

auch wirklich hat. Hierdurch wird aber die Gültigkeit des Gesagten nicht beeinflusst.

Endlich ist klar, daß der Vorwurf, den mir Hr. Willstätter macht¹⁾, »ich hätte meine eigene Anregung (nämlich meinen weiter vorn zitierten Hinweis auf die Möglichkeit des Vorliegens von Chinhydron-Salzen) bei meiner gemeinsam mit Prager ausgeführten Untersuchung der Oxydationsprodukte der Diaminophenole unbeachtet gelassen«, irrtümlich ist.

Chinhydronartige Substanzen entstehen, wie ich oft gefunden habe, besonders leicht nur durch Oxydation solcher hydrochinoider Körper, welche entweder keine auxochromen Gruppen enthalten, oder in welchen letztere durch Acetylierung usw. indifferent geworden sind. Amido- und Oxy-Hydrochinone, bezw. Chinonimine werden dagegen leicht schon durch einen geringen Überschuß des Oxydationsmittels völlig chinoid. Es lag also kein Grund vor, daran zu zweifeln, daß sich Diaminophenol (1.2.4) bei der Oxydation mit FeCl_3 anders verhalten würde, wie es seit der Arbeit von Martius und Grieb²⁾ für das analoge Diamino- α -naphthol (1.2.4) und viele analoge Körper längst bekannt ist. Auch die blutrote Farbe der Amino-chinonimin-Salze ist völlig zu erwarten gewesen; sie stimmt ungefähr mit derjenigen des Aposafranins überein, während die Nuance der analogen Amino-naphthochinonimin-Salze sich der Nuance der Rosindulin-Salze nähert. Die Kenntnis dieser Verhältnisse hat mich davon abgehalten, mit Willstätter und Piccard die Möglichkeit ins Auge zu fassen, daß die von mir und Prager studierten Oxydationsprodukte der Diaminophenole Chinhydron-Salze sein könnten, was sie ja auch in der Tat nicht sind.

Mülhausen i. Els., Chemie-Schule. 31. Mai 1908.

397. A. Bach und J. Tscherniack: Zur Reinigung der Peroxydase.

(Eingegangen am 20. Juni 1908.)

Die nach dem Bach-Chodatschen³⁾ Verfahren darstellbaren, physiologisch reinen Peroxydasepräparate enthalten stets große Mengen zucker- und gummiartiger Stoffe und aktivieren nur verhältnismäßig geringe Mengen Hydroperoxyds. Die Bestimmung des Aktivierungs-

¹⁾ Diese Berichte **41**, 1461 [1908].

²⁾ Ann. d. Chem. **134**, 377 [0000].

³⁾ A. Bach und R. Chodat, diese Berichte **36**, 602 [1903].

vermögens verschiedener Präparate nach der von Bach¹⁾ ausgearbeiteten Methode ergibt, daß 1 Gewichtsteil Peroxydase 0.5—1.5 Gewichtsteile Hydroperoxyds bei der Oxydation des Pyrogallols aktiviert. Alle Bemühungen, durch wiederholtes Lösen in Wasser und Fällen mit Alkohol die Präparate von den Verunreinigungen zu befreien und dadurch ihr Aktivierungsvermögen zu erhöhen, führten bisher zu wenig befriedigenden Resultaten. So erhielt Stöcklin²⁾ durch fraktioniertes Fällen einer großen Menge Rohperoxydase mit Alkohol ein Präparat, welches nur 2 Gewichtsteile Hydroperoxyds aktivierte. Bach³⁾ erwähnt ein Präparat, welches das »ungemein hohe Aktivierungsvermögen 2.1« besaß. Wie es bereits von Stöcklin⁴⁾ hervorgehoben wurde, liegt die Ursache dieses Mißerfolges darin, daß bei der Reinigung der Rohperoxydase nach dem üblichen Verfahren bald ein Punkt erreicht wird, bei welchem Enzym und Verunreinigungen zusammen in unveränderten Verhältnissen gefällt werden.

Da also auf eine weitgehende Reinigung der Peroxydase durch Fällen mit Alkohol keine Aussicht vorliegt, so versuchten wir, der Lösung dieses Problems auf einem anderen Wege näher zu treten. Zahlreiche, in verschiedenen Richtungen angestellte Vorversuche ergaben, daß Peroxydaselösungen am besten durch Ausfällen der Verunreinigungen mit basischem Bleiacetat, Entfernen des Bleies mittels Natriumcarbonats und nachträgliche Dialyse sich reinigen lassen.

Zur zweckmäßigen Ausführung dieses Verfahrens war eine verhältnismäßig große Menge Rohperoxydase erforderlich, und wir suchten daher nach einem peroxydasehaltigen Material, dessen Verarbeitung sich weniger lästig, als die des bisher angewandten Meerrettigs, gestaltet. Als solches hat sich die leicht zugängliche weiße Rübe erwiesen. Durch Abpressen des fein zerkleinerten Materials wird ein Saft erhalten, dessen Aktivierungsvermögen dasjenige der besten Peroxydaseextrakte aus Meerrettig übertrifft. Durch Fällen des filtrierten Saftes mit Alkohol wird eine Rohperoxydase erhalten, aus welcher ca. 37% der Verunreinigungen durch wiederholtes Lösen in Wasser und Fällen mit Alkohol entfernt werden können. Eisen und Mangan werden dabei vollständig, Calcium, Magnesium und reduzierende Zucker nur teilweise beseitigt.

Die Ausführung des Hauptversuches geschah in folgender Weise:

30 kg weiße Rübe wurden in der Hackmaschine zerkleinert, der Brei wurde abgepreßt, und der erhaltene Saft — 20 l — wurde zum Koagulieren der schleimigen Stoffe mit 2 l 96-prozentigem Alkohol versetzt. Nach Fil-

¹⁾ A. Bach, diese Berichte **37**, 3787 [1904].

²⁾ E. de Stöcklin, Contribution à l'étude de la peroxydase. Genève 1907, S. 37. ³⁾ Diese Berichte **41**, 226 [1908]. ⁴⁾ l. c. S. 22.

trieren wurde der alkoholhaltige Saft mit 130 l starkem Alkohol gefällt¹⁾, der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, mit Alkohol nachgewaschen und im Vakuum vom Fällungsmittel befreit. Die erhaltene Rohperoxydase (52 g) wurde mit 600 ccm Wasser verrieben, wobei nur ein geringer Teil der Substanz in Lösung ging. Das Ungelöste wurde abfiltriert, mit wenig Wasser nachgewaschen, und von dem Filtrat wurden 600 ccm, welche nur ca. 7 g Trockensubstanz enthielten, mit 40 g gepulvertem, basischem Bleiacetat (Kahlbaum) versetzt. Nach 24 Stunden wurde der entstandene Niederschlag abfiltriert, mit wenig Wasser nachgewaschen, und das Filtrat — 600 ccm — wurde mit gepulvertem Natriumcarbonat bis zum Ausbleiben jeder Trübung behandelt. Verbrauch: 21 g trocknes Natriumcarbonat. Nach Entfernen des Niederschlags durch Filtrieren wurde das alkalisch reagierende Filtrat — 600 ccm — gegen destilliertes Wasser dialysiert. Vorversuche ergaben, daß zur Dialyse hier weder Pergamentpapier, noch Schleichersche Dialysierschläuche brauchbar sind, da Peroxydase durch derartige Membranen ziemlich schnell dialysiert. Bessere Resultate werden mit echtem Pergament erhalten, obgleich auch dieses beträchtliche Mengen Peroxydase durchläßt. Der Dialysator wurde in der Weise dargestellt, daß ein größeres Stück Pergament an dem breiten Hals einer Flasche mit abgesprengtem Boden gebunden wurde, und der so erhaltene Pergamentsack bis zur Hälfte mit Peroxydaselösung gefüllt und bis zum Drittel in destilliertes Wasser eingetaucht wurde.

Am Beginn der Dialyse ergaben 2 ccm Peroxydaselösung, mit 1 g Pyrogallol in 70 ccm Wasser und 30 ccm 1-prozentiger Hydroperoxydlösung zusammengebracht, 0.310 g Purpurogallin. Nach 6 Tage langer Dialyse, wobei das destillierte Wasser im Gefäß 5—6-mal täglich gewechselt wurde, betrug das Volum der Flüssigkeit im Dialysator 735 ccm. 2.6 ccm dieser Flüssigkeit (2 ccm der ursprünglichen Peroxydaselösung entsprechend) ergaben mit 1 g Pyrogallol und 30 ccm Hydroperoxydlösung 0.159 g Purpurogallin. 20 ccm Peroxydaselösung wurden in einer tarierten Platinschale zur Trockne eingedampft, der Rückstand wurde bei 115° bis Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen. Sein Gewicht betrug 0.041 g. Der trockne Rückstand wurde in derselben Schale vorsichtig verascht. Erhalten: 0.0015 g = 3.6% Asche. Bei der Dialyse ist also ca. die Hälfte des Aktivierungsvermögens der Peroxydase verloren gegangen, ihr Gehalt an Trockensubstanz ist aber von 7 g auf 1.23 g hinabgestiegen. Von der dialysierten Peroxydaselösung wurden 700 ccm noch 6 Tage in der oben angegebenen Weise weiter dialysiert. Am 13. Tage wurde die Dialyse unterbrochen, da zu befürchten war, daß die im Dialysat bleibende Substanz für eine Untersuchung nicht hinreichen würde. Die dialysierte Peroxydaselösung, deren Volum während der zweiten Phase der Dialyse keine nennenswerte Veränderung erfuhr, war eine opaleszierende, leicht filtrierbare Flüssigkeit, welche auch durch wiederholtes Filtrieren nicht geklärt

¹⁾ Diese Operation wurde von den HHrn. Nietzberg und Polonovski, Fabrique de produits chimiques, La Plaine, Genève, in liebenswürdiger Weise für uns unternommen. Es sei uns gestattet, ihnen auch hier unseren besten Dank auszusprechen.

werden konnte. Von dem Dialysat wurden 670 ccm mit 4.5 l 99-prozentigem Alkohol versetzt, der entstandene leichte Niederschlag wurde nach 24 Stunden auf einem gehärteten Filter gesammelt, mit absolutem Alkohol nachgewaschen und im Vakuum vom Alkohol befreit.

Die in der oben beschriebenen Weise gereinigte Peroxydase wurde in Form eines leichten, graulichweißen Pulvers erhalten, dessen Gewicht nur 0.780 g betrug. Das Präparat enthielt 7.87 % Wasser, 81.66 % organische Stoffe und 1.47 % Asche. Die Stickstoffbestimmung im Verbrennungsrohr ergab 3.44 % Stickstoff (auf aschefreie Substanz bezogen). Bei der Ermittlung des Aktivierungsvermögens nach Bach wurden folgende Zahlen erhalten:

0.0073 g Peroxydase + Hydroperoxydüberschuß ergaben 0.263 g Purpurogallin
 0.050 g Hydroperoxyd + Peroxydaseüberschuß » 0.079 g »

$$\text{Aktivierungsvermögen: } \frac{0.263 \times 0.05}{0.079 \times 0.0073} = 22.7.$$

Die von Stöcklin¹⁾ beschriebene gereinigte Peroxydase enthielt 11.41 % Wasser, 65.88 % organische Stoffe, 22.71 % Asche. Stickstoffgehalt 3.43 %, Aktivierungsvermögen 2. Bei gleichem Stickstoffgehalt und 15-mal geringerem Aschegehalt aktivierte also unsere Peroxydase etwa 11-mal so viel Hydroperoxyd, wie die Stöcklinsche. Das Aktivierungsvermögen der Peroxydase scheint also weder zu ihrem Stickstoffgehalt, noch zu ihrem Aschegehalt in direkter Beziehung zu stehen. Allem Anschein nach wird es bei weiterer Ausarbeitung des obigen Reinigungsverfahrens gelingen, völlig aschefreie Peroxydase darzustellen.

Unsere Peroxydase gibt in unzweideutiger Weise die Biuretreaktion und die Xanthoproteinreaktion, nicht aber die Millonsche Probe. Beim Erhitzen der Substanz im Glasröhrchen entweicht Pyrrol und eine stark alkalisch reagierende Base. Pyrrol entsteht ebenfalls beim Veraschen der Peroxydase im Platintiegel. In welcher Beziehung die Peroxydase zu den Eiweißstoffen steht, läßt sich zurzeit nicht ermitteln. Mit Rücksicht auf den geringen Stickstoffgehalt und das Ausbleiben der Millonschen Reaktion ist höchstens die Annahme zulässig, daß die Peroxydase zu den »Proteinstoffen im weiteren Sinne« (Czapeck) gehört.

Die gereinigte Peroxydase aktiviert Hydroperoxyd sowohl bei der Oxydation der Phenole und aromatischen Amine, wie bei der der Jodwasserstoffsäure. In dieser Hinsicht besteht kein merkbarer Unterschied zwischen der Rohperoxydase und der reinsten Präparate.

¹⁾ Contribution à l'étude de la peroxydase, S. 24.

Auf Grund dieser Beobachtung, sowie der früher von Bach¹⁾ gemachten Erfahrungen, ist anzunehmen, daß die Peroxydase ein einheitliches Enzym ist, dem die Funktion zukommt, Hydroperoxyd bei der Oxydation von Körpern, welche labilen Wasserstoff enthalten, zu aktivieren. Die chemische Natur der Körper ist aber für das Zustandekommen des Aktivierungsprozesses nicht maßgebend. Allerdings wird Hydroperoxyd bei der Oxydation des Tyrosins von der gewöhnlichen Peroxydase nicht aktiviert²⁾, wohl aber von der Peroxydase, welche in der Tyrosinase tätig ist³⁾. Die Ursache dieser Erscheinung soll durch weitere Versuche aufgeklärt werden.

Bemerkenswert ist die geringe Empfindlichkeit der reineren Peroxydase gegen Siedehitze. Es gilt hier als Regel, daß je größer ihre Konzentration ist, desto längeres Erhitzen die Peroxydase vertragen kann. Als Beispiel soll folgender Versuch angeführt werden:

6 dünnwandige Probierröhren wurden mit je 1 ccm reinerer Peroxydase-lösung (= 0.017 g Hydroperoxyd) beschickt und in siedendes Wasser eingetaucht. Es zeigte sich, daß völlige Zerstörung der Peroxydase erst nach 18 Minuten dauerndem Erhitzen der Lösung in siedendem Wasser eintrat. Die ursprüngliche Peroxydase-lösung wurde dann auf das 20-fache mit destilliertem Wasser verdünnt, zu je 1 ccm auf 6 Röhren verteilt und in siedendem Wasser erhitzt. Die Zerstörung der Peroxydase erfolgte hier schon nach Verlauf von 3 Minuten.

Zur Ausführung weiterer Versuche über die Eigenschaften der reineren Peroxydase reichte die von uns erhaltene Enzymmenge nicht hinaus.

Hrn. Prof. A. Pictet, in dessen Laboratorium vorliegende Untersuchung zum größten Teil ausgeführt worden ist, sprechen wir unseren warmen Dank aus.

Genf. Privatlaboratorium und Universitätslaboratorium.

¹⁾ A. Bach, diese Berichte **40**, 230, 3186 [1907].

²⁾ R. Chodat, Journ. Suisse chim. et pharm. **46**, 48 [1905]; A. Bach, diese Berichte **39**, 2126, 3329 [1906].

³⁾ A. Bach, diese Berichte **41**, 216 [1908].
