beeinflussen läßt wie die Atmung. Von diesem Gesichtspunkt aus war es interessant, die Wirkung eines Narkoticums auf den Mehrverbrauch zu untersuchen. Es hat sich dabei gezeigt, daß Äthylurethan den Mehrverbrauch um fast den gleichen Betrag hemmt wie die Atmung.

Unter «Prozenten» Urethan verstehen wir diejenige Menge in Grammen, die 100 g Granulasuspension zugesetzt wurde. Die Atmung der Granulasuspension, ohne Fe-Zusatz, wurde gehemmt:

durch 4,6% Äthylurethan um 36%,

durch 8,3% » » 78%.

Wurden zu 1,5 ccm Granulasuspension je 0,04 mg Fe<sup>++</sup> gegeben, so wurde der Sauerstoffverbrauch gehemmt:

durch 4,6% Äthylurethan um 32%,

durch 8,3% » » 78%.

Das heißt also, die Wirkungen des Urethans auf Atmung und auf gesteigerte Atmung sind so gut wie identisch.

Ein weiterer Versuch ist in Figur 3 graphisch dargestellt:

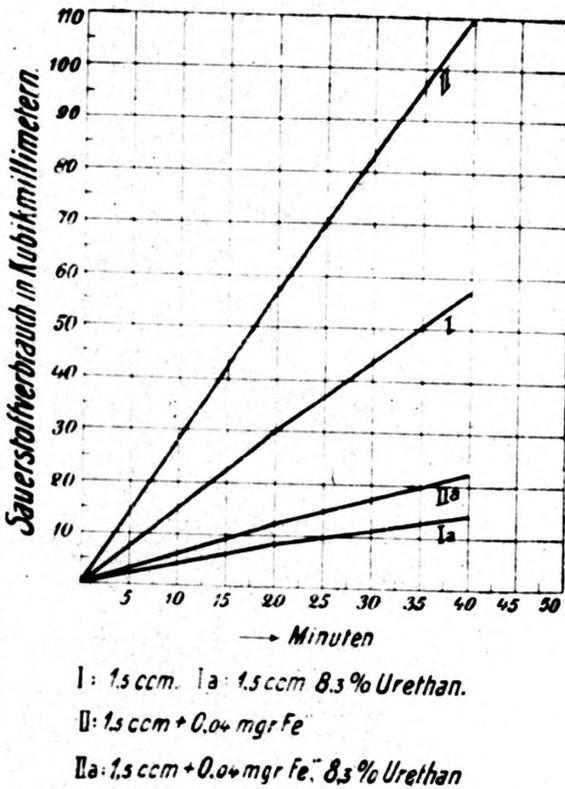


Fig. 3.

Die Hemmungen durch 8,3% Urethan betragen:

in der Granulasuspension: 75%,

in der mit Fe versetzten Granulasuspension: 80%,

stimmen also wiederum fast überein.

Anhangsweise sei darauf aufmerksam gemacht, daß, wie aus Figur 3 hervorgeht, die Hemmungen sich innerhalb 40' mit der Zeit nicht ändern.

### V. Über einige durch Eisen beschleunigte Oxydationen.

In diesem Abschnitt sollen einige Fe-Oxydationskatalysen besprochen werden, die zunächst als Modelle für die Wirkung des Eisens auf die Eissubstanz von Interesse sind; vielleicht wird sich später herausstellen, daß eins dieser Modelle — das System Linolensäure-Eisensalz — im natürlichen Atmungsmechanismus eine Rolle spielt.

Geht man lediglich darauf aus, Systeme zusammenzustellen, in denen Fe in irgend einer Weise als Oxydationskatalysator wirkt, so ist die Auswahl eine sehr große. Die

Auswahl wird jedoch sehr viel kleiner, wenn man den oben beschriebenen Experimentalfall soweit nachahmen will, daß folgende Bedingungen erfüllt sind:

1. daß die Oxydation solcher Verbindungen beschleunigt wird, die den Zell-Brennstoffen chemisch nahe stehen,
2. daß der Sauerstoff, der von dem Eisen übertragen wird, an dieses **in Form von  $O_2$** , nicht als  $H_2O_2$ ,  $KMnO_4$  usw. herantritt,
3. daß die Oxydation auch im Dunkeln erfolgt. (Die atmenden Zellen der höheren Tiere liegen größtenteils vor Licht geschützt und Oxydationswirkungen, die durch Sauerstoffgas + Eisensalz erst bei Belichtung eintreten, können dem Atmungsmechanismus nicht wohl zugrunde liegen.)
4. daß die Geschwindigkeit der Oxydation unterhalb  $40^\circ$ , der Größenordnung nach, der in der Eissubstanz ähnlich ist.

Zunächst seien einige organische Stoffe angeführt, die auch bei Gegenwart von Eisensalz sich nicht mit merklicher Geschwindigkeit oxydieren:

Ölsäure, Kroton-, Ricinol-, Fumar-, Malein-, Eruca-, Aconit-, Citracon-, Elaidin-, Undecylen-, Tiglin-, Stearol-, Tartron-, Glucon-, Benztrauben-, Nuclein-, Glycerinphosphorsäure; Guanin; Adenin; Histon; Eiweiß.

Dagegen beschleunigt Eisensalz, bei Zimmertemperatur, beispielsweise die Oxydation folgender Körper sehr erheblich; Weinsäure, Dihydroxymaleinsäure, Lecithin, Linolensäure, Cystein u. a. Thioverbindungen, Aldehyde. Von diesen Substanzen ist Weinsäure die einzige, die ohne Eisen bei Zimmertemperatur von Sauerstoffgas praktisch nicht angegriffen wird; die übrigen Substanzen oxydieren sich an der Luft «spontan» schon mit merklicher Geschwindigkeit, wenn auch viel langsamer, als bei Gegenwart von Eisensalz. Einige dieser Eisen-Oxydationskatalysen sollen im folgenden kurz besprochen werden.

#### 1. Lecithin.

a) Wie mir die Lecithinchemiker versichern, ist ihnen seit langer Zeit bekannt, daß Lecithin, wenn es unversehrt erhalten werden soll, vor Berührung mit Eisen zu schützen

ist. Doch ist es Thunbergs Verdienst,<sup>1)</sup> die Oxydationsbeschleunigung des Lecithins durch Fe-Salz zuerst untersucht und ihre Größe gemessen zu haben.

Die Angaben von Thunberg konnte ich bestätigen; sowohl zweiwertiges, als auch dreiwertiges Eisenion beschleunigt die Oxydation wässriger Lecithinemulsionen sehr erheblich. Zum Studium der Reaktion benutzte ich sowohl käufliches Lecithin (Merck) als auch ein Präparat, das ich aus Hühnereiern selbst hergestellt hatte. Ein Unterschied im Verhalten der Präparate wurde nicht beobachtet. Die Lecithinemulsionen wurden durch Eingießen methylalkoholischer Lösungen in Wasser hergestellt; man erhält so, wie zuerst Porges und Neubauer<sup>2)</sup> angegeben haben, feine und dauerhafte Emulsionen.

Gibt man zu einer bestimmten Eisenmenge wachsende Mengen Lecithin, so findet man, von einer gewissen Grenze an, daß die Oxydationsgeschwindigkeit langsamer wächst, als die in der Raumeinheit befindliche Lecithinmenge. Will man also mit einer bestimmten Lecithinmenge möglichst große Oxydationsgeschwindigkeiten erzielen, so muß man relativ viel Kalalysator zusetzen. Folgende Mengenverhältnisse sind zum Studium der Katalyse zu empfehlen: 0,2 g Lecithin, in 5 ccm Methylalkohol gelöst, werden in 200 ccm Wasser eingegossen. Zu 2 ccm der Emulsion gibt man dann 0,2 ccm  $n_{10}$ -Essigsäure und 0,1 ccm einer 0,8%igen Lösung von Mohrschem Salz (= 0,1 mg  $Fe^{++}$ ). Nach 8stündigem Schütteln bei 16° ist die Sauerstoffaufnahme praktisch zu Ende, d. h. es wird weiterhin nur noch sehr wenig Sauerstoff aufgenommen.

Um die Größe der Beschleunigung zu bestimmen, pipettiert man je 2 ccm der Emulsion in ein Atmungsfläschchen, fügt zu beiden Proben 0,2 ccm  $n_{10}$ -Essigsäure, in eines außerdem 0,1 mg  $Fe^{++}$ , und schüttelt nun beide im Thermostaten unter Beobachtung der Druckänderungen. Nach 6—8 Stunden bei 16° hat die Kontrolle weniger als 1 cmm Sauerstoff verbraucht, während die Probe mit Eisen 90—95 cmm Sauerstoff aufgenommen hat.

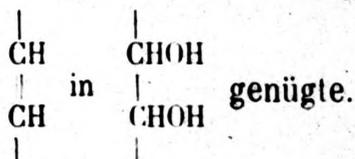
<sup>1)</sup> T. Thunberg. Shandin. Arch. f. Physiol., Bd. 24, S. 90 (1910).

<sup>2)</sup> Bioch. Zeitschr., Bd. 7, S. 152 (1906).

b) Schwaches, diffuses Tageslicht, wie es bei den meisten Versuchen in den Wasserthermostaten fiel, hatte auf die Geschwindigkeit der Katalyse keinen Einfluß. Denn die Reaktion verlief nicht langsamer im verdunkelten Zimmer.

c) Bei der Reaktion bildet sich keine Kohlensäure.

d) Wie die spontane Oxydation des Lecithins ist auch die durch Eisen beschleunigte von einer Abnahme des Jodbindungsvermögens begleitet: und zwar wird ein Mehrfaches derjenigen Sauerstoffmenge aufgenommen, die zur Überführung der verschwundenen Doppelbindungen



e) Von den Beeinflussungen der Oxydationsgeschwindigkeit ist wichtig, daß Säuren — Essigsäure, Buttersäure, Salzsäure, Phosphorsäure, Schwefelsäure — sehr erheblich beschleunigend wirken. (Deshalb wurde in der oben gegebenen Vorschrift nicht Wasser, sondern  $n/100$ -Essigsäure als Milieu empfohlen.)

2. Linolensäure ( $C_{18}H_{30}O_2$ , Fettsäure mit 3 Doppelbindungen; Molekulargewicht 278) ist von den Spaltungsprodukten des Lecithins das einzige, dessen Oxydation durch Eisensalz beschleunigt wird; höchstwahrscheinlich setzt demnach die Lecithinoxidation an der Linolensäurekomponente ein.

a) Was die Mengenverhältnisse anbetrifft, in denen zweckmäßigerweise Säure, Eisen und Wasser zum Nachweis der Katalyse gemischt werden, so gilt dasselbe, was für das System Fe-Lecithin gesagt wurde: wenig Substrat und viel Katalysator.

Wie das Lecithin, bildet auch die Linolensäure feine und dauerhafte Emulsionen, wenn ihre methylalkoholische Lösung in Wasser eingegossen wird. Es wurden also 0,1 ccm Säure, in 5 ccm Methylalkohol gelöst, in 200 ccm Wasser gegossen. In 2 ccm der Emulsion waren dann 0,9 mg Linolensäure. Je 2 ccm wurden in ein Atmungsgläschen pipettiert, in eins außerdem 0,1 ccm 0,8%ige Lösung von Mohrschem Salz (= 0,1 mg  $Fe^{++}$ ). Bei  $16^{\circ}$  wurden dann für den Sauerstoffverbrauch Werte erhalten, wie sie in der folgenden Figur eingezeichnet sind.

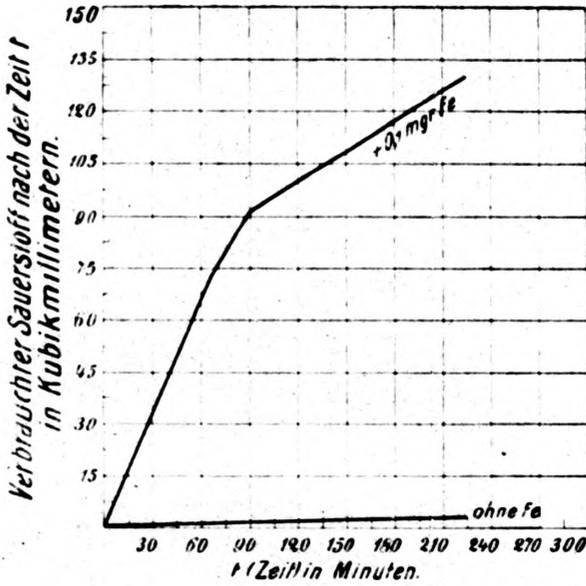


Fig. 4.

Nach 6—7 stündigem Schütteln bei 16° ist die Reaktion praktisch beendigt, 0,9 mg Säure haben dann ca. 0,134 cc Sauerstoff aufgenommen. Das ist auf 1 Molekül Säure ca. 41000 cc Sauerstoff oder fast 2 Moleküle Sauerstoff (2 Mol. Sauerstoff wären ca. 44000 cc).

b) Die Oxydationskatalyse geht auch im Dunkeln vor sich.

c) Kohlensäure bildet sich nicht. Wie bei der Oxydation der Linolensäure ohne Fe<sup>1)</sup> nimmt mit der Sauerstoffaufnahme das Jodbindungsvermögen ab. Mindestens  $\frac{1}{3}$  des Jodbindungsvermögens bleibt nach beendeter Sauerstoffaufnahme übrig; da die Oxydation der Ölsäure durch Fe-Salz nicht merklich beschleunigt wird, so liegt die Vermutung nahe, daß diejenige der 3 Linolensäure-Doppelbindungen übrig bleibt, die der Ölsäuredoppelbindung entspricht. Da ferner 1 Molekül Linolensäure etwa 2 Moleküle Sauerstoff aufnimmt (siehe a), während nur 2 Doppelbindungen verschwinden, so gilt hier dasselbe, was beim Lecithin gesagt wurde: es wird ein Mehrfaches derjenigen Sauerstoffmenge aufgenommen, die zur Überführung der beiden Doppelbindungen in zwei

CHOH Gruppen nötig wäre.

CHOH

d) Von den Beeinflussungen der Oxydationsgeschwindigkeit im System Fe-Linolensäure ist die Wirkung der Basen erwähnenswert. Fügt man zu 2 cc Wasser + 0,9 mg Linolen-

<sup>1)</sup> Fahrion, Die Chemie der trocknenden Öle.

säure + 0,1 mg  $\text{Fe}^{++}$  0,2 ccm  $n/100\text{-NH}_3$  oder 0,2 ccm  $n/100\text{-NaOH}$ , also weniger als 1 Molekül Base (1 Mol. Base wäre 0,33 ccm  $n/100$ ), so steigt die Oxydationsgeschwindigkeit zunächst sehr erheblich, etwa um 100%. Sie sinkt jedoch bald wieder ab, und nach 6—7 Stunden ist nicht erheblich mehr Sauerstoff aufgenommen, als in der Kontrolle ohne Base. Setzt man dagegen erheblich mehr Base zu, als 1 Molekül pro 1 Molekül Säure, z. B. 0,2 ccm  $n/10\text{-NH}_3$  oder 0,2 ccm  $n/10\text{-NaOH}$ , so wird die Linolensäureoxydation fast völlig gehemmt.

### 3. Weinsäure.

a) Nach einer bekannten Entdeckung von Fenton<sup>1)</sup> werden eine große Anzahl organischer Substanzen durch Wasserstoffsperoxyd oder andere Oxydationsmittel rasch oxydiert, wenn man Eisenoxydulsalz zugibt. Wie  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{++}$  wirkt auch  $\text{O}_2 + \text{Fe}^{++}$ , wenn belichtet wird (Fenton,<sup>1)</sup> Neuberg<sup>2)</sup>).

Die Weinsäure unterscheidet sich nun, wie ich beobachtete, insofern von vielen andern, die Fenton-Reaktion gebenden Substanzen, daß sie auch im Dunkeln bei Zugabe von Eisenoxydulsalz — unter gewissen Konzentrationsverhältnissen — oxydiert wird. Weinsäure Salze geben die Reaktion nicht.

Die Werte, die man für den Sauerstoffverbrauch beim Mischen von 2,5 ccm  $m/10\text{-}$  oder  $m/2\text{-}$ Weinsäure mit 0,1 ccm 0,8%iger Mohrscher Salzlösung ( $\equiv 0,1 \text{ mg Fe}^{++}$ ) erhält, sind aus der folgenden graphischen Darstellung (Figur 5) abzulesen.

Sauerstoffaufnahme in der Kontrolle ohne  $\text{Fe}^{++}$  habe ich, selbst in langen Zeiten, mit meiner Methode nicht beobachten können. Die Oxydationsbeschleunigung ist also jedenfalls sehr bedeutend.

b) Aus Figur 5 geht hervor, daß die Oxydationsgeschwindigkeit in dem System Weinsäure-Eisensalz rasch abnimmt. Der Grund ist der, daß der Katalysator ver-

<sup>1)</sup> Fenton, Journ. Chem. Soc., Bd. 65, S. 899; Bd. 75, S. 5; Bd. 87, S. 804 (1905) u. a. a. Orten.

<sup>2)</sup> Neuberg, Bioch. Zeitschr., Bd. 36, S. 37 (1911) u. a. a. Orten.

braucht, wird; denn erneuter Zusatz von Eisenoxydulsalz hat einen erneuten Anstieg der Oxydationsgeschwindigkeit zur Folge.

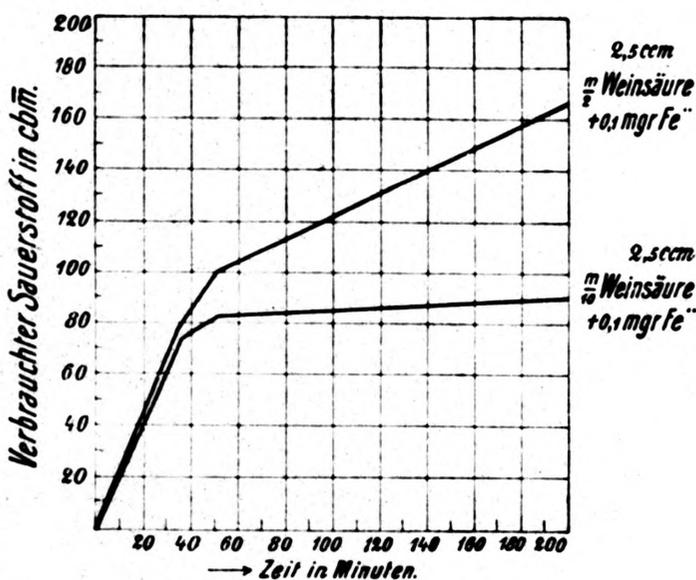


Fig. 5.

Der «Katalysatorverbrauch» ist nun offenbar nichts anderes, als die Überführung des Eisens in die Oxydform; denn Eisenoxydsalz ist nicht imstande, die Weinsäureoxydation zu katalysieren.

Diese zuerst paradox erscheinende Tatsache ist auf Grund der Autoxydationstheorie, die von Manchot<sup>1)</sup> und Engler<sup>2)</sup> für die Eisensalze aufgestellt wurde, leicht verständlich und ihrerseits ein neuer Beweis für die Richtigkeit der Theorie. Bei der Oxydation der Eisenoxydulsalze durch Luftsauerstoff entsteht nämlich nach Manchot primär nicht Eisenoxyd, sondern ein Eisensuperoxyd, das sich dann mit Eisenoxydul zu Eisenoxyd umsetzt. In unserm Fall hätten wir uns also vorzustellen, daß das primär gebildete Eisensuperoxyd durch die Weinsäure nur zum Teil zu Eisenoxydul reduziert wird, zum Teil jedoch durch die Weinsäure nur zu Eisenoxyd reduziert wird, oder sich mit Eisenoxydul zu Eisenoxyd umsetzt. So müßte sich die Menge des wirksamen Eisenoxyduls dauernd verringern.

<sup>1)</sup> Manchot, Zeitschr. f. anorg. Chemie, Bd. 27, S. 420 (1901).

<sup>2)</sup> Engler u. Weissberg, Krit. Studien zur Autoxydation, Braunschweig 1904.

c) Was die Beeinflussung der Oxydationsgeschwindigkeit in dem System  $\text{Fe}^{++}$ -Weinsäure anbetrifft, so ist der merkwürdige Einfluß der Neutralsalze erwähnenswert. Einige Beispiele sind in der folgenden graphischen Darstellung wiedergegeben, in der die angegebenen Molzahlen bedeuten, daß das System bezüglich des Salzes auf die genannten Molzahlen gebracht wurde.

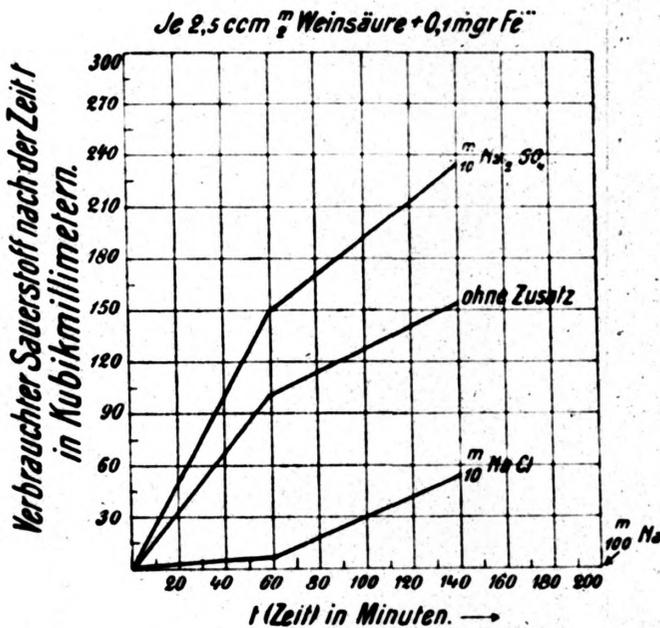
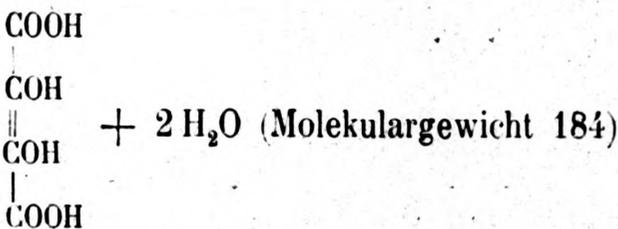


Fig. 6.

#### 4. Dihydroxymaleinsäure



wurde nach der Vorschrift von Fenton<sup>1)</sup> aus Weinsäure und Wasserstoffsperoxyd, bei Gegenwart von Eisensalz, dargestellt. Zum Nachweis der beschleunigenden Wirkung des Eisens wurden je 1 mg in 2 ccm Wasser gelöst und zu einer Probe 0,1 ccm 0,8%ige Lösung von Mohrschem Salz (= 0,1 mg  $\text{Fe}^{++}$ ) gegeben, während die andere Probe als Kontrolle diente. Nach 90', bei

<sup>1)</sup> Journ. of Chem. Soc., Bd. 87, S. 804 (1905).

20°, war dann in der eisenhaltigen Probe etwa zehnmal so viel Sauerstoff verbraucht als in der eisenfreien Probe.

Unter den erwähnten Bedingungen kommt die Reaktion nach ca. 6 Stunden praktisch zum Stillstand, pro Molekül Säure sind dann ca. 18000 ccm Sauerstoff, also nicht viel weniger als 1 Molekül Sauerstoff (1 Mol. = ca. 22000 ccm) verbraucht.

Bei der Reaktion entsteht pro Molekül verschwundenen Sauerstoffs annähernd ein Molekül Kohlensäure. Man kann das nachweisen, indem man zwei Atmungsgläschen mit gleichen Mengen Dihydroxymaleinsäure und Eisensalz beschickt, in den Einsatz des einen Atmungsgläschens KOH bringt, den Einsatz des anderen Atmungsgläschens jedoch leer läßt. Während in dem ersten Atmungsgläschen dann die Druckverminderung von der erwähnten Größe auftritt, bleibt der Druck in dem zweiten fast unverändert.

5. Andere Eisen-Oxydationskatalysen. Von Aldehyden, z. B. Önanthol, suspendiert man einige Milligramme in je 2 ccm und gibt zu einer Probe 0,1 mg Fe<sup>++</sup>, während die andere als Kontrolle dient. Zu bemerken ist dabei, daß der Einsatz b keine Kalilauge enthalten darf, da sonst Aldehyd durch Destillation in die Kalilauge gelangt und hier rasch oxydiert wird. — Was die Thioverbindungen anbetrifft, so habe ich selbst mit ihnen nicht experimentiert. Quantitative Angaben findet man bei Matthews und Walker<sup>1)</sup> und in einer jüngst erschienenen Arbeit von T. Thunberg.<sup>2)</sup>

#### VI. Über die Fähigkeit des in der Eissubstanz natürlich vorkommenden Eisens, Oxydationen zu beschleunigen.

Eine Frage von großer Wichtigkeit ist die, ob das im Ei vorkommende Eisen oxydationskatalytisch wirken kann; sie wird, wie mir scheint, am einfachsten und direktesten so entschieden, daß man der Eissubstanz Körper zusetzt, deren Oxydation durch Eisen katalysiert wird und dann zusieht, wie sich die Sauerstoffaufnahme verhält.

<sup>1)</sup> Journ. Biol. Chem., Bd. 6 (1909).

<sup>2)</sup> Skand. Arch. f. Physiol., Bd. 30, S. 285 (1913).

Wäre die Oxydationsgeschwindigkeit in der Granulasuspension sehr labil, würde sie durch viele und verschiedenartige Substanzen beschleunigt, so würde eine Steigerung der Sauerstoffaufnahme bei Zusatz durch Fe katalysierbarer Substanzen nicht viel beweisen. Demgegenüber wiederhole ich, was ich schon an anderer Stelle sagte, daß die Oxydation in der Granulasuspension nur durch ganz wenige Arten von Stoffen beschleunigt wird. Zu diesen gehören nun in der Tat Weinsäure und Linolensäure.

Im folgenden sollen einige auf Eisen zu beziehende Beschleunigungen im einzelnen durchgesprochen werden.

a) Das Ei enthält reichliche Mengen Lecithin; die Lecithin-Fe-Katalyse wird durch Säuren beschleunigt; in Übereinstimmung damit wächst die Oxydationsgeschwindigkeit der Eisubstanz unter dem Einfluß von H-Ionen sehr bedeutend.

Zum Nachweis empfehle ich, den Acetonniederschlag der Eisubstanz, der mit Äther gewaschen und dann getrocknet ist, zu benutzen. Reibt man 0,2 g dieses Niederschlags mit 2 ccm Wasser an, so wird in 100 Minuten bei 20° 20 bis 35 cmm Sauerstoff absorbiert, Kohlensäure entwickelt sich nicht. Reibt man nicht mit 2 ccm Wasser an, sondern mit 2 ccm  $\text{H}_2\text{O}-\text{HCl}$ , so wird in 100 Minuten 60 bis 70 cmm Sauerstoff verbraucht. Statt Salzsäure können mit gleichem Erfolg auch andere Säuren verwendet werden, gerade so wie im System Eisen-Lecithin.

Zu bemerken ist hier, daß es für die Wasserstoffionenkonzentration, wenn eine möglichst große Oxydationsgeschwindigkeit erzielt werden soll, ein Optimum gibt. Dieses Optimum wurde nicht gemessen<sup>1)</sup>, doch genügt für praktische Zwecke die Angabe, daß Methylviolett, dem Gemisch von Acetonpulver und Säure zugesetzt, einen blauvioletten Farbenton zeigen soll.

b) Von allen untersuchten Säuren abweichend verhielt sich die Weinsäure, für die, unter sonst gleichen Bedingungen

<sup>1)</sup> Das Acetonpulver bindet reichlich Säure, sodaß die Wasserstoffionenkonzentration nicht aus der Menge der zugegebenen Säure berechnet werden kann.

der Zuwachs der Oxydationsgeschwindigkeit weitaus am größten war.

Wurden 0,2 g Acetonpulver mit 2 ccm  $m/2$ -Weinsäure an-gerieben, so wurden in 100 Minuten bei 20° nicht 60—70 cmm, wie unter dem Einfluß der andern Säuren, sondern 140 cmm Sauerstoff verbraucht, also 70—80 cmm mehr. Es ist mir nicht zweifelhaft, daß diese Ausnahmestellung der Weinsäure darauf beruht, daß sie selbst unter der Eisenwirkung oxydiert wird.

c) Die Linolensäure.

In a und b handelte es sich um Katalysen in stark saurem Milieu, in dem möglicherweise Eisen aus nichtkatalysierfähiger Form in katalysierfähige Form übergeführt worden sein könnte. Es ist deshalb wichtig, daß auch bei Zugabe von Linolensäure — deren gesättigte wässerige Lösung nur un-gemein schwach sauer reagiert — die Oxydation in der Eisubstanz sehr erheblich beschleunigt wird.

Die Linolensäureversuche wurden nicht mit dem Acetonpulver, sondern mit der frischgewonnenen Granulasuspension angestellt. Dabei stieß ich auf eine Erscheinung, die als Möglich-keit vorauszusehen war: wenn nämlich das in der Granula-suspension natürlich vorkommende Eisen als Sauerstoffüber-träger wirkt, so wird Zugabe einer Substanz, deren Oxydation durch Eisen katalysiert werden kann, keineswegs unter allen Umständen den Gesamtverbrauch an Sauerstoff steigern, z. B. dann nicht, wenn die zugesetzte Substanz dem oxydierten Eisen seinen Sauerstoff nur ebensoschnell oder lang-samer fortnehmen kann, als die oxydable Substanz des Systems selbst. Dieser Fall ist offenbar für die Linolensäure realisiert, denn der Sauerstoffverbrauch steigt so gut wie nicht, wenn man sie zu der frischen Granulasuspension zusetzt.

Wie wir oben gesehen haben, nimmt die Oxydations-geschwindigkeit in der Granulasuspension dauernd ab und wie wir weiterhin gesehen haben, hat nach diesem Abklingen Zu-satz von Eisen nur noch eine viel geringere Mehraufnahme von Sauerstoff zur Folge, als anfänglicher Eisenzusatz. Also: nachdem die Oxydation der Granulasuspension abge-

klungen ist, enthält sie nur noch wenig durch Eisen oxydierbare Substanz.

Setzt man zu dieser Zeit Linolensäure zu, so beobachtet man jetzt ein starkes Anwachsen des Sauerstoffverbrauchs.

Als Beispiel dieser überaus wichtigen Verhältnisse sei ein Versuch in graphischer Darstellung (Figur 7) wiedergegeben. Die verwendete Granulasuspension war ein wenig verdünnter als sonst, damit ihr Sauerstoffverbrauch schneller nachließe (4 ccm hüllenlose, zu einem dichten Sediment zusammenzentrierte Eier + 4 ccm  $S^1$ , geschüttelt). Je 2 ccm wurden in ein Atmungsgläschen pipettiert und die Atmung bei  $23^\circ$  mehrere Stunden beobachtet und notiert. Nach 3 Stunden war sie sehr schwach geworden. Nun wurde (Pfeil der Figur 7!) in ein Gläschen 0,1 ccm Linolensäure gegeben (das andere blieb ohne Zusatz), und der Sauerstoffverbrauch weiter beobachtet. Nach 100', gerechnet vom Augenblick der Linolenzugabe an, hatte die mit Linolensäure versetzte Probe 88 cmm Sauerstoff verbraucht, die Kontrolle nur 11 cmm. Um den durch spontane Oxydation der Linolensäure entstehenden Fehler auszuschalten, wurden gleichzeitig 0,1 ccm Säure in 2 ccm  $S^1$  geschüttelt und die hierbei auftretenden Druckverminderungen von den für Linolensäure + Eisubstanz erhaltenen Werten abgezogen.

Es verbrauchten:	nach 30'	nach 100'
Linolensäure allein	3	14 cmm $O_2$
Eisubstanz »	3	11 » »
Linolensäure + »	25	88 » »

Für die Sauerstoffaufnahme im System Linolensäure + Eisubstanz ist also korrigiert zu setzen:

$$\begin{aligned} \text{nach } 30' & 25 - 3 = 22 \text{ cmm } O_2 \\ \text{» } 100' & 88 - 14 = 74. \quad \text{»} \quad \text{»} \end{aligned}$$

Die korrigierten Werte sind in das Koordinatensystem der Figur 7 eingetragen.

### VII. Theorie.

Auf Grund der mitgeteilten Tatsachen stelle ich die Theorie auf, daß die Sauerstoffatmung im Ei eine Eisenkatalyse ist; daß der im Atmungsprozeß verzehrte Sauerstoff

primär von gelöstem oder adsorbiertem Ferroion aufgenommen wird.

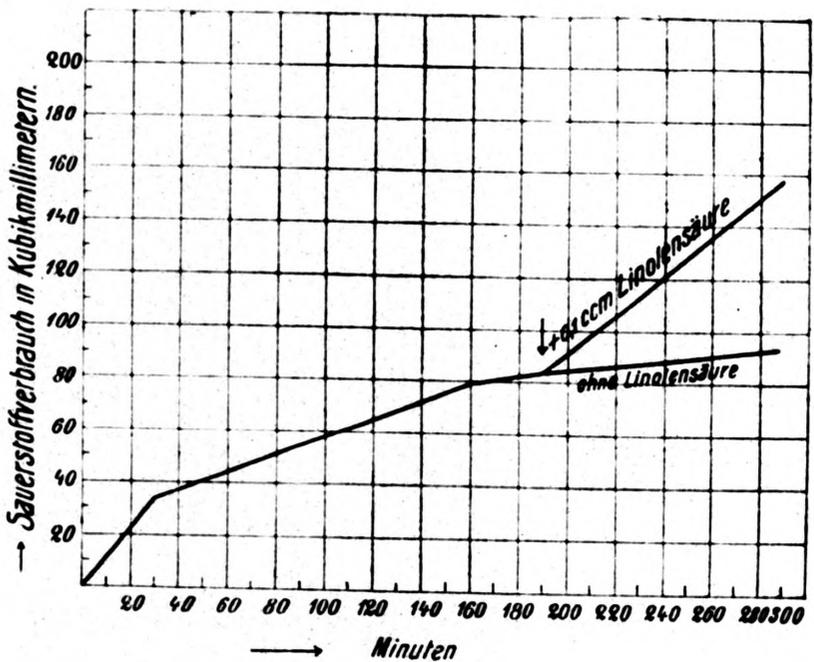


Fig. 7.

Ein Beweis für die Richtigkeit dieser Auffassung ist durch das Tatsachenmaterial nicht erbracht; wenn auch gezwungen und unter Annahme von Zufälligkeiten, läßt sich die Annahme verteidigen, daß die Atmung zwar durch Eisenzusatz beschleunigt wird, selbst jedoch keine Eisenkatalyse ist.

Daß die Theorie aber eine ungemein wahrscheinliche und einfache Erklärung der verschiedenen Tatsachen gibt, geht vielleicht am besten aus einer kurzen Zusammenfassung der Versuchsergebnisse hervor.

1. Die aus Seeigeleiern gewonnene atmende Flüssigkeit enthält auf 100 mg Stickstoff 0,02—0,03 mg Eisen.

2. Der Acetonniederschlag der Flüssigkeit gibt mit Rhodankali und Salzsäure Eisenionreaktion.

3. Fügt man zu der frisch hergestellten Flüssigkeit kleine Mengen Eisensalz, so steigt die Oxydationsgeschwindigkeit, höchstwahrscheinlich auch die Geschwindigkeit der Kohlensäureproduktion; und zwar beträgt die Steigerung der Oxydationsgeschwindigkeit

70–100%, wenn man auf 100 mg Stickstoff Hundertstel-Milligramme Eisen zusetzt. Größere Eisenmengen wirken nicht erheblich stärker; bedeutend kleinere Eisenmengen wirken nicht. Die Größenordnungen der bei Zusatz gerade wirksamen Eisenmengen und der im Ei natürlich vorkommenden Eisenmengen sind also gleich.

4. Fügt man das Eisensalz erst zu, nachdem die Atmung sehr schwach geworden ist, so ist der Mehrverbrauch an Sauerstoff viel geringer, als wenn das Eisen zur Zeit der ungeschwächten Atmung zugefügt wird. Der Stoff, auf den das zugesetzte Eisen den Sauerstoff überträgt, wird also offenbar im Atmungsprozeß verbraucht.

5. Der bei Eisenzusatz auftretende Mehrverbrauch an Sauerstoff wird durch das Narkoticum Äthylurethan um fast genau den gleichen Bruchteil gehemmt, wie die Atmung selbst.

6. Setzt man der Flüssigkeit Substanzen zu, deren Oxydation unter dem Einfluß von Eisen beschleunigt wird, so beobachtet man einen Mehrverbrauch von Sauerstoff; die Flüssigkeit verhält sich also als Katalysator wie Eisensalz; oder: das in der Flüssigkeit natürlich vorkommende Eisen ist imstande, Oxydationen zu beschleunigen.

### VIII. Anwendungen der Theorie.

1. Es spricht für die Theorie, daß eine fundamentale Tatsache der Atmungschemie durch sie sofort erklärt ist: die hemmende Wirkung sehr kleiner Blausäuremengen. Blausäure würde mit  $\text{Fe}^{++}$ -Ion das komplexe und katalytisch unwirksame Ferrocyanion bilden. Sie würde in minimalen Mengen wirken, weil auch die umzusetzenden Eisenmengen minimal wären.

2. Schon mehrfach fiel es auf, daß die Oxydation in der Zelle große Ähnlichkeit hat mit der Oxydation durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  bei

Gegenwart von Eisensalz.<sup>1)</sup> Nun bildet sich aus Eisenoxydul bei der Autoxydation zunächst höchstwahrscheinlich ein Superoxyd, und wir hätten dann in der Zelle als Oxydationsmittel Superoxyd<sup>2)</sup> bei Gegenwart von Eisenoxydulsalz.

Auch die verschiedenen Peroxyd- und Superoxydtheorien der Atmung erhalten von diesem Standpunkt aus ein ganz anschauliches Gesicht.

### IX. Historische Bemerkung.

Die Vermutung, daß das Eisen im Mechanismus der Atmung eine Rolle spiele, ist wohl schon mehrfach geäußert worden; wußte man doch einerseits, daß das Eisen sehr allgemein in Zellen vorkommt, andererseits, daß es im Reagenzglas Oxydationen beschleunigen kann. Es handelte sich hier um Vermutungen, die der experimentellen Begründung ebenso entbehrten, wie die Mangan-, Calcium- oder andere Atmungstheorien.<sup>3)</sup>

---

<sup>1)</sup> Vgl. beispielsweise Dakin, Journ. biol. chemistry. Bd. 1, S. 17 (1906).

<sup>2)</sup> Wasserstoffsuperoxyd oder Eisensuperoxyd.

<sup>3)</sup> Für Nichtfachgenossen sei hier bemerkt, daß die Sauerstoffaufnahme des eisenhaltigen Hämoglobins, wie sie beispielsweise im Säugetierblut vor sich geht, mit der Sauerstoffatmung chemisch nichts zu tun hat; das Hämoglobin kommt hier mit den Zellen, an die es den Sauerstoff abliefern, gar nicht in Berührung.

Kristineberg, den 30. Mai.

---