

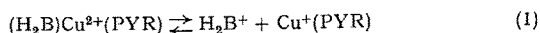
Brèves communications – Kurze Mitteilungen – Brevi comunicazioni – Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

Elektronenspinresonanzmessungen zur Untersuchung von Kinetik und Mechanismus von Cu^{2+} -katalysierten Reaktionen

In den letzten Jahren wurden in zunehmendem Masse Elektronenspinresonanzmessungen (ESR) zur Untersuchung der Wirkungsweise von kupferhaltigen Oxydasen herangezogen¹⁻³. Im Hinblick auf die Auswertung derartiger Messungen ist es von Interesse, an einfachen, chemisch gut kontrollierbaren Reaktionen zu prüfen, welche Aussagen über den Mechanismus solcher metallenzymatischer Oxydationen auf Grund von ESR-Messungen möglich sind⁴. In der vorliegenden Arbeit soll über ESR-Untersuchungen berichtet werden, die wir im Rahmen unserer Arbeiten über die Cu^{2+} -katalysierte Autoxydation von *o*-Phenylendiamin^{5,6} durchführten.

Die Autoxydation von *o*-Phenylendiamin (H_2B) in wässriger Lösung führt primär zu Radikalstufen H_2B^+ , die über verschiedene unbekannte Zwischenprodukte zum spektrophotometrisch gut erfassbaren Oxydationsprodukt 3,5-Dihydro-2-amino-3-iminophenazin (PHEN) weiterreagieren. Die Radikale H_2B^+ sind sehr instabil und können bei Zimmertemperatur mit ESR nicht nachgewiesen werden^{5,7}, so dass sie auch die Untersuchung des Cu^{2+} -Signals während der Oxydation nicht stören. Die Katalyse der Reaktion zwischen H_2B und O_2 durch Cu^{2+} -Komplexe mit verschiedenen heterocyclischen Basen als Liganden (z. B. Pyridin, 2-Picolin, 2,6-Lutidin, 2,4,6-Collidin, Imidazol), die wir im folgenden generell mit PYR bezeichnen, beruht auf dem durch die Reaktionsgleichungen (1) und (2) beschriebenen «Zweitaktmechanismus»⁸. Reaktion (1) läuft auch unter O_2 -Ausschluss ab, die Oxydation kommt aber schon nach kurzer Zeit zum Stillstand (Figur 1). Mit ESR konnten wir folgende Untersuchungen, die mit anderen Methoden nicht möglich waren, durchführen: Ermittlung der Stöchiometrie der Oxydation von H_2B zu PHEN durch Cu^{2+} (PYR); Messung des für den Gleichgewichtszustand zwischen (1) und (2) charakteristischen Wertes von $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{Cu}^+]$; Abhängigkeit der katalytischen Eigenschaften der Komplexe Cu^{2+} (PYR) von ihrem Vermögen, mit dem zu oxydierenden Substrat Koordinationsverbindungen der Form $(\text{H}_2\text{B})\text{Cu}^{2+}(\text{PYR})$ zu bilden.



Methodik. Wir untersuchten die Oxydation in der früher beschriebenen Apparatur⁵, die erlaubt, den zeitlichen Verlauf von $E_{415} = \epsilon_{415} \cdot [\text{PHEN}]$ automatisch aufzuzeichnen und während der Reaktion die äusseren Bedingungen konstant zu halten. Während des Reaktionsablaufs (Figur 1) entnehmen wir in bestimmten Zeitabständen Proben der Lösung, die wir sofort auf -150°C abkühlten und in denen wir anschliessend bei dieser Temperatur das ESR-Signal ermittelten. In der eingefrorenen Lösung ging die Oxydation nicht weiter. Die ESR-Messungen führten wir mit einem 3-cm-Varian V 4500 Spektrometer (100 Khz Magnetfeldmodulation, 6" Magnet) unter Verwendung der Varian Standard-Kühlvorrichtung durch. Die Lösungen wurden in Quarzröhrchen mit ca. 3 mm innerem Durchmesser untersucht. Die Be-

stimmung des g -Wertes erfolgte durch Vergleichsmessungen mit Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH, $g = 2,0036 \pm 0,0002$).

Ergebnisse. Nach früheren Arbeiten^{5,9} werden bei der Oxydation pro Molekül *o*-Phenylendiamin ($\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2$) 3 Redoxäquivalente verbraucht. Da die hier untersuchte Reaktion zu einem dimolekularen Endprodukt ($\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_4$) führt, ist ihre Stöchiometrie durch die Gleichungen (3) und (4) wiederzugeben. Wenn die Reaktionslösung unter O_2 -Ausschluss beobachtet wird, kann die Beziehung (3) experimentell überprüft werden: Aus der Extinktion E_{415} (Figur 1) wird mit Hilfe des bekannten Extinktionskoeffizienten ϵ_{415} die Konzentration an Oxydationsprodukt, (PHEN), ermittelt. Die gleichzeitig mit der Extinktionsmessung aufgenommenen ESR-Signale (Figur 2) erlauben die Bestimmung der $[\text{Cu}^{2+}]$ in der Lösung; denn die Cu^+ -Komplexe (d^{10}) geben keine paramagnetische Resonanz. Durch zweimalige Integration des von unserer Apparatur aufgezeichneten Signals¹⁰ erhalten wir eine Grösse, die der $[\text{Cu}^{2+}]$ in der Lösung proportional ist und mit dem Spektrum einer Lösung bekannter Konzentration verglichen werden kann. Die Genauigkeit dieser Cu^{2+} -Bestimmung ist ca. $\pm 5\%$, wenn Standard- und Messlösung dieselben Cu^{2+} -Verbindungen enthalten. Die Versuche zeigten, dass die Stöchiometrie der in unseren Lösungen verlaufenden Reaktion mit (3) übereinstimmt.

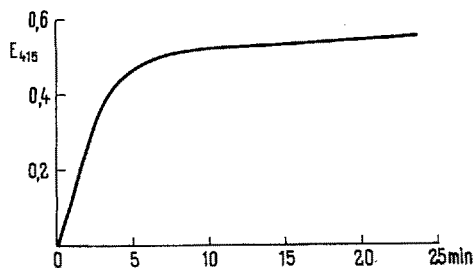
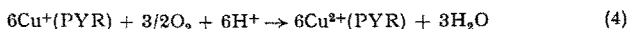
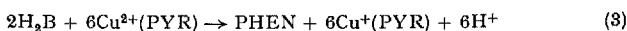


Fig. 1. Zeitlicher Verlauf der Extinktion $E_{415} = \epsilon_{415}[\text{PHEN}]$ in einer Reaktionslösung unter O_2 -Ausschluss. $[\text{Cu}^{2+}]_{\text{tot}} = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{M}$, $[\text{H}_2\text{B}]_{\text{tot}} = 10^{-3} \text{M}$, $[\text{Picolin}]_{\text{tot}} = 0,2 \text{M}$, $\text{pH} = 6,1$, $T = 25^\circ\text{C}$. (In O_2 -durchspülter Lösung geht die Reaktion weiter, bis alles H_2B oxydiert ist.)

¹ H. BEINERT et al., in *Enzyme Models and Enzyme Structure* (Brookhaven Symposia, 1962).

² B. G. MALMSTRÖM et al., *Nature* **183**, 321 (1959).

³ E. WALAAS et al., *Arch. Biochem. Biophys.* **100**, 97 (1963).

⁴ Währenddem ESR-Messungen in den letzten Jahren häufig zu Untersuchungen über Struktur und Bindungseigenschaften paramagnetischer Ionenkristalle herangezogen wurden, ist über die paramagnetische Resonanz wässriger Lösungen dieser Verbindungen noch wenig bekannt, vgl. z. B. S. A. ALTSCHULER und B. M. KOSYREW, *Paramagnetische Elektronenresonanz* (Leipzig 1963).

⁵ K. WÜTHRICH und S. FALLAB, *Helv. chim. Acta* **47**, 1440 (1964).

⁶ K. WÜTHRICH und S. FALLAB, *Helv. chim. Acta* **47**, 1609 (1964).

⁷ H. Y. LEE und R. N. ADAMS, *Analyt. Chem.* **34**, 1587 (1962).

⁸ S. FALLAB, *Z. naturw.-med. Grundlagenforschung* **1**, 333 (1963).

⁹ J. CIHALIK, *Chem. Listy* **49**, 1167 (1953).

Entsprechende $[\text{Cu}^{2+}]$ -Bestimmungen ergaben, dass der für das Gleichgewicht bei Reaktionsstillstand unter O_2 -Ausschluss (Figur 1) charakteristische Wert für $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{Cu}^+]$ von der Struktur und der Konzentration der Liganden PYR abhängig ist: mit zunehmender $[\text{PYR}]$ nimmt $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{Cu}^+]$ ab. Es ist zu erwarten, dass in O_2 -durchspülten Lösungen, in denen die Reaktionen (1) und (2) gleichzeitig ablaufen, ebenfalls ein Gleichgewichtszustand mit charakteristischem Verhältnis $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{Cu}^+]$ ausgebildet wird. Die ESR-Messungen zeigten, dass dieses Gleichgewicht auch bei hohen Ligandenkonzentrationen $[\text{PYR}]$ praktisch vollständig auf die Seite des Cu^{2+} verschoben ist. Die Gleichgewichtslage ist auch praktisch unabhängig davon, ob die Lösung mit Luft ($[\text{O}_2] = \text{ca. } 2,5 \cdot 10^{-4} M$) oder mit reinem Sauerstoff ($[\text{O}_2] = \text{ca. } 1,2 \cdot 10^{-3} M$) durchspült wird.

In Figur 3 sind die ESR-Signale wässriger Lösungen von Cu^{2+} -Komplexen mit *o*-Phenylendiamin, Pyridin, 2,4,6-Collidin und von Lösungen, die Cu^{2+} , H_2B und 2,4,6-Collidin enthalten, dargestellt. Die beobachtete Hyperfeinstruktur (HFS) ist auf die Wechselwirkung des ungepaarten Elektrons mit den magnetischen Momenten der Kerne, ^{63}Cu , ^{65}Cu ($I = 3/2$) und ^{14}N ($I = 1$), zurückzuführen¹¹. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Signalen (Figur 3 a–d) sind auf Grund von Arbeiten von McCONNELL¹², McGARVEY¹³ und russischen Autoren⁴ verständlich. Diese Arbeiten ergaben, dass die Linienbreite und damit die Auflösung der HFS der ESR-Signale wässriger Lösungen von Komplexen paramagnetischer Ionen von der Symmetrie und der Intensität des Ligandfeldes abhängig ist¹⁴.

Die Liganden PYR lassen sich auf Grund der unter gleichen Bedingungen ermittelten Geschwindigkeiten $d[\text{PHEN}]/dt$ in zwei Gruppen einteilen: In Lösungen, die Pyridin oder Imidazol enthalten, verläuft die Oxydation etwa um einen Faktor 5 langsamer als in solchen, die Picolin, Lutidin oder Collidin enthalten. Wir untersuchten

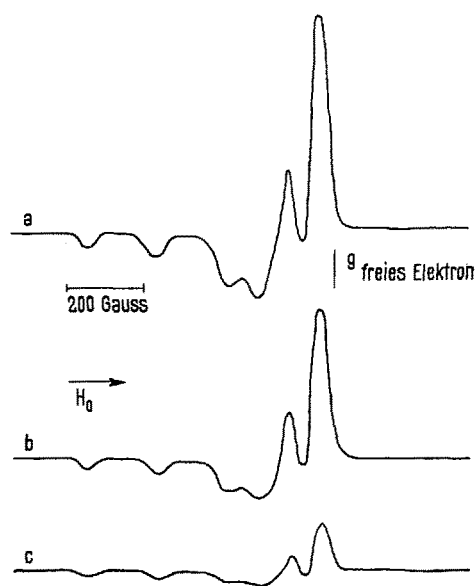


Fig. 2. ESR-Signale der Reaktionslösung unter O_2 -Ausschluss, aufgenommen bei -150°C . a, bei Reaktionsbeginn; b, nach etwa 2 min; c, bei Stillstand der Reaktion, etwa 30 min nach Reaktionsbeginn (vgl. Figur 1). $[\text{Cu}^{2+}]_{\text{tot}} = 2,5 \cdot 10^{-4} M$, $[\text{H}_2\text{B}]_{\text{tot}} = 10^{-3} M$, $[\text{Picolin}]_{\text{tot}} = 0,2 M$, $\text{pH} = 6,1$. (In O_2 -durchspülter Lösung ist während der Reaktion immer das Signal a zu beobachten.)

nun, wie das ESR-Signal von Lösungen der Cu^{2+} (PYR)-Komplexe durch Zugabe von *o*-Phenylendiamin ($[\text{H}_2\text{B}]$ wie bei den Oxydationsversuchen kleiner als $10^{-3} M$) beeinflusst wird, und fanden in den zwei Gruppen wiederum ein unterschiedliches Verhalten. Das Signal von Lösungen der Cu^{2+} -Komplexe mit Pyridin (Figur 3b) bzw. Imidazol wird durch Zugabe von H_2B nicht beeinflusst. Pyridin bzw. Imidazol werden demnach nur in sehr geringem Ausmass durch H_2B aus den Cu^{2+} -Komplexen verdrängt¹⁵. In den Reaktionslösungen liegen deshalb nur sehr kleine Konzentrationen an $\text{Cu}(\text{H}_2\text{B})^{2+}$ bzw. an Misch-

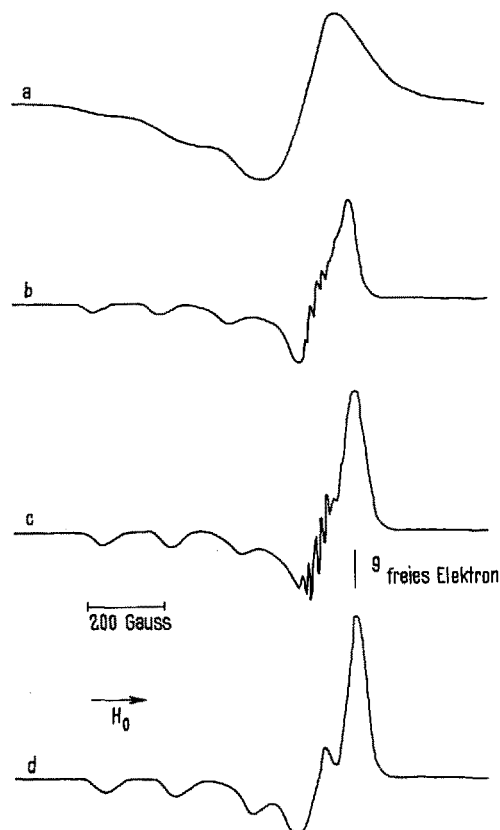


Fig. 3. ESR-Signale wässriger Lösungen von Cu^{2+} -Komplexen, aufgenommen bei -150°C . a, $[\text{Cu}^{2+}]_{\text{tot}} = 4 \cdot 10^{-4} M$, $[\text{H}_2\text{B}]_{\text{tot}} = 5 \cdot 10^{-3} M$, $\text{pH} = 5,50$; b, $[\text{Cu}^{2+}]_{\text{tot}} = 4 \cdot 10^{-4} M$, $[\text{Pyridin}]_{\text{tot}} = 0,2 M$, $\text{pH} = 5,35$; c, $[\text{Cu}^{2+}]_{\text{tot}} = 4 \cdot 10^{-4} M$, $[\text{Collidin}]_{\text{tot}} = 0,2 M$, $\text{pH} = 7,30$; d, $[\text{Cu}^{2+}]_{\text{tot}} = 4 \cdot 10^{-4} M$, $[\text{Collidin}]_{\text{tot}} = 0,2 M$, $[\text{H}_2\text{B}]_{\text{tot}} = 5 \cdot 10^{-3} M$, $\text{pH} = 7,30$.

¹⁰ Die Apparatur liefert als Signal die erste Ableitung der ESR-Absorptionsspektren.

¹¹ B. R. McGARVEY, *J. physic. Chem.* **60**, 71 (1956). – H. C. ALLEN et al., *J. Am. chem. Soc.* **86**, 1023 (1964). – S. E. HARRISON und J. M. ASSOUR, *J. chem. Phys.* **40**, 365 (1964).

¹² H. M. McCONNELL, *J. chem. Phys.* **25**, 709 (1956).

¹³ B. R. McGARVEY, *J. physic. Chem.* **61**, 1232 (1957).

¹⁴ Die Stabilitätskonstanten der $\text{Mn}(\text{II})$ -Pyridinkomplexe konnten auf Grund der Abhängigkeit der Linienbreite vom Komplexbildungsgrad mit ESR-Messungen bestimmt werden¹³. G. ATKINSON und J. E. BAUMAN, *Inorg. Chem.* **2**, 64 (1963).

¹⁵ Auf Grund von näherungsweise Berechnungen mit Hilfe der bekannten Komplexstabilitätskonstanten^{16,17} war zu erwarten, dass Pyridin und Imidazol bei den gewählten Konzentrationsverhältnissen durch H_2B nicht aus den Cu^{2+} -Komplexen verdrängt werden.

¹⁶ K. WÜTHRICH und S. FALLAB, *Chimia* **17**, 356 (1963).

¹⁷ C. J. HAWKINS und D. D. PERRIN, *J. chem. Soc.* **1962**, 1351.

komplexen $(H_2B)Cu^{2+}(PYR)$ vor. Die Signale der Lösungen von Komplexen mit den übrigen Liganden, 2-Picolin, 2,6-Lutidin und 2,4,6-Collidin (Figur 3c), werden dagegen durch Zugabe von H_2B stark verändert (Figur 3d), was darauf hinweist, dass in der innersten Koordinationssphäre des Cu^{2+} wesentliche Veränderungen eintreten. Die Liganden PYR werden hier teilweise durch H_2B aus den Komplexen verdrängt. Ein Vergleich mit Figur 3a zeigt, dass sicher nicht ausschliesslich Cu^{2+} -*o*-Phenylendiaminkomplexe gebildet werden. Das Signal Figur 3d dürfte demnach den Mischkomplexen $(H_2B)Cu^{2+}(Collidin)_p$ ($p = 1,2$) entsprechen. Die Oxydationsgeschwindigkeit $d[PHEN]/dt$ nimmt also bei Erhöhung der Konzentration an Mischkomplexen $(H_2B)Cu^{2+}(PYR)$ zu. Je grösser das Vermögen, solche Mischkomplexe zu bilden, umso grösser ist die katalytische Wirkung der Komplexe $Cu^{2+}(PYR)$. Dieser aus den ESR-Messungen folgende Zusammenhang zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit und der Komplexbildung des Substrats H_2B mit dem «aktiven Zentrum» des katalytisch wirksamen Komplexes steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen kinetischer Untersuchungen¹⁸.

Summary. Cu^{2+} -complexes with different monodentate ligands PYR, e.g. pyridine, 2,4,6-collidine and imi-

dazole, catalyse the oxidation of *o*-phenylenediamine (H_2B) to 3,5-dihydro-2-amino-3-iminophenazine (PHEN) by O_2 . Investigation of the electron paramagnetic resonance during reaction gives interesting details on the function of Cu^{2+} as a catalyser. The formation of mixed complexes $(H_2B)Cu^{2+}(PYR)$ and its influence on the reaction rate $d[PHEN]/dt$ is demonstrated. In the rate-determining reaction, Cu^{2+} is reduced to Cu^+ , which is reoxidized by O_2 . During reaction the ratio $[Cu^{2+}]/[Cu^+]$ is determined by means of e.p.r. measurements.

K. WÜTHRICH, H. LOELIGER
und S. FALLAB

*Institut für anorganische Chemie, Universität Basel und
Physiklabor der Ciba AG, Basel (Schweiz),
27. August 1964.*

¹⁸ Herr Prof. Dr. P. HUBER hat uns in entgegenkommender Weise die ESR-Apparatur zur Verfügung gestellt. Hierfür sei auch an dieser Stelle bestens gedankt.

Die Isolierung von Cortisol-21-sulfat aus dem Urin von Cushingpatienten vor und nach totaler Adrenalektomie

In einer früheren Untersuchung an einem Nebennierengesunden Mann konnte gezeigt werden, dass Cortisol-21-sulfat in geringen Mengen im Blut und im Urin nachzuweisen war¹. Das Verschwinden dieses Steroidkonjugates aus dem Urin während einer intravenösen Infusion von freiem Cortisol war überraschend und warf erneut die Frage nach den Bildungsarten von Cortisol-21-sulfat auf. Der Nachweis von Cortisol-21-sulfat im Urin total adrenaletomierter Cushingpatienten unter oraler Substitution mit freiem Cortisol, der im folgenden kurz dargestellt werden soll, lässt den Schluss zu, dass dieses Steroidderivat auch extraadrenal entsteht.

Material, Methodik und Resultate. Es standen drei Patienten zur Verfügung. Pat. No. 1: 32jähriger Mann. Totale Adrenalektomie 1962 wegen Cushingsyndrom. Pat. Nr. 2: 22jährige Frau. Ausgeprägtes Cushingsyndrom. Untersuchung vor und vier Wochen nach totaler Adrenalektomie im November 1963. Pat. Nr. 3: 30jährige Frau. Ausgeprägtes Cushingsyndrom. Untersuchung vor der Adrenalektomie. Es wurde jeweils ein kompletter 24-Stundenurin aufgearbeitet. Die Substitution der adrenaletomierten Patienten Nr. 1 und 2 bestand am Versuchstag in 200 mg Cortisol oral.

Die freien Steroide des Urins wurden durch Extraktion mit 3×300 ml Chloroform eliminiert. Anschliessend erfolgte eine Extraktion mit 2×1 Vol Äthylacetat:Butanol (3:1, v/v). Nach Einengen des Extraktes im Rotationsverdampfer wurde er im Vakuum unter einem Stickstoffstrom zur Trockne gebracht. Die erste Reinigung des Extraktes wurde mit Hilfe einer präparativen Papierchromatographie durchgeführt (Technik: Verteilen der Extraktmenge auf 10 bis 20 Bögen Schleicher &

Schüll Papier 2043 b in je 1 ml Äthylacetat:Butanol, 3:1. Bogenbreite 19 cm, Länge 42 cm. 15stündige Überlaufchromatographie im System S_1^2 , Cortisol-21-sulfat als Standard parallel laufend).

Nach Lokalisation des Standards mittels UV-Kontaktphoto und Methylenblaureaktion wurde die entsprechende Urinzone mit 20% Methanol eluiert. Nach Vereinigung dieser Eluate erfolgte eine zweite Reinigung durch die gleiche präparative Papierchromatographie wie oben beschrieben. Die Extrakte waren jedoch schon so rein, dass sie nur auf zwei bis drei grosse Bögen verteilt zu werden brauchten. Die in dieser Weise gereinigten Extrakte wurden in jeweils 0,15 ml Äthylacetat:Butanol (3:1, v/v) aufgenommen und erneut in System S_1 auf mehreren, 1,5 cm breiten Streifen chromatographiert (Laufzeit 13 h; Lokalisierung der Flecken mittels UV-Kontaktphoto und Methylenblau). Die R_f -Werte des Cortisol-21-sulfat-Standards und der unbekanntes Substanz aus dem Urin waren identisch (0,33). Nach Elution der Urinzone wurde eine weitere Papierchromatographie im System Butylacetat - Toluol - Butanol / $4n$ $NH_4 \cdot OH$ -Methanol (60:30:10/50:50, v/v)³ angeschlossen. Nach einer Laufzeit von 3 h betragen die R_f -Werte für den Standard 0,15, für die unbekanntes Substanz aus dem Urin 0,20. Beide zeigten eine positive Methylenblaureaktion und ein UV-Kontaktphotogramm. Nach Elution und Eindampfen der Extrakte wurden sie in jeweils 2 ml H_2O aufgenommen.

¹ J. TAMM und K. D. VOIGT, in PASQUALINI und JAYLE, *Structure and Metabolism of Corticosteroids* (Academic Press, London-New York 1964), p. 103.

² J. TAMM, K. D. VOIGT und U. VOLKWEIN, *Steroids* 2, 271 (1963).

³ J. R. PASQUALINI, R. ZELNIK und M. F. JAYLE, *Exper.* 16, 317 (1960).