

Zellatmung.

IV. Mitteilung:

Über den Oxydationsmechanismus der Kartoffeln.

Von

A. v. Szent-Györgyi.

(Aus dem physiologischen Laboratorium der Reichsuniversität zu Groningen.)

(Eingegangen am 15. Juli 1925.)

In den vorhergehenden Mitteilungen¹⁾ wurde die Theorie entwickelt, daß im höheren tierischen Organismus der *aktivierte* Wasserstoff durch den *aktivierten* Sauerstoff verbrannt wird, daß aber hierbei der Sauerstoff nicht in diffuser Weise zu einem gewissen erhöhten Oxydationspotential erhoben wird, durch das nun der aktive Wasserstoff unmittelbar wegoxydiert wird, sondern daß die Sauerstoffaktivierung die Funktion eines Ferments sei, deren Wirksamkeit in relativ scharfer Weise gegen bestimmte Substanzen gerichtet ist, die durch das Ferment nur ganz oberflächlich unter Verlust von Wasserstoffatomen oxydiert und die dann durch den aktiven Wasserstoff wieder zur Ausgangssubstanz reduziert werden. Es wurde gezeigt, daß eine dieser Substanzen, die im Wesen also Wasserstofftransporteure darstellen, ein aromatischer Körper sein muß²⁾.

Die definitive Stütze dieser Theorie scheint mir in der Isolierung und Identifizierung dieser intermediären Wasserstofftransporteure zu liegen, die dann auch die Möglichkeit eröffnet, die chemischen Ver-

¹⁾ Mitteilung I diese Zeitschr. 150, 195, 1924; Mitteilung II ebendasselbst 157, 50, 1925; Mitteilung III ebendasselbst 157, 67, 1925.

²⁾ Auf Grund mancher Erfahrungen scheint es auch nicht unwahrscheinlich, daß das Succinoxydon von *Battelli* und *Stern*, d. h. das Ferment, das Bernsteinsäure zu Fumarsäure oxydiert, ebenfalls die Oxydase eines derartigen Oxydationssystems darstellt, in der ein bernsteinsäureähnlicher Körper als Wasserstofftransporteur fungiert, der unter Abgabe und Aufnahme von zwei Wasserstoffatomen abwechselnd in seine ungesättigte (Fumarsäure) bzw. gesättigte Form übergeht.

änderungen festzustellen, die das Molekül des Transporteurs unter Einwirkung der Oxydations- bzw. Reduktionsfermente erleidet. Meine mit Eifer durch längere Zeit vorgenommenen diesbezüglichen Versuche scheiterten aber an der großen technischen Schwierigkeit, die das tierische Material in diesem Gebiet dem Forscher bietet. Die hier bestehenden starken Reduktionswirkungen sind namentlich in hohem Maße geeignet, die Wirkung der relativ so empfindlichen Oxydasen zu verdecken, die nicht in befriedigender Weise frei von Wasserstoffaktivierungsfermenten, Brennstoffen und sonstigen störenden Beimengungen präpariert werden konnte.

Ergab aber die Arbeit an diesem Material auch nicht die erwünschten Resultate, so führte sie doch zu manchen für die weitere Arbeit wertvollen Einzelbeobachtungen. Einen sehr tiefen Eindruck hierbei machte dann auch die weitgehende Analogie zwischen den Oxydationsprozessen der Pflanze und Tiere, die uns an so vielen Punkten in so markanter Weise entgegentrat, und dann auch den Gedanken einflößte, vor dem weiteren Angriff des so verwickelten tierischen Materials zunächst einige Erfahrungen am pflanzlichen Material zu sammeln, das bei der Analyse dem tierischen Material gegenüber sehr weitgehende technische Vorteile bietet. Im folgenden seien einige dieser Erfahrungen wiedergegeben.

1. Die Guajakreaktion.

Wird eine frische Schnittfläche einer Kartoffel mit Guajaktinktur benetzt, so sieht man als Zeichen der Oxydation des Harzes die bekannte prachtvolle grüne Farbe auftreten. Diese Reaktion bildet seit mehr als 100 Jahren den Gegenstand zahlreicher Untersuchungen, die zum Ziele haben, eine tiefere Einsicht in den Oxydationsmechanismus der Pflanzen zu gewinnen¹⁾.

Durch die Arbeiten von *J. Wolff*²⁾, *Wolff* und *N. Rouchelmann*³⁾, *M. W. Onslow*⁴⁾ und *M. E. Robinson*⁵⁾ ist in den letzten Jahren in die Auffassung dieser Reaktion ein wesentlicher Umschwung gekommen. Durch die Arbeiten ist es namentlich deutlich geworden, daß bei dem Zustandekommen dieser Reaktion neben den Oxydationsfermenten Brenzcatechinderivate eine wesentliche Rolle spielen. Die Arbeiten von *Wolff* und seiner Mitarbeiterin beziehen sich eigentlich nicht auf die Guajakreaktion, sondern beschäftigen sich mit der analogen Jod-Stärkereaktion.

¹⁾ Über die Geschichte dieser Reaktion lese man die so lesenswerte schöne Monographie von *J. H. Kastle*: *The Oxidases*. *Treas. Dep. Pub. Health and Mar.-Hosp. Service U. S. Hygien. Lab. Bull.* **59**.

²⁾ *J. Wolff*, *Ann. Inst. Past.* **31**, 92, 1917.

³⁾ *J. Wolff* und *N. Rouchelmann*, ebendasselbst **31**, 96, 1917.

⁴⁾ *M. W. Onslow*, *Biochem. Journ.* **13**, 1, 1919; **14**, 535, 1920; **14**, 541, 1920; **15**, 107, 1921; **15**, 113, 1921.

⁵⁾ *M. E. Robinson*, ebendasselbst **18**, 543, 1924.

Sie erbringen den Beweis, daß die pflanzlichen Gewebe den Jodwasserstoff nur in Gegenwart von Brenzcatechinderivaten zu Jod zu oxydieren vermögen, und zeigen zugleich, daß bei dieser Reaktion die natürlichen Brenzcatechinderivate durch künstlich zugesetztes Brenzcatechin ersetzt werden können. Die ausgedehnten schönen Arbeiten *Onslows* erbringen denselben Beweis dann auch für die Guajakreaktion.

Die experimentelle Grundlage obiger Arbeiten gibt aber keine weitere Aufklärung über den Mechanismus der Reaktion, die dann auch von *Wolff* und *Onslow* in verschiedener Weise gedeutet wird. *Wolff* nimmt an, daß durch das Oxydationsferment das Brenzcatechin zum Chinon oxydiert wird, das dann unmittelbar den Jodwasserstoff oxydiert. *Onslow* hingegen sieht durch ihre Versuche den folgenden Reaktionsmechanismus bewiesen: bei der Reaktion sind zwei verschiedene Fermente im Spiele. Das erste bewirkt die Oxydation des Brenzcatechins zu einem Peroxyd (Oxygenase), das dann, mit einem zweiten Ferment, einer Peroxydase, in Reaktion tretend, das Guajak oxydiert. Mit dieser Auffassung wird eigentlich nur der älteren *Bach-Chodatschen* Theorie eine neue Form gegeben. Nach diesen Theorien ist es also eine Peroxydase, die die eigentliche Oxydation ausübt und der der wesentliche Anteil bei den Verbrennungen zukommt. Die Oxygenase hat eben nur für dieses Ferment das Peroxyd vorzubereiten.

Um dieser prinzipiell so bedeutenden Frage näher zu treten, habe ich zunächst mit dem Kartoffelmateriale die *Wolffschen* und *Onslowschen* Versuche wiederholt und kann beide vollauf bestätigen. Werden die Fermente von Brenzcatechinen frei präpariert, so vermögen sie nicht das Guajakharz anzugreifen. Wird hingegen Brenzcatechin zugesetzt, so sieht man bald die blaue Farbe erscheinen, die dann allmählich zu einer tiefblauen Farbe anwächst. Zweifelsohne ist der primäre Vorgang in diesem Prozeß die Oxydation des Brenzcatechins durch das Ferment. Was mir aber durch die *Onslowschen* Versuche noch ganz unbewiesen erschien, war, daß dieses Oxyd des Catechins tatsächlich ein Peroxyd sei, das unter Mitwirkung von besonderen Fermenten, der Peroxydasen ihre Oxydationskraft entfaltet. Um diese Frage zu entscheiden, wurde folgendermaßen vorgegangen: Das Brenzcatechin wurde mit dem Ferment 10 Minuten lang ohne Guajak bebrütet, dann wurde das Ferment präzipitiert, wobei das Oxyd des Catechins in Lösung blieb. Nun wurde dieses fermentfreie Oxyd mit Guajak versetzt. Sogleich zeigte sich eine blaue Farbe, die sehr rasch dunkelte und die im Laufe 1 Minute dieselbe Farbentiefe erreichte als die Kontrollproben, in denen Guajak mit Ferment und Brenzcatechin 10 Minuten lang bebrütet wurde.

Dieser Versuch besagt in unzweideutiger Weise, daß an der Bläuung des Guajaks keine Fermente beteiligt sind. Die gesamte Reaktion besteht also aus zwei Phasen, aus der Oxydation des Brenzcatechins durch eine Oxydase und dann der unmittelbaren Oxydation des Guajaks durch dieses Oxyd des Brenzcatechins. Eine Peroxydase ist also nicht im Spiele; das einzige Ferment, das sich an der Reaktion beteiligt, ist

die Oxydase, die das Brenzcatechin unter Einwirkung des Luftsauerstoffs zu seinem Oxyd oxydiert.

Was die Form dieses Oxydes anbelangt, so müssen wir auf Grund der Arbeit von *Willstätter* und *Müller*¹⁾ in erster Linie an ein Chinon denken, und zwar an die Diketoform des Chinons, da die Peroxydform wegen ihrer Labilität kaum in Betracht kommen kann²⁾. Es fragte sich nun, ob die Oxydationskraft dieses Chinons in der Tat genügend stark sei, um diese starke oxydative Wirkung zu erklären. Der Versuch ergab, das die Oxydationskraft des nach *Willstätter* und *Müller* präparierten Chinons Guajak gegenüber tatsächlich mit der Oxydationskraft des durch Kartoffeloxydase gewonnenen Chinons übereinstimmt.

Die Guajakreaktion läßt sich also folgendermaßen formulieren: die Phenoloxydase oxydiert das Brenzcatechin zum Diketo-Chinon, das ohne Mitwirken eines Fermentes das Guajak unmittelbar oxydiert. Peroxydasen haben keinen Anteil an der Reaktion³⁾.

¹⁾ *Willstätter* und *Müller*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **41**, 2580, 1908.

²⁾



Diketo-Chinon



Peroxyd-Chinon

³⁾ Ich kann hier die Bemerkung nicht unterdrücken, daß, trotz der ausgebreiteten Peroxydasiliteratur mir das Bestehen von Peroxydasen ganz unbewiesen, ja sogar in hohem Maße zweifelhaft erscheint. Alle Oxydasen, die verschiedene Substanzen durch den Sauerstoff der Luft oxydieren, müssen in ihrem Molekül Atomgruppierungen haben, die zum Binden und Übertragen des molekularen Sauerstoffes geeignet sind. Daß derartige Atomgruppen, so wie z. B. im Hämoglobin, auch den ihnen von Peroxyden künstlich aufgezwungenen aktiveren Sauerstoff ebenfalls übertragen können, kann kein Wunder nehmen und ist kein Beweis für eine biologische Peroxydasenfunktion, ebensowenig, wie man vom Hämoglobin sagen wird, daß es eine Peroxydase sei, weil es auch den Sauerstoff von künstlich zugesetzten Peroxyden zu übertragen vermag. Eine weitere flüchtige Analogisierung der Oxydasen mit dem Hämoglobin ist meiner Ansicht nach ausreichend, um das weitere Tatsachenmaterial, das das Bestehen der Peroxyde stützt, zu erklären. Nimmt man an, daß bei der Oxydase, ebenso wie beim Hämoglobin durch verschiedene schädliche Faktoren zuerst die Fähigkeit verloren geht, molekularen Sauerstoff zu übertragen, während dessen die Fähigkeit, den Sauerstoff der Peroxyde zu übertragen, noch lange erhalten bleiben kann, so wird man in einfacher Weise auch ohne Annahme von Peroxydasen begreifen, daß es gelingt, nach langer Behandlung mit Alkohol (*Bach* und *Chodat*, *Linossier*, *Aso*) oder höherer Temperaturen „oxydasefreie Peroxydasen“ zu erhalten. Daß zahlreiche Pflanzen Guajak oder Jodstärke nur nach Zugabe von Peroxyd, nicht aber ohne dieses bläuen können (nach der alten Auffassung also nur Peroxydasen und keine Oxydase enthalten) läßt sich nun auf Grund der Arbeiten von *Wolff* und *Onslow* auch ohne Peroxydase ungezwungen erklären. Ob das Gewebe die genannten Reagenzien färbt, ist wohl in erster Reihe nur von der Frage abhängig, ob die Pflanze neben der Oxydase auch ein Brenzcatechin enthält.

Das *Fermentpräparat* wurde für diese Versuche, anlehnend an *Onslow*, folgendermaßen hergestellt:

Junge Kartoffeln wurden gewaschen, dann an einem mit einem Messer montierten Schabebrett, das im Haushalt gebraucht wird, in dünne Scheiben zerschnitten. Das Messer des Brettes wurde so gestellt, daß die Scheiben sehr dünn waren. Nur die fermentreicheren peripheren Teile der Kartoffeln wurden verarbeitet. Die zentrale Masse, die ungefähr die Hälfte bis zwei Drittel des Gewichtes der Kartoffel ausmachte, wurde verworfen. Die derart hergestellten Scheiben fielen vom Brette unmittelbar in einen großen alkoholhaltigen Becher, der einen Liter 96 Proz. Alkohol enthielt. Nachdem so 330 g Kartoffeln im Becher gesammelt wurden, wurde etwa eine halbe Stunde lang mit einem dicken, scharf abgeschnittenen Glasstabe gerührt und gestampft. Dann wurde die Masse an einer großen Büchnerkerze filtriert, der Rest tüchtig ausgepreßt, nochmals in einem Becher mit 500 ccm Alkohol etwa ein halbe Stunde lang in obiger Weise behandelt, dann durch ein Tuch filtriert, ausgepreßt und der Rest an der Buchnerpresse mit 300 Atm. Druck ausgepreßt. Der praktisch trockene Rest wurde in einer Mühle zu einem feinen Pulver zermahlen. Das derart gewonnene Pulver wird als Fermentpräparat gebraucht. Das Präparat ist zum Arbeiten sehr angenehm, und es läßt sich längere Zeit im Vakuumexsikkator mit unveränderter Wirksamkeit bewahren. Es wurde von diesem Fermentpräparat zu einem jeden Versuch ein kleines Spatelchen voll (± 30 mg) genommen und in Wasser oder 0,2 mol. Phosphatlösung von der entsprechenden p_H suspendiert (KH_2PO_4 und Na_2HPO_4 bzw. Mischungen beider). Dieser Suspension wurde dann, wo nötig, stets ein Tropfen einer 1proz. frischen Guajaktinktur zugesetzt, und zwar wurde die Tinktur stets nach dem Ferment zugesetzt, da ohne Ferment das Guajak zum größten Teile rasch ausflockt. Die Versuche wurden alle in kleinen, 6 ccm fassenden Becherchen ausgeführt.

Wird nun in dieser Weise das Ferment (30 mg) in 1 ccm Wasser suspendiert, dann 1 Tropfen Guajaktinktur zugesetzt und dann

Arbeitet die Pflanze an Stelle des Systems Oxydase—Brenzcatechin mit Oxydase—Hydrochinon, so wird man natürlich eine Bläuung des Guajaks nur nach Zugabe von Peroxyd beobachten können. Nehmen wir zuletzt an, daß die Oxydasen, ebenso wie das Hämoglobin, aus einem leicht spaltbaren hochmolekularen, kolloidalen und einem niedrigmolekularen, diffusiblen, mehr lipoidlöslichen Teil bestehen (Globin und Hämatin), von welchen letzterer den Sauerstoffakzeptor trägt, der aber an und für sich, so wie das Hämatin nur noch Peroxyd-Sauerstoff, nicht aber mehr molekularen Sauerstoff übertragen kann, so wird man auch die Trennbarkeit von Oxydase und Peroxydase durch Alkohol (*Aso*), Ultrafiltration (*Bach*) und die Diffusibilität der Peroxydasen (*Bach* und *Chodat*), sowie die Aktivierung der Oxydasen durch „Peroxydase“ (*Bach* und *Chodat*) ungezwungen erklären können. Ich meine hiermit natürlich nicht, das Nichtbestehen von Peroxydasen beweisen zu können. Ich möchte nur darauf hinweisen, daß sich das Tatsachenmaterial, das das Bestehen der Peroxydasen stützt, sich auch ungezwungen ohne die Annahme besonderer Fermente in viel einfacherer Weise erklären läßt und somit die ganze Frage aus diesem Standpunkte einer Revision bedarf.

im Thermostaten bei 37° bebrütet, so zeigt sich nach 10 Minuten nur eine sehr geringe blaue Verfärbung. Wird hingegen noch 1 Tropfen einer verdünnten Brenzcatechinelösung zugesetzt, so zeigt sich bald eine tiefe blaue Farbe. Es lag im allgemeinen Interesse, erst die optimalen Bedingungen dieser Reaktion aufzusuchen.

Die Konzentration des Brenzcatechins sowie die Wasserstoffionenkonzentration haben einen sehr starken Einfluß auf den Gang der Reaktion. Der Einfluß der Konzentration des Brenzcatechins sei durch folgenden Versuch illustriert: Es wird eine Reihe von Becherehen mit je 1 cem einer wässerigen Brenzcatechinelösung versetzt. Im ersten Becher ist die Konzentration des Phenols 5 Proz., im folgenden 2,5 Proz., im dritten wieder halb so stark usw. Dann wird in jedes Becherehen ein Spatelchen Ferment und dann ein Tropfen Guajaklösung getan und die ganze Reihe 10 Minuten lang bei 37° bebrütet. Das Resultat ist in folgender Reihe dargestellt, wobei die Kreuze die relative Intensität der blauen Farbe angeben: 0, 0, 0, 0, 0, 0, ±, ±, +, +, ++, +++, ++, ++, +, +, ±, ±, 0. Der Versuch ergibt also, daß *die Reaktion eine optimale Konzentration hat, die ungefähr bei 0,006 Proz. liegt. Bei 0,0001 Proz., also in einer Konzentration von 1 : 1 000 000, ist die Reaktion noch positiv.* Ebenso auffallend ist aber auch die starke Reaktionshemmung bei höheren Konzentrationen. Diese kommt nicht durch die Hemmung der Fermentfunktion zustande, da die tiefbraune Farbe der Flüssigkeiten die weitgehende Oxydation des Catechins beweist. Es sei vorausgreifend bereits hier festgestellt, daß die Hemmung der Oxydation durch die Hemmung der zweiten Reaktion, der Oxydation des Guajaks durch das Chinon zustande kommt, da aller Wahrscheinlichkeit nach das entstandene Chinon mit dem Überschuß des Catechins unter Bildung minder aktiver Verbindungen reagiert.

Ebenso stark ist der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration. In sekundärem Natriumphosphat kommt die Reaktion gar nicht zustande. In einer Phosphatmischung von p_H 7,4 kommt sie relativ rasch zustande, hat aber eine starke Neigung, bald zu verblassen. Minder rasch kommt und verblaßt die Reaktion bei p_H 7. In primärem Phosphat kommt sie relativ langsam zustande, ist aber dann auch relativ stabil, so daß die Reaktion nach 10 Minuten langer Bebrütung in der Regel in primärem Phosphat deutlich stärker ist als bei p_H 7 (oder in ungepuffertem Wasser). Wahrscheinlich kommt die Reaktion zwischen Chinon und dem unveränderten Brenzcatechin mit steigendem p_H stets leichter zustande. Bei 10 Minuten langer Bebrütung scheint das Reaktionsoptimum für die Guajakreaktion etwa bei p_H 6,4 zu liegen, die Reaktion, die dem wiederholt gemessenen normalen p_H der Kartoffelzellsäfte entspricht.

Es wurde nun folgende Versuchsreihe wiederholt ausgeführt:

a) 1 ccm primäres Phosphat wird mit 1 Tropfen 0,1proz. Brenzcatechinelösung, 30 mg Ferment und 1 Tropfen 1proz. Guajak tinktur versetzt und 10 Minuten lang bebrütet. Blaue Farbe ++.

b) 1 ccm primäres Phosphat wird mit derselben Menge Ferment und Brenzcatechin aber ohne Guajak 10 Minuten lang bebrütet. Dann werden 4 ccm Methylalkohol zugesetzt (das Ferment präzipitiert), an einer kleinen Büchnerkerze mit gehärtetem Filterpapier filtriert, das Filtrat beim Vakuum der Wasserstrahlpumpe in dem a. a. O. beschriebenen¹⁾ Kölbchen unter sehr gelindem Erwärmen auf 1 ccm eingedampft. Trotz der Erwärmung bleibt hierbei die Flüssigkeit unter Zimmertemperatur. Die alkohol- und fermentfreie Flüssigkeit wird nun in ein Becherglas gegossen und mit 1 Tropfen Guajak versetzt. Sogleich zeigt sich eine Blaufärbung, die in einer Minute ihr Maximum erreicht, das der Farbtiefe des obigen Versuchs a) entspricht.

c) Derselbe Versuch wird wiederholt mit dem Unterschied, daß der Tropfen Brenzcatechin erst nach der Bebrütung, nach der Zugabe von Alkohol zugesetzt wurde. Weiter wird vorgegangen wie oben. Die Flüssigkeit zeigt weder direkt, noch nach 10 Minuten langer Bebrütung eine blaue Farbe. Dieser Kontrollversuch zeigt, daß das Ferment tatsächlich quantitativ präzipitiert wurde, und daß das oxydierende Produkt aus dem Catechin nur unter Einwirkung des Ferments entsteht.

Anschließend an diese Versuche wurde festgestellt, daß die alkoholische Chinonlösung beim Stehen bald inaktiv wird. Auch beim Erwärmen der wässrigen Lösung wird das Chinon bald inaktiv. 10 Minuten langes Bebrüten bei 37° wird vom Chinon noch gut ertragen. Wird aber vor der Bebrütung überschüssiges Brenzcatechin der wässrigen Chinonlösung zugesetzt, so verliert sie bald ihre Wirksamkeit.

Es fragte sich nun, ob sich in diesen Versuchen tatsächlich ein Diketochinon für die Oxydation des Guajaks verantwortlich machen ließ, da doch in allen diesen Versuchen nicht mehr als 0,005 Proz. Brenzcatechin verwendet wurden. Um zu entscheiden, ob mit einer so geringen Menge des Chinons eine so tiefe Färbung des Guajaks bewirkt werden konnte, wurde nach *Willstätter* und *Müller*²⁾ das Diketochinon hergestellt, in primärem Phosphat gelöst und in verschiedenen Konzentrationen mit Guajak versetzt. Es zeigte sich hierbei, daß bei einer Konzentration von 0,005 Proz. sich noch ungefähr dieselbe tiefe Färbung

¹⁾ *A. v. Szent-Györgyi* und *Ty. Tominaga*, diese Zeitschr. 146, 232, 1924.

²⁾ l. c.

des Guajaks erreichen ließ wie im Kartoffeloxydaseversuch bei derselben Brenzcatechinkonzentration. Ähnlich wie das durch Oxydase-wirkung erhaltene Chinon zeigte auch das nach *Willstätter* und *Müller* präparierte Chinon eine ziemlich große Labilität, und wurde in seiner Wirksamkeit durch überschüssiges Brenzcatechin stark gehemmt.

Es lag nun an der Hand, neben dem Brenzcatechin auch noch andere Phenole auf ihr Aktivierungsvermögen zu prüfen. Auch *Onslow* berichtet über derartige Versuche, in denen er feststellt, daß im Gegensatz zum Brenzcatechin Adrenalin und Tyrosin unwirksam waren. Ein positives Resultat konnten sie hingegen mit dem p-Kresol erhalten. Unsere Resultate, die mit diesen *Onslowschen* Angaben gut übereinstimmen, sind in folgender Tabelle zusammengestellt. Es sei bemerkt, daß zu diesen Versuchen ein Fermentpräparat zur Verwendung kam, das mit Alkohol nicht vollständig extrahiert war, daher noch geringe Reste des natürlichen Brenzcatechins enthielt und imstande war, auch ohne besondere Zugabe das Guajak in deutlicher Weise zu bläuen.

Lösungsmittel	0,2 mol. KH_2PO_4						0,2 mol. — $\frac{\text{K}_2\text{HPO}_4}{\text{Na}_2\text{HPO}_4}$ 1 : 2					
	0,25	0,06	0,015	0,004	0,001	0	0,25	0,06	0,015	0,004	0,001	0
Phenol	+++	++	++	++	+	+	++	+	+	±	±	±
p-Kresol	+++	++	++	++	++	+	+++	+	+	+	+	±
o-Kresol	+	+	+	+	+	+	±	±	±	±	±	±
m-Kresol	++	+	+	+	+	+	++	+	±	±	±	±
Tyrosin	±	±	±	±	+	+	0	0	0	0	±	±
Adrenalin	0	0	0	±	±	+	0	0	0	±	±	±
Dopa (3,4 Dioxy-phenylalanin) . .	0	0	0	+	+	+	0	0	0	0	0	+
Hydrochinon . . .	0	0	0	0	±	+	0	0	0	0	0	±
Pyrogallol	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	±
p-Amidophenol . .	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	±
p-Phenylendiamin .	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	±
m-Phenylendiamin .	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	±
o-Phenylendiamin .	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	±

Inkubationszeit 10 Minuten. — Gebrauchte wurden auf 1 ccm Phenollösung 50 mg Ferment und 1 Tropfen 1 proz. Guajaks.

Wir wir aus der Tabelle ersehen, wurde mit Phenol und p-Kresol eine Aktivierung erhalten, die aber an Intensität noch weit hinter dem Brenzcatechin zurückbleibt. Viel minder, aber noch deutlich war die Reaktivierung beim m-Kresol, die dann beim o-Kresol ganz ausblieb; in Übereinstimmung mit der Tatsache, daß die Oxydierbarkeit der drei Kresole durch das Ferment in derselben Reihenfolge abnimmt.

Außer dem Brenzcatechin enthält die Tabelle noch zwei Brenzcatechinderivate, die ebenso wie das unsubstituierte Catechin zwei freie OH-Gruppen in Orthostellung enthalten, also theoretisch ebenfalls zur Aktivierung geeignet sein müssen (Dopa und Adrenalin). Wie wir

sehen, ist dies aber nicht der Fall, so daß wir die Konklusion ziehen können, daß *außer den OH-Gruppen auch die Substituenten einen entscheidenden Einfluß auf das Reaktivierungsvermögen einer Verbindung ausüben*. Einen weiteren analogen Fall sehen wir auch im Phenol bzw. p-Kresol und Tyrosin (*Onslow*).

Wie wir sehen, ist dem o-Dioxybenzol gegenüber das p-Dioxybenzol ganz inaktiv, trotzdem auch diese Verbindung, ebenso wie das Brenzcatechin, durch das Ferment wahrscheinlich zum Diketochinon oxydiert wird. Um den Grund dieses negativen Resultats festzustellen, wurde das Verhalten des p-Chinons (das von *Kahlbaum* bezogen wurde) dem Guajak gegenüber untersucht. Es zeigte sich, daß dieses Chinon, im Gegensatz zum o-Chinon, in stärkerer Verdünnung das Guajak nicht zu bläuen vermag. Das Oxydationspotential dieses Chinons scheint hierzu nicht auszureichen. Auf Grund dieser wie weiter oben besprochenen Beobachtungen können wir also feststellen, daß eine Verbindung reaktivierend wirkt, wenn 1. sie von der Oxydase überhaupt angegriffen wird, 2. wenn ihr Oxyd bei dem betreffenden p_H eine genügend starke Oxydationskraft besitzt, um das Guajak zu oxydieren, 3. wenn der Überschuß der Verbindung bei dem betreffenden p_H mit dem primären Oxyd keine inaktiven Verbindungen eingeht, und 4. wenn natürlich zwischen Guajak und Oxyd keine besonderen Reaktionshemmungen bestehen. Unter diesen Gesichtspunkten läßt sich dann auch die aus der Tabelle hervorgehende interessante Beobachtung ohne weiteres erklären, daß die meisten Verbindungen, die selbst keine Aktivierung des Ferments gaben, die natürliche Bläuung des Guajaks durch das Ferment stark hemmten. Dementsprechend wurde auch gefunden, daß z. B. schon sehr geringe Mengen Pyrogallol die Oxydationskraft des o-Chinons (ebenso des synthetischen, wie des durch das Ferment dargestellten) dem Guajak gegenüber augenblicklich aufheben.

Anschließend an die obige Tabelle sei noch erwähnt, daß, außer beim o- und m-Kresol, bei allen Versuchen die starke Verfärbung der Flüssigkeiten die Oxydation des betreffenden Phenols durch das Ferment andeutete. Auffallend stark und rapid war die Verfärbung beim Dopa.

II. Das Oxydationssystem der Kartoffeln. Das Tyrin.

Verschiedene Beobachtungen leiteten auf die Vermutung, daß neben dem Brenzcatechin noch eine andere, wahrscheinlich aromatische Substanz im Oxydationssystem der Kartoffeln eine bedeutende Rolle spielen muß. Um diese Substanz näher zu untersuchen, wurde versucht, sie in soweit wie möglich reinem Zustande von den anderen Extraktstoffen abzuscheiden. Zu diesem Ende wurde der alkoholische Extrakt von Kartoffeln mit Barium gefällt, wobei eine große Menge schleimiger

Substanzen abgetrennt wurde. Dann wurde das natürliche Brenzcatechin, das bei der Guajakreaktion die so bedeutende Rolle spielt, als Bleiverbindung abgetrennt. Der Rest der gelöst gebliebenen Stoffe, die weder eine unlösliche Barium- noch Bleiverbindung gaben, wurde in eine acetonlösliche und einer acetonunlösliche aber methylalkohol-lösliche Fraktion zersetzt. Letztere acetonunlösliche, aber in Methylalkohol glatt lösliche Fraktion enthält den gesuchten Körper. Im einzelnen war der Vorgang beim Präparieren der folgende:

330 g fein zerschnittener neuer Kartoffeln werden in der eingangs beschriebenen Weise in 1000 ccm Alkohol gebracht. Der Alkohol wird mit 3 Tropfen Eisessigsäure angesäuert und dann unter stetem Rühren aufgeköcht. Dann wird der Becher in kaltes Wasser gestellt. Nach genügender Abkühlung wird an einer Büchnerkerze filtriert, der Rest tüchtig ausgepreßt. Nun wird die für die Neutralisation von 3 Tropfen Essigsäure nötige Menge Ammoniak zugesetzt. Dann wird unter stetem Rühren in kleinen Portionen eine gesättigte Bariumacetatlösung zugesetzt, bis kein weiterer Niederschlag entsteht. Überschuß wird vermieden. Der voluminöse flockige Niederschlag wird abzentrifugiert. Die klare Flüssigkeit wird nun mit Plumbum acetieum Bas. Sol. (der Pharmakopae) versetzt, bis kein Niederschlag mehr entsteht (kein Überschuß!). Die Reaktion der Flüssigkeit in diesem Stadium ist gegen Lackmus neutral oder schwach sauer. Das Präzipitat, das das natürliche Brenzcatechin der Kartoffeln enthält, wird scharf abzentrifugiert.

Fraktion 1 (unlösliche Bleiverbindungen). Die Flüssigkeit wird vom Präzipitat möglichst vollständig abgegossen und für die weitere Verarbeitung bewahrt. Das Präzipitat wird in etwa 300 ccm Wasser suspendiert, das mit Ameisensäure angesäuert wurde. Das Präzipitat wird möglichst vollständig suspendiert. Es wird nun noch weiter Ameisensäure zugesetzt, bis die Flüssigkeit Kongorot bleibend bläut. Nach starkem Rühren und Durcharbeiten der Suspension mit einem mit Gummi montierten Glasstabe wird an einer Büchnerkerze filtriert. Das Filtrat wird nun mit etwas basischem Bleiacetat versetzt und mit Ammoniak neutralisiert. Das entstehende Präzipitat wird an der Büchnerkerze abgetrennt, mit Wasser gewaschen, in etwa 100 ccm, mit 1 Tropfen Essigsäure angesäuertem Wasser suspendiert, mit Schwefelwasserstoff zersetzt, filtriert, das Filtrat im Vakuum unter Durchleitung von Luft aus einer sehr dünnen Kapillare bei niedriger Temperatur tüchtig ausgeköcht, bis der Schwefelwasserstoff ganz entfernt ist. Die derart gewonnene klare Flüssigkeit, die das natürliche Brenzcatechin der Kartoffeln enthält, gibt mit Ferrichlorid eine tiefgrüne Farbe, gibt mit Ferrosulfat, durch Natriumacetat schwach alkalisiert, die für Brenzcatechine charakteristische tiefviolette Farbe, die bei stärkerer Alkalität ins Bordeauxrot umschlägt. Die Flüssigkeit gibt eine positive *Millonsche* Reaktion. Die Flüssigkeit vermag das Ferment dem Guajak gegenüber stark zu aktivieren. In neutraler oder alkalischer Lösung verliert die Flüssigkeit bald diese Aktivität.

Fraktion 2 (acetonlöslich). Die klare alkoholische Flüssigkeit, die nach der ersten Präzipitierung mit Bleiacetat gewonnen wurde (s. weiter oben), wird tropfenweise mit Schwefelsäure versetzt, bis eine kleine entnommene Probe mit Schwefelsäure nunmehr nur ein geringes Präzipitat gibt. Das Präzipitat, das alles Barium und das meiste Blei enthält, wird absondert, die Flüssigkeit in vacuo bei ungefährender Zimmertemperatur bis

auf etwa 300 ccm abdestilliert. Der Rest (300 ccm) wird filtriert, dann mit Schwefelwasserstoff behandelt, filtriert, der Schwefelwasserstoff in obiger Weise entfernt, der Rest bei niedriger Temperatur in vacuo auf etwa 10 ccm eingeeengt.

Dann werden unter starkem Schütteln in kleinen Portionen etwa 100 ccm Aceton eingegossen, nochmals tüchtig durchgeschüttelt, dann etwa eine halbe Stunde stehengelassen. Hierbei scheidet sich eine dicke, ölige Flüssigkeit ab. Das stets noch trübe Aceton wird so vollständig wie möglich in ein Zentrifugenrohr abgegossen, abgedreht, das Aceton vom Zentrifugat abgegossen. Der Rest im Destillierkolben wird nochmals mit etwa 50 ccm Aceton tüchtig durchgeschüttelt, das Aceton in das erst gebrauchte Zentrifugenrohr gegossen, hier mit dem obigen Zentrifugat gut durchgeschüttelt und abgedreht. Das Aceton wird abgegossen. Die vereinigten acetonhaltigen Flüssigkeiten bilden die Fraktion 2.

Diese Fraktion 2, die nicht weiter unser Interesse beschäftigen wird, scheint neben Essigsäure und anderen Substanzen einen phenolartigen Körper in größerer Menge zu enthalten. Sie reduziert das zugegebene Ferrichlorid, gibt positive Millonsche Reaktion und zeigt, mit Lauge erwärmt, eine braune Farbe.

Fraktion 3 (acetonunlöslich). Das Zentrifugenrohr und der Destillierkolben enthalten nun eine dicke, halbfeste Substanz. Der Kolben wird nun mit etwa 20 ccm Methylalkohol ausgespült, in dem sich der Rest vollkommen löst. Der Methylalkohol wird in das Zentrifugenrohr gegossen, in dem sich die Substanz ebenfalls löst. Nun wird der Kolben nochmals mit Methylalkohol ausgespült, der Alkohol in das Zentrifugenrohr gegossen und hier die Flüssigkeit mit Methylalkohol noch auf etwa 100 ccm aufgefüllt. Der hierbei etwa entstehende Niederschlag wird abzentrifugiert und die klare methylalkoholische Lösung in vacuo bei niedriger Temperatur abdestilliert. Es bleibt hierbei eine dicke, ölige, klare und farblose Substanz zurück, die nun zum Zwecke der weiteren Versuche in 30 ccm Wasser gelöst wird.

Wird diese Lösung (also die acetonunlösliche, methylalkohol-lösliche Fraktion) nun mit Natriumacetat schwach alkalisiert und etwa $\frac{1}{4}$ Vol. gesättigte Chinonlösung zugegeben und in ein Wasserbad von 50° gesetzt, so erscheint sogleich eine tiefe, schöne, bordeauxrote Farbe, die an Intensität während der ersten 2 Minuten stets deutlich zunimmt. Ebenso schön erscheint die Farbe, wenn man die Flüssigkeit mit sekundärem Natriumphosphat alkalisiert und dann mit etwas p-Chinon stehen läßt. Die Flüssigkeit enthält also eine Substanz, die durch Chinon behandelt eine prachtvolle tiefe Farbe gibt, die dann aber beim längeren Stehen in eine schmutzig-braune übergeht, und die wir, wegen mancher Ähnlichkeit mit dem Tyrosin, im folgenden *Tyryn* nennen werden. Die tiefe Farbe deutet auf einen aromatischen Charakter, währenddessen die analoge Reaktion von Adrenalin und Tyrosin darauf hindeutet, daß der Farbwechsel auf einer Oxydation der betreffenden Substanz durch das Chinon beruht. Diese Annahme wird durch die Beobachtung gestützt, daß die Flüssigkeit, wenn man ihr ohne Chinonzusatz etwas Ferrichlorid und Kaliumferricyanid zusetzt, sich nicht blau färbt, als

Zeichen dessen, daß das Tyrin die zugesetzten Eisensalze nicht zu reduzieren vermag. Ebenso wenig reduziert das Chinon. Wird jedoch das Tyrin in obiger Weise mit Chinon behandelt und dann mit den Eisensalzen versetzt, so erhält man sogleich einen dicken Niederschlag von Berlinerblau, da das Chinon bei seiner oxydativen Funktion selbst in Hydrochinon übergeht, das die Eisensalze glatt reduziert.

Für diese Auffassung der Reaktion spricht auch der Umstand, daß die rote Farbe durch Natriumhydrosulfid in reversibler Weise augenblicklich zum Verschwinden gebracht, die Verbindung also in ihre Leukoform zurückgeführt werden kann.

Das Tyrin, das mit dem Chinon in seiner oxydierten Form die prachtvolle purpurne Reaktion gibt, läßt sich weder durch alkalische, noch saure Fällungsmittel niederschlagen (basisches Bleiacetat, Baryt, $\text{Cu}(\text{OH})_2$, Sublimat, Phosphorwolframsäure, Wolframsäure, Pikrinsäure), ist in Wasser und Methylalkohol extrem löslich, löst sich etwas minder gut in Äthylalkohol, reduziert, wie gesagt, kein Eisensalz und gibt eine negative *Millonsche* Reaktion, was zugleich ausschließt, daß wir es hier mit Tyrosin zu tun haben. Beim Eindampfen hinterläßt (auch mit HCl angesäuert) die Lösung eine farblose, harzartige Substanz. Meine Versuche, sie zu kristallisieren, sind bis jetzt fehlgeschlagen.

Zum Auftreten der Farbenreaktion ist neben dem Chinon eine Reihe anderer anorganischer Oxydationsmittel versucht worden (Wasserstoffperoxyd, Kaliumchlorat, Ferrichlorid, Kaliumferricyanid, Kalibichromat, Kaliumhypochlorit), es wurde aber mit keinem ein positives Resultat erhalten. Nach meiner Erfahrung spricht dies auch einigermaßen für einen aromatischen Charakter. Tyrosin zeigt in dieser Beziehung mit unserer Substanz eine Ähnlichkeit.

Das Tyrin scheint in der Pflanzen- und Tierwelt weitgehend verbreitet zu sein. Eine Substanz mit den gleichen Eigenschaften kann auch aus den Säugetiergeweben in relativ großer Menge präpariert werden. Sie wurde in prinzipiell analoger Weise bis jetzt aus Pferdefleisch, Rinder- und Schweineherz und Schweineleber präpariert. Das aus Rinderherz gewonnene Präparat zeigte im Kataphoreseversuch bis $p_{\text{H}} 4$ eine anodische, über $p_{\text{H}} 3$ eine kathodische Wanderung¹⁾.

¹⁾ Nachdem Hefe eine stark positive Chinonreaktion gab, ebenso auch das Eigelb, nicht aber das Eiweiß, weiterhin geschälter Reis eine nur kaum positiv zu nennende Reaktion gab, währenddessen das Mehl der Reisschalen stark positiv reagierte, und auch andere Gründe vorlagen, das Tyrin mit dem Vitamin B zu identifizieren, wurden Taubenversuche vorgenommen. Die Versuche zeigten aber, daß die Gewebe (auch das Gehirngewebe) der avitaminotischen Tauben im prämortalen Stadium die Reaktion in normaler Intensität gaben, so daß die Vermutung der Identität beider Substanzen unwahrscheinlich wurde.

Wird das Tyrin nun mit der Oxydase zusammengebracht, so zeigt sich keinerlei Veränderung. Die Lösungen bleiben ungefärbt als Zeichen dessen, daß das Tyrin durch die Oxydase nicht angegriffen wird.

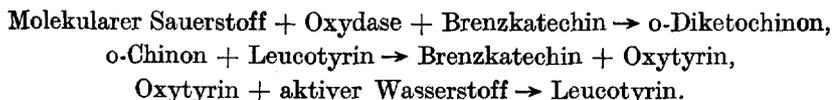
Versuch. Eine Reihe von Bechergläschen wird mit je 1 ccm der folgenden Phosphatlösungen versetzt: Na_2HPO_4 , Mischungen von KH_2PO_4 und Na_2HPO_4 von p_{H} 7,4, 7,0, 6,4, und endlich reines KH_2PO_4 . Dann wird einem jeden Bechergläschen 1 ccm Wasser und 2 Tropfen der mit starker NaOH neutralisierten Lösung des Tyrins (Fraktion 3) zugesetzt. Nach der Zugabe von je einem Spatel Ferment wird 10, dann weitere 20 Minuten lang bebrütet. Alle Proben bleiben während dieser Zeit vollkommen farblos. Das Ferment ist also nicht imstande, das Tyrin aus seiner Leucoform zur roten Pigmentform zu oxydieren.

Nun wird derselbe Versuch wiederholt, aber an Stelle des Wassers 1 ccm der neutralisierten Brenzcatechinelösung (Fraktion 1) zugesetzt. In einer dritten Reihe wird zum Vergleich dieselbe Brenzcatechinelösung zugesetzt, aber das Tyrin (Fraktion 3) weggelassen. In dieser letzten Reihe zeigt sich als Zeichen der Oxydation des Brenzcatechins nach 10 Minuten eine schwache, gelb bis braungelbe Farbe, die in den weiteren 20 Minuten noch etwas deutlicher wird. Hingegen zeigen die Becher mit der zugleich zugesetzten Fraktion 3 (Tyrim) eine sehr deutliche rote bis rotbraune Farbe. Ebenso wie bei der Guajakreaktion, so bleibt auch hier die Färbung in reinem sekundären Phosphat aus. Am stärksten und reinsten ist die Farbe beim natürlichen p_{H} 6,4 der Kartoffeln. In reinem primären Phosphat ist sie bedeutend schwächer. Beim weiteren längeren Stehen geht die rote Farbe auch hier ins Dunkelbraune über.

Das Tyrim verhält sich also in unserem Versuch ganz analog der Guajakreaktion. Es wird offenbar nicht direkt durch das Oxydationsferment angegriffen, wird aber durch das aus dem Catechin unter Einwirkung des Ferments entstandene Chinon aus seiner Leucoform zum Pigment oxydiert. Die drei Substanzen bilden also ein einheitliches System, in dem also letzten Endes unter katalytischer Mitwirkung des Ferments und des Catechins das Tyrim durch den Sauerstoff oxydiert wird.

Wird dieses rote oxydierte Pigment unter anaeroben Bedingungen mit Kartoffelgewebe in Kontakt gebracht, so kann man bald wieder ihre Entfärbung beobachten, die augenscheinlich ihre Reduktion zur Ausgangssubstanz andeutet.

Das Tyrim scheint also als Glied einer Kette von Reaktionen die Oxydation des aktivierten Wasserstoffs zu vermitteln. Offenbar haben wir es hier mit einem Gliede der von *W. Palladin* aufgestellten Gruppe der Respirationspigmente zu tun. Im folgenden werden wir der Kürze halber die reduzierte Leucoform des Tyrins als Leucotyrim, die oxydierte Pigmentform als Oxytyrim bezeichnen. Der Gang der Oxydationen in der Kartoffel scheint also der folgende zu sein:



Hiermit sei natürlich nicht weggenommen, daß bereits zwischen aktivem Wasserstoff und Chinon direkte Beziehungen bestehen können und dieser durch den aktiven Wasserstoff reduziert werden kann, noch bevor es zur Oxydation des Tyrins käme. Es scheint mir sogar recht wahrscheinlich, daß das Zusammentreffen des Chinons mit dem Glutathion zur Reduktion des ersteren und Oxydation des letzteren führen muß¹⁾. Möglicherweise ist dies auch die gesuchte Verbindung des Glutathions und des zugehörigen Reduktionssystems von *Hopkins* und *Dixon* mit dem molekularen Sauerstoff. Natürlich läßt sich über die funktionellen Verhältnisse des beschriebenen Oxydase-Brenzcatechin-Tyrinsystems noch nicht mehr mit Sicherheit sagen, als daß sie einer eingehenden experimentellen Erforschung bedürfen.

Zusammenfassung.

1. Es wird gezeigt, daß in den Kartoffeln der Mechanismus der Guajakreaktion der folgende ist: Durch die Oxydase wird ein Brenzcatechin zum o-Diketochinon oxydiert. Dieses Chinon oxydiert ohne Mitwirken weiterer Fermente unmittelbar das Guajakreagens. Peroxyde oder Peroxydasen sind nicht an der Reaktion beteiligt. Die Versuche von *J. Wolff* und *M. W. Onslow* werden bestätigt.

2. Es wird gezeigt, daß in den Kartoffeln außer dem Brenzcatechin am System der Oxydation noch ein anderer, wahrscheinlich ebenfalls aromatischer Körper beteiligt ist, der der *W. Palladinschen* Gruppe der Respirationspigmente zugehört, der, so wie das Guajak, nicht unmittelbar vom Oxydationsferment, sondern erst durch das, unter Einwirkung der Oxydase vom Brenzkatechin entstandene Chinon von seiner Leucoform zum Pigment oxydiert wird. Die Substanz, die auch im Warmblütergewebe in relativ großer Menge nachgewiesen wurde, wurde mit dem Namen Tyrin belegt. Es werden einige chemische Eigenschaften dieses Körpers erörtert.

¹⁾ So z. B. fand ich vor einigen Jahren, daß die Thioglykolsäure bzw. ihre Sulfhydrylgruppe durch die Meerrettigwurzeloxydase nicht angegriffen wird. Hingegen kann das Enzym durch die Zugabe von Adrenalin der SH-Gruppe gegenüber aktiviert werden. Aller Wahrscheinlichkeit nach wird nun das Adrenalin zum Chinon oxydiert, das wieder die Thioglykolsäure zum Disulfid oxydiert, wobei das Chinon wieder zum Adrenalin reduziert wird, das somit als Katalysator der Reaktion zwischen Sauerstoff bzw. Oxydase und SH-Gruppe fungiert.