

## 111. B. Rathke: Ueber den Rettig-Geruch erhitzten Selens.

(Eingegangen am 9. Februar 1903.)

Der bekannte Geruch, welcher auftritt, wenn Selen vor dem Löthrohr erhitzt wird, und der zur Erkennung desselben dient, wurde von Berzelius einer niederen Oxydationsstufe des Elements zugeschrieben; dieser hat man dann wiederholt und bis auf die neueste Zeit nachgespürt, aber immer vergebens. Ich bin nun ziemlich gewiss, dass jener Geruch durch spurenweises Auftreten von Selenkohlenstoff verursacht wird, welcher aus dem Bereich der Erhitzung so schnell entführt wird, dass er der Zersetzung wie der Verbrennung entgeht. Denn zunächst ist wohl zu beachten, dass er nur dann auftritt, wenn ein Stück Kohle, und nicht etwa wenn Porzellan als Unterlage dient, während doch auch in letzterem Falle das hypothetische Oxyd in der inneren Löthrohrflamme sollte entstehen können. Sodann aber, als mir vor Jahren die Darstellung des Selenkohlenstoffs<sup>1)</sup> aus Chlorkohlenstoff und Selenwasserstoff gelang, fiel mir sogleich auf, dass der überaus intensive Geruch desselben in äusserster Verdünnung jenem altbekannten Rettiggeruch sehr nahe kam. Als damals ein auswärtiger Colleague (es war Lothar Meyer), der keine Ahnung davon hatte, womit ich mich gerade beschäftigte, den Arbeitsaal betrat, rief er aus: »Welch' ein starker Selengeruch!« — Ich habe in meiner damaligen Mittheilung dieses Zusammenhangs keiner Erwähnung gethan, weil ich hoffte, die directe Darstellung durch Uebertreiben von Selendampf über erhitzte Kohle würde mir nach Auffindung der günstigsten Bedingungen doch noch gelingen. Ich bin dann aber nicht mehr darauf zurückgekommen und möchte nun meine Beobachtung nicht verloren gehen lassen.

Marburg, 6. Februar 1903.

## 112. A. Bach und R. Chodat: Untersuchungen über die Rolle der Peroxyde in der Chemie der lebenden Zelle.

## IV. Ueber Peroxydase.

(Eingegangen am 3. Februar 1903; mitgeth. in der Sitzung v. Hrn. P. Jacobson.)

Nachdem wir<sup>2)</sup> die Peroxydbildung in der lebenden Zelle festgestellt hatten, suchten wir das peroxydactivirende Ferment, die Peroxydase, näher kennen zu lernen.

Das Vorkommen im thierischen und pflanzlichen Organismus von fermentartigen Körpern, welche Hydroperoxyd und bei der Luftoxy-

<sup>1)</sup> Ann. d. Chem. 152, 199.    <sup>2)</sup> Diese Berichte 35, 2466, 3943 [1902].

dation von organischen Materien entstehende Peroxyde in ähnlicher Weise, wie dies Ferrosalze thun, activiren, wurde von Schönbein<sup>1)</sup> bereits im Jahre 1856 festgestellt. Die Peroxydactivirung durch die Vermittelung von Blutkörperchen, Weizenkleber u. s. w. wurde von ihm bei verschiedenen Reactionen — Bläuung der Guajactinctur, Jodausscheidung aus Jodkalium, Entfärbung von Indigolösungen — beobachtet<sup>2)</sup>.

Nach Schönbein's Ansicht war die Activirung des Hydroperoxyds und die katalytische Zersetzung desselben unter Sauerstoffentwicklung einem und demselben Princip zuzuschreiben, da nach seinen Erfahrungen beide Erscheinungen Hand in Hand gingen. Schon damals aber fand er, dass diese Regel nicht ausnahmslos war. Er sagt<sup>3)</sup>: »Merkwürdiger Weise macht jedoch die Hefe eine der wenigen Ausnahmen von der Regel, gemäss welcher Substanzen, die nach Art des Platins HO<sub>2</sub> zerlegen, auch die HO<sub>2</sub>-haltige Guajactinctur bläuen.«

Die Schönbein'sche Ansicht bewährte sich bis in den letzten Jahren in der physiologischen Chemie. Spitzer<sup>4)</sup>, welcher das Oxydationsvermögen thierischer Gewebe durch die von Letzteren hervorgerufene katalytische Zersetzung des Hydroperoxyds zu messen suchte, kam zu dem Schlusse, dass die Fähigkeit, Hydroperoxyd zu katalysiren, demselben Ferment, welches die Blaufärbung der Guajactinctur in Gegenwart von Hydroperoxyd bedingt, zugeschrieben werden muss. Lepinois<sup>5)</sup> fand aber, dass die Intensität der durch verschiedene Objecte erzeugten Blaufärbung der Sauerstoffentwicklung aus Hydroperoxyd nicht proportional war. Dann wurde schliesslich von Löw<sup>6)</sup> der endgültige Beweis geführt, dass die Fähigkeit, Hydroperoxyd katalytisch zu zersetzen, einem besonderen Ferment — der Katalase — zukommt.

<sup>1)</sup> Ueber chemische Berührungswirkungen. Verhandl. Naturforsch. Ges. Basel, 4, 467; Abhandl. Münchn. Akad. 8, 38 [1856]; Ueber die Gleichheit des Einflusses, welchen Blutkörperchen und Eisenoxydulsalze auf die chemische Thätigkeit des gebundenen Sauerstoffes ausüben. Verh. Nat. Ges. Basel 2, 9; Abhandl. Münchn. Akad. 8, 406.

<sup>2)</sup> In unserer III. Mittheilung (diese Berichte 35, 3945 [1902]) haben wir irrthümlich angegeben, dass die Hydroperoxydactivirung durch Peroxydase bei der Jodkaliumstärke-Reaction bisher unbeachtet geblieben sei. Schönbein (l. c.) ist diese Erscheinung jedenfalls nicht entgangen.

<sup>3)</sup> Katalytische Wirksamkeit organischer Materien etc. Münchn. Akad. 2, 100 [1863].

<sup>4)</sup> Pflüger's Archiv 67, 615 [1897].

<sup>5)</sup> Compt. rend. Soc. biolog. 29 mar. 1899.

<sup>6)</sup> On Catalase: U. S. Dept. of Agricult., Rep. Nr. 68 [1901].

Damit ist aber auch die Individualität des peroxydactivirenden Fermentes festgestellt. Der Name Peroxydase wurde demselben von Linossier <sup>1)</sup> beigelegt, welcher eine oxydasefreie Peroxydase aus Eiter durch Fällung mit Alkohol erhielt. Pflanzliche Peroxydasen wurden bisher in der Weise dargestellt, dass Gemenge von Oxydasen und Peroxydasen auf die für Erstere tödliche Temperatur (etwa 70°) erhitzt wurden. Bei dieser Temperatur werden die Peroxydasen mehr oder weniger abgeschwächt, aber nicht zerstört. Als eventuelle Methode für die Trennung der Oxydasen von Peroxydasen empfiehlt Aso <sup>2)</sup> fractionirte Fällung mit Alkohol, in welchem Letztere ziemlich löslich sind, oder Vergiften der Oxydasen mit Natriumfluorid oder Natriumsilicofluorid, gegen welches die Peroxydasen sich als wenig empfindlich zeigen.

Da es zahlreiche Pflanzen giebt, bei denen die Oxydasereaction völlig ausbleibt und die dagegen eine starke Peroxydasereaction zeigen, so suchten wir nach Pflanzenmaterialien, welche sich zu directer Darstellung von Peroxydase eigneten. Als solche erwiesen sich Kürbisfrüchte und Meerrettigwurzeln.

Wir stellten zuerst Peroxydase aus Kürbisfrüchten dar, indem wir den aus dem fein zerkleinerten Material ausgepressten Saft mit absolutem Alkohol versetzten und den entstandenen Niederschlag durch Auflösen in Wasser und Fällen mit Alkohol reinigten. Da aber der Kürbissaft stark wasserhaltig ist, so sind ungeheure Mengen Alkohol erforderlich, um die Peroxydase auszufällen; dazu sind die Ausbeuten ausserordentlich gering. Mit besserem Erfolg lässt sich Peroxydase aus Meerrettigwurzeln in folgender Weise gewinnen:

2 kg Rettigwurzeln werden fein zerkleinert, einige Stunden sich selbst überlassen, um die enzymatische Glucosidspaltung zu vervollständigen, und dann eine längere Zeit — 4 oder 5 Tage — mit 80-proc. Alkohol digerirt, welcher die ätherischen Oele aufnimmt. Die rothe alkoholische Flüssigkeit wird abgossen, der Rückstand wiederholt mit 80-proc. Alkohol gewaschen, abgepresst und schliesslich einer methodischen Extraction mit 40-proc. Alkohol unterworfen. Die alkoholische Auszüge (ca. 8 L.), welche sehr starke Peroxydasereactionen zeigen, werden im Vacuum bei 30° eingengt, filtrirt und mit absolutem Alkohol versetzt, solange noch eine Trübung entsteht. Der weisse Niederschlag wird in sehr wenig Wasser gelöst, mit absolutem Alkohol wiederum ausgefällt und im Vacuum von Alkohol befreit.

In obiger Weise wird eine gelblich-weisse, gummiartige Masse erhalten, welche in Wasser ausserordentlich löslich, in 40-proc. Alkohol leicht löslich ist. Die wässrige Lösung reducirt stark Fehling'sche Lösung. Dialysirt man die wässrige Lösung durch Pergament gegen reines Wasser, so erhält man ein peroxydasehaltiges Dialysat, welches Fehling'sche Lösung viel energischer reducirt als das ursprüngliche

<sup>1)</sup> Compt. rend. Soc. biol. 5, 373 [1898].

<sup>2)</sup> Bull. Coll. Agric. Tokio 5, 2, 229.

**Product.** Der reducirende Körper ist aber nicht der Träger der Peroxydaseeigenschaften, da durch wiederholtes Auflösen in Wasser und Ausfällen mit absolutem Alkohol, Peroxydasepräparate erhalten werden können, welche Fehling'sche Lösung nicht mehr reduciren.

Die reinsten Peroxydasepräparate aus Meerrettigwurzeln enthalten durchschnittlich 6 pCt. Asche. Mehrere Analysen ergaben, dass dieselbe eisenfrei, dagegen aluminium- und manganhaltig ist. Der Gehalt an Aluminium beträgt 0.8—1.4 pCt., derjenige an Mangan 0.2—0.6 pCt. Ob zwischen dem Mangangehalt und den Peroxydaseeigenschaften des Productes ein causaler Zusammenhang besteht, konnte mit Sicherheit nicht nachgewiesen werden.

Beim Erwärmen von Peroxydaselösungen mit Natronlauge entweicht zuerst Ammoniak und dann eine nach Pyridin riechende Base. Die Peroxydase scheint aber keine eiweissartige Verbindung zu sein, da weder das Rohproduct, noch die reineren Präparate die bekannten Eiweissreactionen zeigen.

Durch Erhitzen der Peroxydaselösungen zum Sieden werden die specifischen Eigenschaften des Enzyms aufgehoben. Wie es aber schon Woods <sup>1)</sup> bei der Tabakperoxydase beobachtete, wird die Peroxydase nach einigen Stunden regenerirt. Ein zweites Erhitzen zerstört die Peroxydase völlig. Woods ist der Ansicht, dass es für Oxydase und Peroxydase Zymogene giebt, welche gegen Hitze und andere Agentien viel beständiger sind als die activen Fermente. Eine ähnliche Ansicht ist auch von Aso <sup>2)</sup> vertreten worden. In alkoholischer Lösung wird die Peroxydase bei der Siedetemperatur des Alkohols zerstört.

Bemerkenswerth ist das Verhalten der Peroxydase gegen Hydroperoxyd. Während sie kleine Mengen Hydroperoxyds stark activirt, wird sie durch grössere Mengen desselben vernichtet, ein Verhalten, welches bereits von Schönbein <sup>3)</sup> beobachtet worden ist. Dasselbe gilt auch für die Peroxyde, welche bei der langsamen Oxydation organischer Verbindungen entstehen.

Was die specifische Wirkung der Peroxydase betrifft, so fanden wir, dass Letztere Hydroperoxyd bei zahlreichen Oxydationsreactionen, wie die Oxydation des Pyrogallols, der Gallussäure, des Anilins, des Dimethylanilins, des *p*-Toluidins u. s. w., sehr stark activirt. Die qualitativen Versuche wurden folgendermaassen ausgeführt:

Vier Standcylinder wurden mit gleichen Mengen des betreffenden Reagens (angesäuerter Jodkaliumstärkeleiste, Pyrogallollösung u. s. w.) beschickt. Der erste Cylinder erhielt keinen Zusatz, in den zweiten

<sup>1)</sup> U. S. Dept. of Agric. Rep. Nr. 8, 17.

<sup>2)</sup> Bull. Coll. Agric. Tokio 5, 2, 231.

<sup>3)</sup> Verhand. Nat. Ges. Basel, 1, 474.

wurde eine abgemessene Menge Peroxydase-Lösung, in den dritten eine abgemessene Menge Hydroperoxyd-Lösung, in den vierten ebenso grosse Mengen Peroxydase- und Hydroperoxyd-Lösung gegeben. In den meisten Fällen wurde in dem letzten Cylinder, welcher gleichzeitig das Reagens, Hydroperoxyd und Peroxydase, enthielt, schon nach wenigen Secunden eine mehr oder weniger starke Oxydation beobachtet, während in den übrigen die Reaction je nach den Umständen sehr langsam oder garnicht eintrat. In einigen Fällen wurden noch Controllversuche mit gekochter Peroxydase-Lösung ausgeführt.

Peroxydase activirt nicht nur Hydroperoxyd, sondern auch sämtliche bei der Luftoxydation von organischen Körpern (Aether, Alkohol, ätherische Oele etc.) entstehende Peroxyde. Diese Thatsache ist bereits von Schönbein<sup>1)</sup> festgestellt worden. Unsere Versuche und die von Linossier<sup>2)</sup> gemachten Erfahrungen bestätigten nur Schönbein's Angaben. Höchst bemerkenswerth erscheint uns die von Schönbein<sup>3)</sup> geäußerte Ansicht, dass es sich hier um eine Activirung von organischen Peroxyden und nicht von etwa secundär entstandenem Hydroperoxyd handelt.

Als organische Peroxyde bezeichnet er die hier in Betracht kommenden Verbindungen allerdings nicht. Für ihn sind sie »Antozonide«, welche in der Weise entstehen, dass die organische Materie das inerte Sauerstoffmolekül in »Ozon« (⊖) und »Antozon« (⊕) spaltet. Das energischere »Ozon« wird zu einer »wirklichen Oxydation« der Materie verbraucht, während das trägere »Antozon« an Letzterer in »beweglich thätigem« Zustande gebunden bleibt und durch verschiedene Sauerstofferreger — anorganische und organische — activirt werden kann. Sieht man von der Polarisation des Sauerstoffs ab, so hat man in dieser Auffassung nichts Anderes, als die neuere Peroxydtheorie der langsamen Oxydation.

Als eine Activirung von organischen Peroxyden ist weiter die von uns<sup>4)</sup> festgestellte Thatsache anzusehen, dass das Oxydationsvermögen der Oxydasen durch Peroxydasen verschiedener Herkunft erhöht wird. Ohne auf die zahlreichen qualitativen Versuche näher einzugehen, wollen wir hier nur eine quantitative Versuchsreihe anführen.

Bei diesen Versuchen wurden die Sauerstoffabsorption und die Kohlensäureentwicklung bestimmt, welche bei der Oxydation des Pyrogallols in Gegenwart von Oxydase allein, von Peroxydase allein und dann in Gegenwart von beiden stattfanden. Als Behälter benutzten wir eine mit Glashähnen versehene zugeschmolzene Gaswaschflasche von bekanntem Inhalt.

1) l. c.    2) Compt. rend. Soc. biol. 5, 373 [1898].

3) Ueber das Verhalten der flüssigen Kohlenwasserstoffe und Fette zum sauerstofffreien Sauerstoff. Verhandl. naturf. Gesellsch. Basel 4, 3, 478 [1866].

4) Diese Berichte 35, 3943 [1902].

Nach Füllen mit kohlensäurefreier Luft wurde der Behälter durch das bis an den Boden reichende Zuleitungsrohr mit den Reagentien beschickt und mit einem Messapparat verbunden, welcher ebenfalls kohlensäurefreie Luft enthielt. Der Apparat bestand aus einem graduirtem Messrohr und einem Niveaurohr und war mit Quecksilber beschickt. Nach 24 Stunden wurde das absorbirte Sauerstoffvolumen unter Berücksichtigung der Temperatur und des Barometerstandes am Beginn und am Schluss des Versuches abgelesen, das sämmtliche Gas durch Heben des Niveaurohrs in den Behälter übergeführt und die vorhandene Kohlensäure gravimetrisch bestimmt. In dieser Weise wurden folgende Resultate erhalten:

	Absorbirter Sauerstoff	Entwickelte Kohlensäure
1 g Pyrogallol, 15 ccm Oxydaselösung, 35 ccm Wasser . . . . .	14.1 ccm	5.4 ccm
1 g Pyrogallol, 15 ccm Peroxydaselösung, 35 ccm Wasser . . . . .	0.6 »	0.2 »
1 g Pyrogallol, 15 ccm Oxydaselösung, 15 ccm Peroxydaselösung, 20 ccm Wasser . . . .	19.1 »	7.7 »

In nachstehender Mittheilung sind über die Activirung von Oxygenasen (von Peroxydase grösstentheils befreiten Oxydasen) Versuche angeführt, welche den activirenden Einfluss verschiedener Peroxydasen mit voller Klarheit zeigen.

Sämmtliche qualitative und quantitative Versuche ergaben, dass die Peroxydase in Abwesenheit von Peroxyden nicht die mindeste oxydirende Eigenschaft besitzt, was schon von Linossier<sup>2)</sup> bei der Eiterperoxydase beobachtet worden ist. Die entgegengesetzte Angabe von Löw<sup>1)</sup> beruht anscheinend darauf, dass er für seine Versuche ein peroxydhaltiges Pyrogallol anwendete. In ähnlicher Weise erklärt sich die Thatsache, dass frisch bereitete Guajactinctur von Peroxydase allein nicht gefärbt wird, während schon einige Stunden alte Guajactinctur mit Peroxydase eine mehr oder weniger intensive Blaufärbung giebt. Die rasche Bildung einer durch das Jodkaliumstärke-Reagens nachweisbaren peroxydartigen Verbindung in Guajactinctur ist bereits von Schönbein<sup>2)</sup> nachgewiesen worden.

Wie aus nachstehender Mittheilung ersichtlich wird, scheinen in Pflanzen mindestens zwei Peroxydasen vorzukommen. Zu einem ähnlichen Schluss gelangt auch Aso<sup>3)</sup>, welcher das Verhalten der Peroxydase gegen verschiedene Färbereagentien näher untersuchte.

Genf, Pflanzenchemisches Laboratorium des Botanischen Institutes.

1) Compt. rend. Soc. biol. 5, 373 [1898].

2) Diese Berichte 35, 2487 [1902]. 3) Poggend. Annalen 75, 352 [1848].

4) Bullet. Coll. Agricult. Tokyo 5, 2, 218 [1902].