

ARBEITEN AUS DEM PHARMAKOLOGISCHEN INSTITUT
ZU GÖTTINGEN

ÜBER DIE
METHYLENBLAUREDUKTION
DURCH GLYCIN

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE
IN DER
MEDIZIN, CHIRURGIE UND GEBURTSHILFE
DER
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER
GEORG-AUGUST-UNIVERSITÄT
ZU GÖTTINGEN
VORGELEGT
VON
FRIEDRICH HASSE
AUS BRÜGGEN (HANN.)

SPRINGER-VERLAG BERLIN HEIDELBERG GMBH
1919

ISBN 978-3-662-42048-5 ISBN 978-3-662-42315-8 (eBook)
DOI 10.1007/978-3-662-42315-8

**Der medizinischen Fakultät der Universität Göttingen
vorgelegt am 25. Juli 1919**

Referent: Prof. Dr. Loewe

Korreferent: Prof. Dr. Heubner.

Die Drucklegung ist seitens der Fakultät genehmigt

1.

Zu der folgenden Untersuchung gab eine gelegentliche Beobachtung den Anstoß: Anlässlich eines Gutachtens¹⁾ fand sich, daß die Rückstände alkoholischer Extrakte aus Leichenteilen bei alkalischer Reaktion Methylenblau zu reduzieren vermögen. Diese Reduktion konnte nicht durch Fermente bedingt sein. „Reduktasen“ müßten ja durch die Behandlung der Extrakte zerstört bzw. beseitigt worden sein (mehrfaches Kochen, Alkohol-fällung, Eintrocknen usw.). Es handelt sich also um eine einfache chemische Reaktion, die eine chemisch greifbare Substanz als Träger des Reduktionsvermögens der Extrakte erwarten ließ. Ihre Isolierung aus Leichenteilen ist bislang nicht gelungen. Dagegen ließen Erfahrungen, die in Vorversuchen mit isolierten physiologisch-chemisch vorkommenden Substanzen gemacht wurden, eine weitere Verfolgung dieser Seite der Frage als anziehend und aussichtsreich erscheinen.

Unter der im Vorversuch geprüften großen Reihe von Substanzen physiologisch-chemischen Vorkommens schien hinsichtlich der Reduktion des Methylenblaus das Glykokoll übertragende Wirksamkeit zu besitzen. Es war daher näher zu betrachten, ob in der Tat das Glykokoll vor anderen Amino-

¹⁾ Loewe, Vierteljahrsschr. f. gerichtl. Medizin (im Druck).

säuren sich auszeichnet und auf welche Eigenschaft des Glykollmoleküls die besonders hohe Reduktionsleistung zurückzuführen ist.

2.

Ich trat an die Frage in der Weise heran, daß ich möglichst zahlreiche, dem Glycin nahe oder ferner stehende Stoffe approximativ quantitativ hinsichtlich ihrer Methylenblaureduktion mit Glycin verglich. Bei der Auswahl der Stoffe war neben ihrer Beschaffbarkeit einerseits ihre chemische Beziehung zum Glycin, andererseits ihr Vorkommen im Organismus leitend¹⁾.

Von den zu untersuchenden Substanzen wurde im allgemeinen eine 1%ige Lösung, unter Umständen durch Ansäuern oder Alkalisieren hergestellt und benutzt. Einige Ausnahmen, in denen besondere Maßnahmen erforderlich waren, sind im speziellen Teil erwähnt. Das Methylenblau wurde in einer Lösung 1:50000 verwandelt. Die Vorversuche hatten ergeben, daß alle Substanzen, die Reduktion bewirkten, nur bei alkalischer Lösung wirksam waren. Diese eigentümliche Bedingung von seiten der Wasserstoffionenkonzentration ist für zahlreiche Oxydationsreaktionen bekannt. Als ein Fall, bei dem Methylenblau wie bei uns den Wasserstoffacceptor des Systems darstellt, sei die Reaktion des Systems: Adrenalin/Methylenblau angeführt, die von Loew²⁾ beschrieben ist. Noch bekannter ist die alkalische Reaktion als Bedingung für die Weiteroxydation aromatischer Oxykörper (z. B. Hydrochinon, Brenzcatechin, Resorcin). Daher wurden alle Substanzen sowohl bei neutraler Reaktion als auch bei einem tunlichst gleichmäßigen Alkalitätsgrade geprüft. Im ersteren Falle wurde 1 ccm der gelösten Substanz mit 1 ccm der Methylenblaulösung zusammengebracht. Ein Gegenversuch (1 ccm Aqua destillata + 1 ccm Methylenblaulösung) wurde als Farbkontrolle angesetzt. Im zweiten Falle wurde 1 ccm der gelösten Substanz + 1 ccm Methylenblaulösung + 1 ccm 10%iger Natronlauge zusammengebracht. Für die Farbkontrolle wurde hier gleichfalls ein Zusatz von 1 ccm Natronlauge gemacht. Eine weitere Kontrolle war erforderlich, um Auskunft über die in manchen Fällen auftretende störende Eigenfärbung der alkalisierten Prüfungslösung zu erhalten. In ihr wurde die gleiche

¹⁾ Neben einer Reihe von Stoffen eigener Herstellung standen mir solche aus der Sammlung des hiesigen Instituts zur Verfügung. Die im Handel erhältlichen bezog ich als reine Präparate von Merck und Kahlbaum; insbesondere aber wurde ich in wertvoller Weise unterstützt von den Herren Proff. Windaus, Neuberg und Thomas, denen ich für freundliche Überlassung zum Teil seltener Substanzen aus den Sammlungen des Göttinger Chemischen Universitätslaboratoriums und der Kaiser Wilhelm-Institute für experimentelle Therapie und Arbeitsphysiologie meinen verbindlichsten Dank aussprechen möchte.

²⁾ Biochem. Zeitschr. 85, 295, 1918.

Konzentration der zu prüfenden Substanz und der zugesetzten Lauge hergestellt, jedoch ohne Methylenblauzusatz. Abgelesen wurde das Ergebnis in wechselnden Zeiträumen, von 1 Min. bis 1- bis 2- bis 3mal 24 Stunden.

Um Vergleichszahlen zu erhalten, berechnete ich bei meinen Reaktionen in beiläufiger Überschlagsrechnung die Konstante (K) der Reaktionsgeschwindigkeit¹⁾.

¹⁾ Die Vergleichszahlen K sind nach folgender Vereinfachung gewonnen: Legt man den geprüften Vorgängen die Annahme einer bimolekularen Reaktion

Sauerstoffacceptor (a) + Wasserstoffacceptor (b) \rightleftharpoons Oxydationsprodukt
+ Reduktionsprodukt

zugrunde, so gilt die Gleichung

$$K' = \frac{1}{a-b} \cdot \frac{1}{t} \cdot \ln \left[\frac{a-x}{a} \cdot \frac{b-x}{b} \right]$$

oder vereinfacht

$$K' + k_1 \cdot \frac{1}{t} \cdot \log \left[k_2 \frac{b}{b-x} \right],$$

wobei der Ausdruck k_1 = konstant angenommen und für unsere Vergleichszwecke willkürlich = 1 gesetzt werden kann, solange a und b unverändert bleiben. k_2 kann = 1 gesetzt werden, solange a sehr viel $> b$, somit auch sehr viel $>$ als die höchsten x -Werte. Beide Voraussetzungen treffen für die Mehrzahl meiner Versuche zu, in denen die Sauerstoffacceptoren in einer Konzentration 1:100, das Methylenblau 1:50000 verwendet wurde.

In einigen Fällen wurden indessen für den Sauerstoffacceptor 2- bzw. 5- bzw. 10fach niedrigere Konzentrationen verwendet. Es ist leicht ersichtlich, daß die daraus für den Ausdruck k_2 resultierende Veränderung vernachlässigt, die für k_1 in hinreichender Annäherung dadurch ausgeglichen werden kann, daß dafür statt 1 jeweils 2, 5 oder 10 eingesetzt wird.

Die Vernachlässigung des Molekulargewichts M der Sauerstoffacceptoren kann in hinreichender Annäherung ausgeglichen werden, wenn ihm die K' -Größen proportional gesetzt werden. Auch für die b - und x -Werte wurden vereinfachende Annahmen zugrunde gelegt. Die Ausgangskonzentration des Methylenblaus war in allen Versuchen die gleiche. Da die Abschätzung des Reaktionsablaufs in Prozenten der Ausgangskonzentration (p) geschah, wurde $b = 100$ gesetzt und die eben eintretende totale Entfärbung bei 10% derselben (1:500000) angenommen, demnach $x = \frac{p}{10}$ ermittelt.

Der überschlagsweisen Berechnung meiner K -Werte lag sonach die vereinfachte Gleichung

$$k = \frac{M \cdot k_1}{t} \cdot \log \frac{b}{b-x}$$

zugrunde. Zur besseren Darstellung wurde dann noch $K = k \cdot 10^4$ ermittelt.

3.

Die nachfolgende Tabelle gibt eine Übersicht über die geprüften Substanzen und die bei ihrer Prüfung erzielten Zahlen:

Substanz	<i>p</i>	<i>t</i> (Min.)	<i>K</i>
Aminoessigsäure (Glycin ¹)	100	10	75 · 10 ³
Methylamin	0	1350	$\frac{1}{\infty}$
Bromäthylamin	20	1380	7,6 · 10 ¹
Aminoacetal	0	1390	$\frac{1}{\infty}$
Glycinäthylester	0	1440	$\frac{1}{\infty}$
Ameisensäure	0	1440	$\frac{1}{\infty}$
Essigsäure	0	1440	$\frac{1}{\infty}$
Glykolsäure	0	4320	$\frac{1}{\infty}$
Glyoxylsäure	0	4320	$\frac{1}{\infty}$
Oxalsäure	20	1380	5,6 · 10 ¹
α-Aminopropionsäure (α-Alanin)	0	1440	$\frac{1}{\infty}$
α-Amino-n-Buttersäure	0	1440	$\frac{1}{\infty}$
α-Amino-n-Valeriansäure	0	1440	$\frac{1}{\infty}$
α-Amino-iso-Buttersäure	0	1440	$\frac{1}{\infty}$
α-Amino-iso-Valeriansäure (α-Valin)	0	1440	$\frac{1}{\infty}$
α-Amino-iso-Kapronsäure (α-Leucin)	0	1440	$\frac{1}{\infty}$
Serinanhydrid	100	60–90	11,5 · 10 ³
Cystin	0	4320	$\frac{1}{\infty}$
Cystein	90	900	1,6 · 10 ³
Asparaginsäure	0	1320	$\frac{1}{\infty}$
Asparagin	0	1320	$\frac{1}{\infty}$
Lysin	0	1440	$\frac{1}{\infty}$
β-Aminopropionsäure (β-Alanin)	0	1440	$\frac{1}{\infty}$

¹) Sämtliche Substanzen sind, soweit nicht anderweitig vermerkt ist, in Lösung 1:100 geprüft.

Substanz	<i>p</i>	<i>t</i> (Min.)	<i>K</i>
Isoserin	0	2088	$\frac{1}{\infty}$
β -Amino-n-Buttersäure . . .	0	1060	$\frac{1}{\infty}$
Sarkosin	0	1440	$\frac{1}{\infty}$
Guanidin	0	1380	$\frac{1}{\infty}$
Kreatin	100	10	$120 \cdot 10^3$
Ätylenglykol	0	2160	$\frac{1}{\infty}$
Acetaldehyd	100	20	$22 \cdot 10^3$
Glucose	100	40–70	$35 \cdot 10^3$
Glykosamin	100	7–16	$185 \cdot 10^3$
Phenylaminoessigsäure	0	2860	$\frac{1}{\infty}$
Phenylaminopropionsäure (Phenylalanin)	50	3600	$12 \cdot 10^1$
Oxyphenylaminopropionsäure (Tyrosin ¹)	25	4320	$30 \cdot 10^1$
Jodtyrosin ¹)	25	4320	$49 \cdot 10^1$
Phenyläthylamin	0	1440	$\frac{1}{\infty}$
Oxyphenyläthylamin (Tyramin)	0	1440	$\frac{1}{\infty}$
Resorcin ²)	75	90	$61 \cdot 10^3$
Hydrochinon ²)	100	14	$780 \cdot 10^3$
Brenzcatechin ²)	90	90	$89 \cdot 10^3$
Adrenalin ²)	100	15–30	$900 \cdot 10^3$
Kotarnin	75	1380	$91 \cdot 10^1$
Imidazolaminopropionsäure (Histidin)	75–90	4320	$95 \cdot 10^1$
Indol ³)	50	1320	$158 \cdot 10^1$
Indolaminopropionsäure (Tryptophan)	50	1320	$39 \cdot 10^1$
Indoläthylamin (Tryptamin)	0	2400	$\frac{1}{\infty}$

Eine vergleichende Übersicht über die wichtigsten reduzierenden Substanzen der Tabelle ist der folgenden graphischen Darstellung (Fig. 1 bis 3) zu entnehmen:

¹) 0,5 : 100.
²) 0,1 : 100.
³) 0,2 : 100.

Auf Grund der oben geschilderten Berechnung der Reaktionskonstante ist demnach für Glycin $K = 75\,000$.

Lassen wir nun das Radikal B zunächst unverändert und betrachten Modifikationen im Radikal A . Ihre weitgehendste ist der Ersatz von A durch H (Methylamin). Diese Änderung hebt die Wirksamkeit des Systems bei neutraler und alkalischer Reaktion vollkommen auf, auch nach mehr als 24 Stunden ist keine Entfärbung angedeutet. Daraus ergibt sich $K = \frac{1}{\infty}$.

Auch dem Substitutionsprodukt $A = CH_3$ (Äthylamin), das ich mir nicht beschafft habe, dürfte, wie sich aus dem folgenden ergibt, keine wesentliche Wirksamkeit zukommen. Das statt seiner geprüfte $A = CH_2Br$ (Bromäthylamin) weist den sehr kleinen Geschwindigkeitskoeffizienten $K = 76$ auf. Nach mehr als 23 Stunden ist das Methyleneblau nur um 20% entfärbt. Auch für die übrigen aliphatischen Monoamine, die ich nicht in Prüfung zog, ist demnach keine merkliche Reduktionsleistung zu erwarten. Die endständige CH_2NH_2 -Gruppe allein kann also, das ergibt sich schon aus diesen wenigen Versuchen, nicht alleiniger Träger der besonderen Reaktionsfähigkeit des Glycins sein.

Auch weniger weitgehende Abweichungen am A-Kohlenstoff des Glycins verhelfen dem B -Radikal noch nicht zur Wirkung. Ein Carbonylrest in A allein scheint ebenfalls nicht zu genügen. Allerdings habe ich nicht den Träger der freien Aldehydgruppe, den Aminoacetaldehyd selbst prüfen können. Nach den Erfahrungen mit dem Acetaldehyd (s. unten) kommt ihm wohl sicher eine sehr hohe Wirksamkeit zu. In seiner Modifikation als Aminoacetal war indessen $K = \frac{1}{\infty}$, ebenso für Aceton. Auch Alkylsubstitution an R_5 hebt die Glycinwirkung auf: Beim Glycinäthylester war nach mehr als 24 Stunden noch keine Entfärbung des Methyleneblaus eingetreten, also gleichfalls $K = \frac{1}{\infty}$.

Auch die Carboxylgruppe A allein genügt aber, wie zu erwarten war, nicht: Sowohl $B = H$ (Ameisensäure) als auch $B = CH_3$ (Essigsäure) erwiesen sich bereits in Vorversuchen als unwirksam. Ebenso hebt auch der Fortfall der Aminogruppe

unter Einführung von OH (Glykolsäure) oder der Carbonylgruppe (Glyoxylsäure) die Glycinwirkung auf (die Glykolsäure entstammte der Firma Merck; die Glyoxylsäure stellte ich mir selbst durch Reduktion von Oxalsäure mit Magnesiumpulver frisch her). Beide bewirken in mehr als 72 Stunden keine Entfärbung des Methylenblaus; K ist somit bei beiden $= \frac{1}{\infty}$. Die weitere Oxydationsstufe (Oxalsäure) ($B = \text{COOH}$) bedingt dagegen eine gewisse Wirksamkeit des Systems. Das Methylenblau wird in 23 Stunden immerhin um 20% entfärbt, also $K = 56$.

Besonders bemerkenswert sind nun die Alkylsubstitutionen in R_1 bzw. R_2 , die zeigen, daß die Endständigkeit der Amino-Gruppe eine wesentliche Bedingung der Reaktionsfähigkeit des Systems Glycin/Methylenblau ist. Alle homologen α -Aminosäuren des Glycins riefen auch in mehr als 72 Stunden keine Andeutung einer Entfärbung des Methylenblaus hervor. Für alle ist $K = \frac{1}{\infty}$. Das gilt sowohl für gerade [geprüft sind: α -Alanin, α -Amino-n-Buttersäure, α -Amino-n-Valeriansäure] wie für verzweigte [geprüft sind: α -Amino-iso-Buttersäure, α -Amino-iso-Valeriansäure (Valin), α -Amino-iso-Caprinsäure (Leucin)] Säureketten.

Eine wesentliche Änderung kann die Einführung von substituiertem Alkyl in R_1 bzw. R_2 bedingen. $R_1 = \text{CH}_2\text{OH}$ (Serin) stand mir allerdings nicht zur Verfügung. Dagegen wies bereits Serinanhydrid $K = 11500$ auf. Vorhanden, aber recht gering, ist die Reduktion bei $R_1 = \text{CH}_2\text{SH}$, dem Cystein: $K = 1600$. Das ist um so beachtenswerter, als es bei anderen Wasserstoffacceptoren als der wichtigste Träger der Reduktionsleistung des Eiweißes betrachtet wird. Nach Heffter¹⁾ ist es die SH-Gruppe des Cysteins, an die die Reaktionsfähigkeit des Eiweißes mit elementarem Schwefel gebunden ist, die deshalb bei schwefelreichen Eiweißarten (Keratin) so besonders hoch ist.

Allerdings ist das oben für Cystein angegebene Versuchsergebnis $K = 1600$ mit einer gewissen Vorsicht aufzunehmen. Die Prüfung von Cystein in meiner Versuchsanordnung ist nicht leicht einwandfrei vor-

¹⁾ Med.-naturwissenschaftl. Arch. 1, 81, 1907.

zunehmen. Einmal wegen der schweren Zugänglichkeit reinen Cysteins, andererseits wegen dessen leichter Zersetzlichkeit. Es geht in alkalischer Lösung leicht wieder in Cystin über, durch Oxydation in Cysteinsäure. Die letztere Gefahr ist wohl die geringere. Ich stellte mir Cystein in meinem Falle aus Cystin durch Reduktion mit Zink und Salzsäure her. Die nach Filtration gewonnene Lösung, die nach Neutralisation auf einen Gehalt von 1% aufgefüllt war, enthält merkliche Mengen Schwefelwasserstoff, dessen Bildung nicht ganz zu vermeiden ist. Sie ist aber vor allem deswegen nicht recht in Vergleich mit den Lösungen der übrigen Substanzen zu setzen, weil ihre Konzentration an bereits reduziertem Cystein doch recht zweifelhaft ist. Immerhin ist hervorzuheben, daß Cysteinlösungen, die mit verschieden langer Reduktionsdauer hergestellt wurden, sich nicht merklich verschieden gegen Methylenblaulösung verhielten. Alles in allem lassen die Versuche den Schluß zu, daß dem Cystein zum mindesten eine außerordentlich viel geringere Reduktionsleistung gegenüber Methylenblaulösung zukommt als dem Glycin.

Daß die Reduktionswirkungen der Sulphydrylgruppen der Aminosäuren mit denjenigen des Glycins nicht vergleichbar sind, geht auch aus einem Gegenversuch mit Schwefel als Wasserstoffacceptor hervor. Stellt man den bekannten Reduktionsversuch des Systems Eiereiweiß/Sulfur praecipitatum derart an, daß man das zu kräftiger Schwefelwasserstoffbildung führende Eiereiweiß durch die glycinreichere Gelatine oder auch durch Glycin selbst in neutraler oder alkalischer Lösung ersetzt, so läßt sich keine Andeutung von Schwefelreduktion beobachten.

Das Cystin allerdings ist dem Methylenblau gegenüber noch bedeutend unwirksamer als Cystein. Versuche mit mehreren Cystinen verschiedener Herkunft ließen übereinstimmend auch jede geringste Reduktion vermissen ($K = \frac{1}{\infty}$).

Unwirksam bleibt das System auch dann, wenn das in R_1 eingeführte substituierte Alkyl die in der Oxalsäure wirksam gefundene zweite Carboxylgruppe enthält. Für Asparaginsäure, ebenso auch für Asparagin ist $K = \frac{1}{\infty}$.

Nicht anders verhält sich eine zweite endständige Amino-
gruppe im Alkylsubstituenten von R_1 . Auch Lysin ist unwirksam ($K = \frac{1}{\infty}$).

Jede Verlängerung der Kette in R_1 bzw. R_2 hebt also die

Reaktionsfähigkeit des Glycins auf. Das Gleiche gilt von einer Verlängerung durch Einschlebung von Alkylradikalen zwischen *A* und *B*. Schon der einfachste Körper dieser Reihe, das β -Alanin, ist unwirksam: $K = \frac{1}{\infty}$.

Im gleichen Sinne spricht das Ergebnis mit Isoserin. Entgegen der guten Wirksamkeit von Serinanhidrid, die möglicherweise auf Serin übertragen werden darf, ist das β -Homologe vollständig unwirksam ($K = \frac{1}{\infty}$). Daß auch eine weitere Verlängerung der Kette des β -Alanins durch ein endständiges Methyl die Wirksamkeit nicht erhöht (β -Amino-n-Buttersäure: $K = \frac{1}{\infty}$), nimmt demnach nicht wunder.

Von weniger eindeutigem Einfluß ist es dagegen, wenn die Substitutionen statt am C (in R_1 bzw. R_2) am N erfolgen. Auf der einen Seite erweist sich die einfachste Modifikation des Glycins an dieser Stelle, das Sarkosin, bereits als unwirksam: $K = \frac{1}{\infty}$. Auf der anderen Seite weist aber auch noch Kreatin die unveränderte Reduktionsleistung des Glycins auf. Es entfärbt Methyleneblau in 10 Minuten vollständig ($K = 120000$). Von Wichtigkeit für die Beurteilung dieses Ausfalls ist, daß das Substitut Guanidin gänzlich unbeteiligt ist ($K = \frac{1}{\infty}$). Hier nach und nach dem Ergebnis der Lysinprüfung ist demnach auch für das nicht geprüfte Arginin ein negativer Ausfall zu erwarten.

Während alle diese einfachen Modifikationen durch je einen aliphatischen Substituenten an *A* oder *B* einen gewissen unmittelbaren Einblick in die Bedingungen der Reduktionswirkung des Glycinmoleküls geben, werden die Verhältnisse verwickelter und damit schwerer zu übersehen bei kombinierter Substitution in *A* und *B*. Umwandlung der säure- und der aminotragenden Gruppe in Carbinol. freilich hebt die Wirksamkeit auf (Äthylenglykol: $K = \frac{1}{\infty}$). Jedoch die Aldehydgruppe, die ja oben in Gestalt des Aminoacetaldehyds nicht geprüft werden konnte, bedingt verständlicherweise schon allein

auch beim Fehlen der Aminogruppe eine starke Reduktionswirkung. Acetaldehyd entfärbt Methylenblau in 20 Minuten, also $K = 22000$. Darin drückt sich also ein offenbar mit der Glycinwirkung nicht in engsten Vergleich zu setzender Reduktionsvorgang aus, in dem die Aldehydgruppe als Sauerstoff-acceptor fungiert. Es ist jedoch zur Beleuchtung der Glycinwirkung von vornherein bemerkenswert, daß der dem Glycin am nächsten stehende Aldehyd eine mehr als 3mal geringere Wirksamkeit besitzt. Wie sich andere Aldehyde verhalten, habe ich nur unvollkommen in den Bereich meiner Prüfung einbezogen. Glucose verhält sich wie Acetaldehyd (sie entfärbt in 40 bis 70 Minuten Methylenblau, also $K = 35000$). Die Verlängerung der Kohlenstoffkette, deren Beurteilung hier freilich durch das Hinzutreten von OH-Gruppen (vgl. Serin) kompliziert wird, scheint nicht so zu wirken wie bei den Aminosäuren, bei denen bereits der Übergang vom Glycin zum Alanin die Reduktionswirkung vollständig aufhebt. Deutlich erweist sich die Anwesenheit der α -Aminogruppe auch hier als ein beträchtlich verstärkender Umstand. Im Glykosamin, das in 7 bis 10 Minuten vollständig entfärbt, ist die Reduktionsleistung des Glycins noch übertroffen. ($K = 185000$.)

Ähnliche Verwicklungen, wie eine solche durch die Sonderwirkung der aliphatischen Aldehydgruppe gekennzeichnet ist, treten nun auf, wenn zyklische Substituenten ins Glycin eingeführt werden.

R_1 bzw. $R_2 = \text{Phenyl}$ freilich verhält sich nicht anders als eine Alkylverlängerung der Kette an dieser Stelle; Phenylaminoessigsäure ist unwirksam ($K = \frac{1}{\infty}$). A aralkyleinführung jedoch ist von anderer Bedeutung. Während Phenylglycin keine Spur der Wirksamkeit des Glycins mehr aufweist, gewinnt Phenylalanin im Gegensatz zu der vollkommenen Reduktionsunfähigkeit des Alanins eine gewisse Wirksamkeit ($K = 120$). Sie kommt freilich erst nach langer Reaktionszeit zum Vorschein, bewegt sich also in einer ganz anderen Größenordnung als die unserer starken aliphatischen Reduktantien.

Monosubstitutionen am Phenolkerne können auf diesen Wirkungsgrad des Phenylalanins einen deutlichen, allerdings die Größenordnung nicht verschiebenden Einfluß gewinnen.

Tyrosin ($K=300$), mehr noch Jodtyrosin ($K=490$) verstärken die Reduktionswirkung des Phenylalanins.

Ganz anders als die eine Oxygruppe im Tyrosin wirkt nun aber die Dioxysubstitution. Allerdings ist die Reihe der hierhergehörigen Körper, die meiner Prüfung zugänglich waren, nichts weniger als vollständig. Die entscheidende Substanz, das Dioxyphenylalanin, habe ich mir nicht beschaffen können. So leitet nur die Prüfung von Phenyläthylamin und Oxyphenyläthylamin (Tyramin) zum Adrenalin über.

Während diese beiden gänzlich unwirksam sind ($K=\frac{1}{\infty}$), übertrifft das Adrenalin in seiner Reduktionswirkung das Glycin bedeutend. Es entfärbt bereits in 1^o/₁₀₀iger Lösung in 15 bis 30 Minuten vollständig. Sein Geschwindigkeitskoeffizient würde sich also nach meiner vereinfachten Abschätzungsweise auf etwa 900000 belaufen. Das Fehlen der Carboxylgruppe beeinträchtigt offenbar die Wirkung der gesamten Konfiguration des Adrenalinmoleküls nicht. Das geht aus dem Vergleich der aromatischen Amine und ihrer Aminosäuren hervor, die beide unwirksam sind. Die Ursache der Adrenalinreduktion ist also entweder in den Kernoxygruppen oder in der aliphatischen Alkoholgruppe zu suchen. Versuche mit Dioxyphenolen zeigen nun in der Tat, daß der Brenzcatechincharakter des Adrenalins von Bedeutung für seine Reduktionsleistung sein muß. Alle drei Dioxyphenole reduzieren Methylenblau sehr intensiv; während Resorcin ($K=61000$) am wenigsten wirksam ist, übertrifft allerdings Hydrochinon ($K=780000$) die Wirksamkeit des Brenzcatechins ($K=89000$). Zur vollen Erklärung der hohen Wirkung des Adrenalins reicht dieser Koeffizient seines Brenzcatechinanteils, der sich in der Größenordnung des Glycins hält, während Adrenalin wie Hydrochinon dieses um eine ganze Größenordnung übertreffen, freilich nicht aus. Die Amino- oder die Alkoholgruppe in der Seitenkette spielt doch wohl außerdem eine Rolle.

Wesentlich schwächer wird die Wirksamkeit, wenn die Konfiguration im Sinne des Kotarnins verändert wird. Während man von der aromatischen Aldehydgruppe eine Verstärkung erwarten könnte, zeigt sich die Verätherung der Kernhydroxyle schwächend. Zwar ist auch Kotarnin noch redu-

zierend, aber doch nur mit der um 3 Größenordnungen geringeren Konstante $K = 910$.

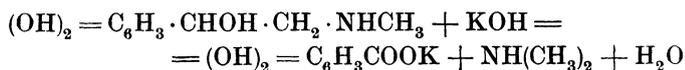
Der Phenolkern allein vermag dem Alanin ebensowenig wie dem Glycin zur Wirksamkeit zu verhelfen. Um so auffälliger ist, daß heterozyklische Ringe, an der gleichen Stelle eingeführt, zu reduzierenden Aminosäuren führen. Das trifft für die beiden geprüften Ringe, den Imidazol- und Indolring zu. Histidin weist eine Konstante $K = 950$ auf, Tryptophan eine solche von 390. Für Tryptophan findet sich eine Erklärung in der zehnfach stärkeren Wirksamkeit des Indols selbst ($K = 1580$). Hier ist also wohl die gesamte Wirksamkeit in den Ring zu verlegen, der Aminogruppe der Seitenkette kommt keine Mitwirkung zu. Das Imidazol habe ich nicht prüfen können; es bleibt also offen, ob beim Histidin die Verhältnisse ebenso liegen wie beim Tryptophan. Daß sie übrigens auch bei diesem nicht so ganz einfach zu beurteilen sind, geht aus der auffälligen Beobachtung hervor, daß Tryptamin wiederum gänzlich unwirksam ist ($K = \frac{1}{\infty}$).

5.

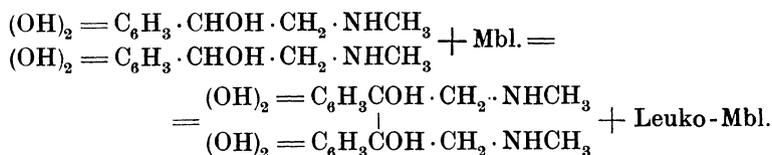
Zusammengefaßt geben die vorliegenden Ermittlungen Anlaß zu Schlüssen in verschiedenen Richtungen. Zunächst darf man als feststehendes Ergebnis verzeichnen, daß Glycin in alkalischer Lösung mit Methylenblau ein Reaktionssystem bildet, das zu einer Reduktion dieses letzteren führt, während alle seine Homologen, d. h. sowohl die aliphatischen, wie auch die aromatischen Aminosäuren, zu dieser Reaktion nicht imstande sind. Die gleiche Wirkung wie das Glycin besitzen einerseits Acetaldehyd, andererseits Adrenalin. Beide sind durch besondere Gruppen ausgezeichnet, die das Glycin vermissen läßt. Man kann sie also nicht in engen Zusammenhang mit der Glycinwirkung bringen.

Beide besitzen aber ihrerseits wieder Gruppengenossen, die ihre Wirkungsweise bis zu einem gewissen Grade zu erklären vermögen. So gehören mit dem Acetaldehyd Glykose und Glykosamin zusammen. Beide zeigen, daß für diese Gruppen das Aldehydradikal von ausschlaggebender Bedeutung ist; Verlängerung der Kette ist zusammen mit den Hydroxylgruppen

des Traubenzuckers von geringem Einfluß, eine α -Aminogruppe fördernd. Wie hier die Aldehydgruppe, so sind im Adrenalin die mehrfachen Kernhydroxyle von Bedeutung. Allerdings bestätigt sich die Anschauung Loews, daß auch die Seitenkette des Adrenalins von Wichtigkeit ist. Sie hat einen bedeutend verstärkenden Einfluß auf die Reduktionswirkung. Es ist freilich sehr die Frage, ob die Kernhydroxyle wirklich nur die untergeordnete Rolle spielen, die ihnen Loew beimißt, wenn er die Reduktionsreaktion nach den Gleichungen:



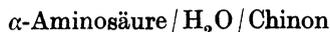
oder



vor sich gehen läßt. Hierüber werden wohl erst quantitative Ermittlungen und Untersuchungen der Reaktionsprodukte Klarheit schaffen. Daß neben der Aminogruppe auch eine benachbarte OH-Gruppe wirksam ist, läßt eine gewisse Parallele zwischen Serinanhydrid und Adrenalin erkennen.

Glycin steht also, bei der Verschiedenheit seiner Wirkungsmöglichkeiten von denen des Aldehyds und des Adrenalins, nicht nur unter den Aminosäuren, sondern auch unter den hier geprüften anderen Methylenblau reduzierenden Substanzen einzigartig da. Labile Wasserstoffatome wie am Adrenalin sind an ihm nicht zu finden und auch einen Sauerstoffacceptor von so einfachem Mechanismus wie der Aldehyd kann es nicht bilden. Sucht man nach ähnlichen Reduktionssystemen, so wird man auf die von Strecker¹⁾ und auf die später von Traube²⁾ studierten Systeme hingewiesen.

Die Streckersche Reaktion spielt sich in Systemen α -Aminosäure/ H_2O /Alloxan ab. Ganz analog sind die von Traube untersuchten Systeme, z. B.



¹⁾ Liebigs Ann. **123**, 363, 1862.

²⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **44**, 3145, 1911.

zu bewerten. In beiden Fällen handelt es sich um Systeme mit einem Wasserstoff- und einem Sauerstoffacceptor, die beide Wasser in einer von C. Oppenheimer¹⁾ recht treffend so genannten hydroklastischen Reaktion aufspalten und seine Bestandteile zur Oxydation bzw. Reduktion verwenden. In beiden Fällen führt die Oxydoreduktion einerseits zur reduktiven Umwandlung des Wasserstoffacceptors in Uramil bzw. Hydrochinon. Auf der anderen Seite findet beide Male eine Oxydation der Aminosäure ohne Mitwirkung des Luftsauerstoffes statt, wobei unter Desamidierung und Decarboxylierung der nächst niedere Aldehyd gebildet wird.

Wenn auch die genaue Prüfung der Glycin-Methylenblau-Reaktion unter Ausschluß des Luftsauerstoffes noch aussteht so ist doch hiernach die Vermutung berechtigt, daß es sich auch bei ihr um eine derartige hydroklastische Oxydoreduktion handelt. Sie hat dann mit den früher bekannten Aminosäureoxydationen im hydroklastischen System gemeinsam, daß auch bei ihr ein Prozeß vorliegt, der sich gänzlich ohne Katalysator mit bemerkenswerter Reaktionsgeschwindigkeit abspielt. In dem hydroklastischen Charakter berührt sie sich wohl auch mit den vergleichsweise angeführten Aldehyd-Methylenblau-Reaktionen. Denn während die Adrenalin oxydation in der Reaktion mit Methylenblau zwar wohl auch ohne Mitwirkung des Luftsauerstoffes, aber doch als einfache Dehydrierung vor sich gehen kann, spielen die Aldehyde wohl sicherlich die Rolle von Sauerstoffacceptoren. Die Entbehrlichkeit des Katalysators hingegen unterscheidet meine alkalischen Aldehyd-Methylenblau-Systeme scharf von denjenigen der viel studierten Schardingerschen²⁾ Reaktion. Schardingers Oxydoreduktions-System enthält neben Formaldehyd und Methylenblau ein Ferment, das bereits in aseptischer³⁾, aber nicht in erhitzter Milch vorhanden ist⁴⁾. Zwar ist weder der Sauerstoff-, noch der Wasserstoffacceptor spezifisch⁵⁾. Formaldehyd kann auch

¹⁾ Die Fermente, 2, 759. Leipzig 1913.

²⁾ Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungsm. 5, 22, 1902; Chem.-Zeitg. 28, 1113, 1908.

³⁾ Trommersdorf, Centralbl. f. Bakt. 49, 291, 1909.

⁴⁾ Die ausgedehnte Literatur über das Schardingersche Enzym siehe bei C. Oppenheimer, l. c.

⁵⁾ Rullmann, Biochem. Zeitschr. 32, 446, 1911.

durch andere Aldehyde ersetzt werden, wodurch die Reaktion meinen mit Acetaldehyd, Glykose, Glykosamin vor sich gehenden näher gebracht wird, auf der anderen Seite kann auch Methylenblau durch andere Farbstoffe, ja auch durch die als Wasserstoffacceptoren viel untersuchten Nitrate ersetzt werden¹⁾. Unentbehrlich ist aber der Zusatz der aus Milch oder auch aus tierischem Gewebe zu entnehmenden „Perhydridase“, die höchstens durch Ferrosulfat²⁾ ersetzt werden kann. (Dem Ferrosulfat kommt m. E. entgegen der Annahme Oppenheimers³⁾, der es als Sauerstoffacceptor betrachtet, die Rolle eines Sauerstoffüberträgers zu, denn der Aldehyd dürfte doch wohl der irreversiblere Sauerstoffacceptor sein.) Alle Untersucher sind aber darin einig, daß das ferment-(bzw. ferrosulfat-)freie System, das mir bei alkalischer Reaktion bereits starke Reduktion zeigte, bei der von ihnen eingehaltenen Wasserstoffionenkonzentration unwirksam ist. So ist z. B. nach Bredig und Sommer⁴⁾ Methylenblau-Formaldehyd selbst bei 70° nicht instande, Wasser zu spalten.

Wie die Entbehrlichkeit des Katalysators einen scharfen Unterschied zwischen der hier beschriebenen Oxydoreduktion und allen Modifikationen der Schardingerschen Reaktion ausmacht, so einen nicht geringeren die Spezifität — man darf nach den vorliegenden Erfahrungen wohl diesen Ausdruck gebrauchen — des Glycins gegenüber der Strecker-Traubesehen Reaktion. Man kann dieser Erscheinung die sicherlich auch biologisch nicht unwichtige, wenn auch in der Literatur, soweit ich sehen konnte, bisher noch nicht hervorgehobene Tatsache entnehmen, daß sich das Glycin von den übrigen Aminosäuren in geeigneten Systemen durch eine bedeutend höhere Oxydierbarkeit auszeichnet. Seine oxydative Labilität übertrifft unter den von mir angewandten Bedingungen die hinreichend bekannte der Aldehyde. Auch die Sonderstellung des Methylenblaus gegenüber den Wasserstoffacceptoren der Strecker-Traubesehen Systeme ist nicht ohne biologische Bedeutung. Sie zeigt, daß die Natur des Wasserstoffacceptors

¹⁾ Bach, *Biochem. Zeitschr.* **32**, 282, 1911.

²⁾ Römer, *Biochem. Zeitschr.* **40**, 5, 1912.

³⁾ l. c., S. 844.

⁴⁾ *Zeitschr. f. physik. Chem.* **70**, 34, 1909.

ebenfalls nicht gleichgültig ist und eine ausgeprägte „Elektivität“ bedingen kann. In diesem Zusammenhang muß darauf hingewiesen werden, wie sehr sich z. B. nicht nur Chinon, Uramil und Isatin, sondern auch der elementare Schwefel vom Methylenblau unterscheiden. Die beiden gut reagierenden Systeme Glycin/Methylenblau und Cystein/Schwefel werden schwach oder gar nicht wirksam, wenn man die Aktoren vertauscht.

Enthalten schon die bisherigen Überlegungen Hinweise auf physiologisch-chemische Folgerungen meiner Beobachtungen, so ist nun noch kurz die Frage zu berühren, inwieweit Verhältnisse, wie die von mir in vitro studierten im tierischen Stoffwechsel verwirklicht sind, inwieweit also oxydoreduzierende Vorgänge im Organismus sich abspielen und an den Verbrennungen — und zwar im einzelnen unter Heraushebung einer Sonderstellung des Glykokolls — Anteil nehmen können. Daß sich solche Vorgänge, das Vorhandensein eines Wasserstoffacceptors von der Art des Methylenblaus vorausgesetzt, an biologischem Material abspielen können, ist bereits den ersten Beobachtungen, an die ich anknüpfte, zu entnehmen. Die Frage, ob die $[OH^-]$ -Konzentration des biologischen Mediums ausreichend ist, darf bejaht werden; es reichen in der Tat recht geringe Alkaleszenzgrade aus, wie sie sehr wohl an einzelnen Stellen des Organismus verwirklicht sein können. Freilich sind die fermentfreien, Methylenblau reduzierenden Extrakte¹⁾ aus viele Tage alten Leichenorganen gewonnen, und Bacterienauszüge, in der gleichen Weise von Fermenten befreit, weisen nach Loewes Vergleichsversuchen recht beträchtliches Reduktionsvermögen auf. Aber auch an einem von bakteriellen Vorgängen freigehaltenen Material darf u. U. von weiterer Prüfung ein positiver Ausfall unserer Reaktion erwartet werden. Zum mindesten der bemerkenswerteste unserer Sauerstoffacceptoren, Glycin, ist ja auch ohne Fäulnis im Organismus zu vermuten. Vor allem ist es Heffter²⁾, der die Existenz von reduzierenden Substanzen, also von hier in Frage stehenden Sauerstoffacceptoren im Organismus betont. Selbst bei

¹⁾ Loewe, l. c.

²⁾ Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol., Schmiedeberg-Festschr. 1908, 253.

durch Hitze „tötbaren“ und durch Blausäure hemmbaren Reduktionsprozessen wie der Nitritbildung aus Nitraten und der Nitrobenzolreduktion brauchen nach Heffter keine echten „Reduktasen“ angenommen zu werden. Die Hitzetötung beweist nur die Kolloid-, nicht die Fermentnatur, und somit genügt Heffter zufolge die Annahme einer kolloiden, leicht oxydablen Substanz — er denkt an einen (Amino- oder Oxy-) Aldehyd — zur Erklärung seiner Beobachtungen an biologischem Material. Es sind dann zur Verwirklichung der hier beschriebenen Reaktion im Organismus noch biologische Wasserstoffacceptoren als Ersatz des Methylenblaus erforderlich. Daß solche im Organismus vorkommen können, ist von vornherein kaum zweifelhaft. Zum mindesten lassen sich ja sicherlich diejenigen bei der heute als biologisch wichtig anerkannten Cannizzaroschen¹⁾ Reaktion beteiligten Aldehydanteile, die zum Alkohol werden, hier anführen. Auch die allerdings noch unzureichend bewiesenen Atmungspigmente Palladins²⁾ stellen in der Pflanze derartige Wasserstoffacceptoren dar.

6.

Zusammenfassung.

1. Bei alkalischer Reaktion wird Methylenblau von Glycin schnell reduziert.

2. Andere Aminosäuren sind an Stelle des Glycins in diesem oxydoreduzierenden, mutmaßlich hydroklastischen Systeme unwirksam; eine Ausnahme bildet nur Kreatin, das dem Glycin gleichwertig ist.

3. Von bekannten physiologisch-chemischen Reduktionsmitteln des Methylenblaus sind Acetaldehyd und Glykose merklich schwächer, Glykosamin ein wenig stärker wirksam, Brenzcatechin und Resorcin sind dem Glycin ungefähr gleich, Adrenalin und Hydrochinon dagegen reduzieren etwa 10fach stärker.

4. Die hier beschriebene fermentfreie Oxydation biologischen Materials bei Gegenwart von Wasserstoffacceptoren wird in ihren Beziehungen zu ähnlichen älteren, insbesondere den Strecker-Traubescen Aminosäureoxydationen erörtert.

¹⁾ Parnas, Biochem. Zeitschr. 28, 274, 1910.

²⁾ Zeitschr. f. Gärungsphysiol. 1, 91, 1912.

Lebenslauf.

Ich, Friedrich Hasse, wurde am 8. Dezember 1891 zu Brüggen (Hann.) als Sohn des verstorbenen Hofbesitzers Friedrich Hasse geboren. Von meinem sechsten Lebensjahre an besuchte ich die Dorfschule meines Heimatortes, vom zehnten Lebensjahre das Realprogymnasium zu Alfeld, wo ich Ostern 1908 die Reife für die Obersekunda eines Realgymnasiums erhielt. Danach besuchte ich die Humboldtschule zu Linden und bekam daselbst Ostern 1911 das Reifezeugnis. Sommersemester 1911 studierte ich Medizin in Straßburg, im Winter 1911/12 in München. Das Physikum bestand ich Juli 1913 in Kiel. Von Ostern 1913 bis August 1914 studierte ich dann wieder in München. Im August 1914 wurde ich eingezogen, war seitdem als Feldunterarzt bzw. Feldhilfsarzt im Heeresdienst tätig. Von Mai 1918 ab setzte ich in Göttingen mein Studium fort. Am 16. Juni 1918 bestand ich vor der hiesigen Prüfungskommission das medizinische Staatsexamen.
