

SUMMARY

The solvent effects of acetone and benzene in the proton resonance spectra of substituted benzene molecules can be divided into contributions from the individual substituents. These additive contributions are measured. There are departures from additivity in *ortho*-disubstituted benzene. The solvent effects thus measured can be used to predict solvent effects in mono- and polysubstituted benzene as long as there is negligible interaction between the substituents.

Solvent effects of acetone and benzene in *m*- and *p*-position of substituted benzene are proportional to HAMMETT-Parameters of the protons in question. In addition acetone solvent effects can be explained qualitatively by an inhomogenous electrostatic reactionfield.

Physikalisches Institut der
Universität Basel

68. Die Abhängigkeit der strahleninduzierten Formiatoxydation im System (Katalase-¹⁴C-Formiat) von verschiedenen Milieufaktoren¹⁾

von H. Aebi und J. P. Heiniger

(16. I. 62)

Ameisensäure wird aerob durch ionisierende Strahlen zu CO₂ oxydiert, und zwar – je nach Versuchsbedingungen – in einer Ausbeute von $G_{+CO_2} = 2,5 - 3,8$ (HART²⁾). Durch Zugabe kleiner Mengen von krist. Leber-Katalase gelingt es, die Strahlenausbeute (bei pH 6,8) auf einen G -Wert von $G_{+CO_2} = 5-6$ zu erhöhen. In Gegenwart dieses Enzyms setzt sich strahlengebildetes H₂O₂, das sich sonst anhäufen oder anderweitig reagieren würde, peroxydatisch mit (zusätzlichen) Ameisensäuremengen um. Wie in einer früheren Arbeit gezeigt worden ist, ergibt sich bei Verwendung von ¹⁴C-Formiat, ein für strahlenchemische Zwecke verwendbares Indikator-System³⁾. Sofern Enzym und H-Donor (= Ameisensäure) in Konzentrationen zugesetzt werden, die dem Sättigungswert nahekommen, dann besteht – jedenfalls bis zu 20000 r – direkte Proportionalität zwischen Strahlendosis und gebildeter ¹⁴CO₂-Menge.

Beim ¹⁴CO₂, das bei Bestrahlung des Systems Katalase + ¹⁴C-Formiat gebildet wird, muss auf Grund obiger Feststellungen zwischen einem nicht-enzymatisch und einem enzymatisch gebildeten Anteil unterschieden werden. Im Hinblick auf die praktische Anwendung, sowie auf die Interpretation ist nun von Interesse, in welchem Ausmass die Bildung beider Komponenten durch Milieufaktoren beeinflusst wird. Diese Frage soll für die folgenden Faktoren zu beantworten versucht werden: a) Art der Gasphase (O₂, N₂, N₂O), b) pH-Abhängigkeit, c) Einfluss der Temperatur und d) Effekte von Seiten inerter Zusätze, wie z. B. Proteine und Elektrolyte. Die gleichfalls untersuchten Deuterium-Isotopieeffekte sind zusammen mit den Versuchen in verschiedener Gasphase geeignet, weitere Anhaltspunkte über den Reaktionsmecha-

¹⁾ Über einen Teil der hier publizierten Versuche wurde anlässlich eines Symposiums über «Radiation effects and milieu» am 29. 5. 61 in Montreux berichtet.

²⁾ E. J. HART, J. Amer. chem. Soc. 76, 4312 (1954).

³⁾ H. AEBI, R. GRESSLY, R. OESTREICHER & A. ZUPPINGER, Helv. 42, 2531 (1959).

nismus dieser Umsetzung(en) zu liefern. Von strahlenchemischem Interesse sind andererseits die mit verschiedenen Strahlenquellen, variierteter Dosisleistung und mit kleinen Strahlendosen ausgeführten Experimente. Wie aus diesen methodischen Untersuchungen hervorgeht, hängt die von einer bestimmten Strahlendosis gebildete $^{14}\text{CO}_2$ -Menge von zahlreichen Milieufaktoren ab. Dabei werden enzymabhängige und nicht enzymatische Formiatoxydation oft recht unterschiedlich beeinflusst.

Der als Nachteil zu bewertenden Milieuabhängigkeit des Systems Katalase- ^{14}C -Formiat steht als Vorteil der Befund entgegen, dass sich dieses Verfahren zum Abfangen von strahlengebildetem sowie metabolisch entstandenem H_2O_2 in biologischen Objekten (z. B. Organhomogenate, Gewebsschnitte) sehr wohl eignet. Dabei erstreckt sich die Anwendbarkeit dieses Systems auf alle Objekte, in denen die Indikator-Reaktion – gleich wie in Lösung – durch das Angebot an H_2O_2 oder äquivalenter Produkte begrenzt wird⁴⁾. Es stellt sich nun die Frage, unter welchen Voraussetzungen ein Vergleich zwischen Vorgängen in einer definierten Lösung als Modell und denen in der lebenden Zelle überhaupt erlaubt ist. Zur Beantwortung gehört im vorliegenden Fall u. a. die Kenntnis derjenigen Einflüsse auf die $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung, mit denen in der Zelle zu rechnen ist. Sie abzuschätzen ist der Zweck dieser Modellversuche.

Experimenteller Teil

1. *Methodisches.* – a) *Versuchsanordnung* (Standard-Ansatz). Wir folgten dem früher ausführlich beschriebenen Verfahren (vgl. ³⁾). Die Zusammensetzung des Standard-Ansatzes war, sofern nicht anders angegeben, die folgende:

3,0 ml M/15 Phosphatpuffer pH 6,8;

0,4 ml 0,04M NaHCO_3 -Lösung als Träger;

0,4 ml 0,2M-Lösung von ^{14}C -Formiat (bezogen von Radiochemical Centre Amersham; verdünnt auf spezifische Aktivität von 2900 C/min/ μ Äq.);

0,4 ml Lösung von krist. Leberkatalase («BOEHRINGER»), enthaltend 400 γ /ml;

3,8 ml aq. dest. (ad 8,0 ml).

Zudem enthielt das Plastiknäpfchen, welches im Innern der zylindrischen Glasgefäße an einem Plexiglasbügel aufgehängt war, 0,3 ml 20-proz. NaOH zur Absorption des gebildeten $^{14}\text{CO}_2$. Das Procedere betreffend quantitative Austreibung der gebildeten $^{14}\text{CO}_2$ mittels 20-proz. Trichloressigsäure sowie Herstellung der messfertigen BaCO_3 -Plättchen entsprach gleichfalls der früher angegebenen Beschreibung. Zur Messung der ^{14}C -Aktivität stand ein fensterloser Durchflussszähler (FH 407/516) zur Verfügung.

b) *Versuche in verschiedener Gasphase.* Diese Experimente wurden nicht wie üblich in den zylindrischen Glasgefäßen mit Plexiglasdeckel ausgeführt, sondern in weithalsigen 25-ml-Rundkölbchen (Pyrex-Glas) mit Schliff. Dabei musste eine gewisse Streuung hinsichtlich Wanddicke in Kauf genommen werden. Die Gefäße enthielten im Innern des Halses eine Haltevorrichtung zur Befestigung von Laugen-Näpfchen. Um ein wiederholtes Evakuieren und Begasen zu ermöglichen, wurde den Kölbchen ein Schliffkegel mit Hahn und gebogenem Rohransatz aufgesetzt. Kölbchen und Näpfchen wurden mit denselben Mengen der oben beschriebenen (entgasten) Lösungen beschickt. Die vorbereiteten Gefäße wurden vor der Bestrahlung je 10mal auf ein Vakuum von ca. 0,7 Torr evakuiert und sodann mit dem entsprechenden Gas gefüllt. Das verwendete N_2 -Gas (CARBA AG; 99,99%) und N_2O -Gas (CARBA AG.; Reinheit nach Pharm. Helv. V.) wurde zur Gewährleistung anaerober Bedingungen vor dem Einfüllen durch 2 Waschflaschen enthaltend 15-proz. Pyrogallol in 50-proz. NaOH geleitet.

c) *Versuche mit Deuterio-Formiat bzw. schwerem Wasser.* Für den Vergleich zwischen $\text{H}^{14}\text{COONa}$ und $\text{D}^{14}\text{COONa}$ stand ein nach dem Verfahren von RACHELE & AEBI⁵⁾ dargestelltes Präparat mit echter, intramolekularer Doppelkettierung zur Verfügung ($\text{D-}^{14}\text{COONa}$). Die spezifische Aktivität war 6500 counts/min/ μ Äq.

⁴⁾ F. PORTWICH & H. AEBI, Helv. physiol. pharmacol. Acta 18, 312 (1960).

⁵⁾ J. R. RACHELE & H. AEBI, Arch. Biochemistry Biophysics 81, 63 (1959).

Um die Effekte in H_2O mit denen in möglichst reinem D_2O (99,8 At.-%) vergleichen zu können, mussten alle Zusätze zum Lösungsmittel in fester, möglichst wasserfreier Form erfolgen. Dies liess sich im Falle des ^{14}C -Formiats, des Phosphatpuffers und $NaHCO_3$ ohne weiteres realisieren. Als Katalasepräparat wurde die äquivalente Menge eines lyophilisierten Kohlehydrat-Enzymgemisches («Caperase» der Firma P.E.V.Y.A., Barcelona) verwendet (1,6 mg pro Ansatz).

d) *Bestrahlungsbedingungen und Strahlenquellen*⁶⁾. Für die Durchführung der Bestrahlungsversuche mit konventionellen Röntgenstrahlen stand ein Stabilvolt-Therapiegerät (MÜLLER-TUT-Röhre) des Röntgeninstituts der Universität, Inselspital Bern, zur Verfügung. Betriebsbedingungen für 100-kV-Bestrahlung: 13 mA, Filterung mit 2 mm Al, Dosisleistung ca. 150 r/min; Betriebsbedingungen für 250-kV-Bestrahlung: 13 mA, Filter: 0,35 mm Cu und 2 mm Al, Dosisleistung ca. 400 r/min.

Die Bestrahlungen mit 1,25 MeV erfolgten mit dem ^{60}Co -Gerät der Clinique Beaulieu, Genève; Dosisleistung ca. 30 r/min.

Bei den Versuchen mit dem 30-MeV-Betatron, Modell B.B.C. (Röntgeninstitut der Universität, Inselspital Bern) musste – als Ausnahme – mit horizontalem Strahleneinfall gearbeitet werden. Es wurden deshalb hier nicht Glasgefässe, sondern zylindrische Behälter aus Plexiglas ($d = 42$ mm), mit einer Wanddicke von 0,20 mm verwendet. Zur Herabsetzung der Streustrahlung befanden sich die Ansätze auf einem ca. 10 cm hohen Gestell aus Polyvinylchlorid. Die Dosisleistung war ca. 400 r/min. Die Bestimmung der Dosisleistung erfolgte konventionell mittels VICTOREEN-Kammer. Zur Eichung der verschiedenen Versuchsanordnungen diente in allen Fällen die strahlenchemische Fe^{II} -Oxydation («FRICKE-Dosimetrie»), wobei das gebildete Fe^{III} nach EGERTON⁷⁾ bestimmt wurde. Zum Ausgleich von Feldinhomogenitäten wurden alle Bestrahlungsansätze (6 pro Serie) wie üblich rotierend bewegt.

2. *Vergleich der $^{14}CO_2$ -Ausbeute in O_2 , N_2 und N_2O -Phase*. Wie aus den in Tabelle 1 wiedergegebenen Versuchen hervorgeht, ist das Ausmass der strahleninduzierten Formiatoxydation stark von der Art der Gasphase abhängig. Vergleicht man die $^{14}CO_2$ -Bildung in O_2 und in N_2 , so

Tabelle 1. *Einfluss der Gasphase auf die strahleninduzierte Formiatoxydation*

Die angeführten Resultate bedeuten μ Mol gebildetes $^{14}CO_2$ /Ansatz zu 8 ml und stellen die Mittelwerte aus je 4 Experimenten dar

Gasphase	Katalase (20 γ /ml)	Versuchsreihe		relativer Effekt	
		1 (ca. 10 000 r)	2 (ca. 8000 r)	Wirkung ohne Katalase = 100%	Wirkung in O_2 = 100%
N_2	—	0,38	—	—	115%
	+	0,36	—	95%	75%
O_2	—	0,33	0,24	—	—
	+	0,48	0,36	150%	—
N_2O	—	—	0,44 ⁵⁾	—	185%
	+	—	0,52	117%	144%

stellt man fest, dass Katalase unter aeroben Bedingungen stark steigert, anaerob dagegen eher hemmt: Der enzymatische Anteil der Formiatoxydation ist somit O_2 -abhängig, der nicht-enzymatische Anteil dagegen nicht. Die Differenz zwischen $^{14}CO_2$ -Bildung in O_2 und in N_2 -Phase (ca. 15%), wie sie sich ohne Enzymzusatz ergibt, stimmt mit den von HART⁸⁾ gegebenen Daten über die CO_2 -Bildung in bestrahlten, verdünnten Ameisensäurelösungen überein. Beim Übergang von Luft auf anaerobe Verhältnisse sinkt $G + H_2O_2$ auf 0 ab, wogegen $G + CO_2$ um 10–20% ansteigt. Die geringgradige Abnahme der $^{14}CO_2$ -Bildung in N_2 -Phase, welche durch Katalasezusatz

⁶⁾ Den Herren Prof. A. ZUPPINGER (Röntgeninstitut der Universität, Inselspital Bern) und Dr. PH. SARASIN (Clinique Beaulieu, Genève) sei für die Zurverfügungstellung der Bestrahlungsanlagen hiermit bestens gedankt.

⁷⁾ A. C. EGERTON, A. J. EVERETT, G. J. MINKOFF, S. RUDRAKANCHANA & K. C. SALOOJA, *Analyt. chim. Acta* 10, 422 (1954).

bewirkt wird, ist in ähnlichem Ausmass auch nach Zugabe inerter Proteine (Serumalbumin) zu beobachten. Es dürfte sich somit – wenigstens zum Teil – um einen unspezifischen Proteineffekt handeln.

Ersetzt man den Sauerstoff durch N_2O , wird bei sonst unveränderten Versuchsbedingungen wesentlich mehr $^{14}CO_2$ gebildet. Katalase bewirkt auch hier einen Mehrumsatz; er ist indessen wesentlich kleiner (+17% in N_2O ; +50% in O_2). In Gegenwart von N_2O ist die $^{14}CO_2$ -Menge, welche im System Katalase ^{14}C -Formiat durch eine bestimmte Strahlendosis gebildet wird, am grössten: Der entsprechende G_{+CO_2} -Wert, der in O_2 im Mittel 5,2 beträgt, steigt in N_2O -Phase auf 7 bis 8 an.

3. *Abhängigkeit vom pH.* Das Ergebnis einer Reihe bei verschiedenen pH ausgeführter Experimente ist in Fig. 1 dargestellt. Zum Zwecke der direkten Vergleichbarkeit sind alle Werte auf das Ausmass der $^{14}CO_2$ -Bildung bei pH = 6,8 ohne Katalasezusatz bezogen worden. Da bei

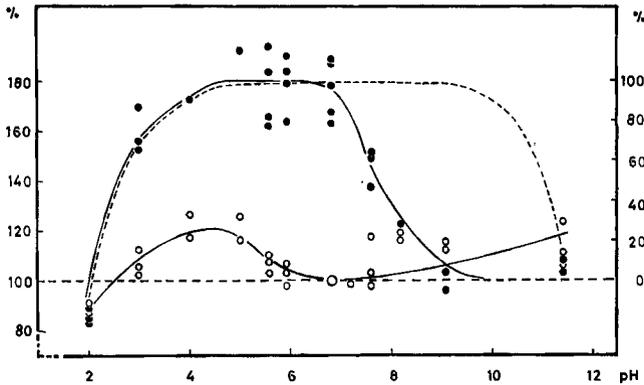


Fig. 1. *pH-Abhängigkeit der $^{14}CO_2$ -Bildung in bestrahlten Ansätzen enthaltend Katalase und ^{14}C -Ameisensäure bzw. ^{14}C -Formiat*

Ordinate links: Prozentuale $^{14}CO_2$ -Bildung; Ansätze von pH 6,8 ohne Katalase = 100%. Ordinate rechts: Durch Katalasezusatz bewirkter Mehrumsatz an $^{14}CO_2$; Effekt bei pH 6,8 = 100%

● Ansätze mit Katalase (20 γ /ml).

○ Ansätze ohne Katalase.

----- pH-Aktivitätskurve der Katalase (Skala rechts!) Bestimmung mittels Perborat-Methode von R. N. FEINSTEIN bei pH 6,8 nach Vorinkubierung der Ansätze beim betreffenden pH.

den verwendeten Phosphat-, Pyrophosphat- und Acetat-Puffergemischen keine spezifischen Anioneneffekte auftreten, geben die eingezeichneten Kurven ein direktes Bild von der pH-Abhängigkeit der beiden Anteile der strahleninduzierten Formiatoxydation. Nicht-enzymatisch gebildetes CO_2 findet sich über den gesamten untersuchten pH-Bereich, seine Menge ist im schwach sauren und im alkalischen pH-Bereich etwas grösser als bei pH 6,8. Die gleichzeitige Untersuchung der Enzymstabilität erlaubt weitere Aussagen über Verlauf und Begrenzung des enzymatisch gebildeten Anteils. Im sauren pH-Bereich verlaufen die Kurven für die katalatische Aktivität (Perboratspaltung!) und diejenige, welche die Wirkung auf die $^{14}CO_2$ -Bildung im Bestrahlungsversuch wiedergibt, völlig parallel. Im alkalischen Bereich verhalten sich dagegen die Wirkungen hinsichtlich H_2O_2 -Spaltung und Formiatoxydation ganz verschieden. Während die H_2O_2 -zerlegende Wirkung der Katalase unter den im Bestrahlungsexperiment herrschenden Bedingungen bis gegen pH 10 völlig erhalten bleibt, nimmt der Effekt auf die Formiatoxydation oberhalb pH 7 stetig ab und verschwindet bei pH 9 praktisch vollständig. Bei der Interpretation dieser scheinbaren Diskrepanz wird zu berücksichtigen sein, dass nur die freie Säure mit dem Katalase- H_2O_2 -Komplex in Reaktion tritt und dass die entsprechende Sättigungskurve bei pH 7 erst in einem Konzentrationsbereich von oberhalb 10 μM /ml Formiat ($\sim 10^{-3}$ μMol /ml freie Ameisensäure) abzufachen beginnt.

4. *Einfluss inerter Zusätze.* Die $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung im Standard-System kann durch eine Reihe von Zusätzen beeinflusst werden. Die in dieser Hinsicht vor allem interessierende Wirkung inerter Proteine ist am Beispiel von gereinigtem Human-Serumalbumin (Schweiz. Rotes Kreuz, Bern) untersucht worden. Wie zu erwarten, hat die Gegenwart grösserer Mengen dieses Proteins eine Verminderung der gesamten $^{14}\text{CO}_2$ -Ausbeute zur Folge. Das Ausmass der Formiatoxydation nimmt mit steigender Eiweisskonzentration stetig ab, und zwar ohne Katalasezusatz prozentual stärker (Tab. 2). Berechnet man nun den Mehrumsatz an $^{14}\text{CO}_2$, der durch die Gegenwart der Katalase verursacht wird, dann stellt man fest, dass der enzymatische Anteil der Formiatoxydation durch Proteinkonzentrationen bis zu 10% praktisch kaum beeinflusst wird (vgl. letzte Kolonne in Tabelle 2). Der nicht-enzymatische Anteil wird demgegenüber bereits durch ca. 3% Serumalbumin auf den halben Betrag herabgesetzt.

Da natives Serumalbumin eine freie SH-Gruppe pro Molekel enthält, die möglicherweise am Zustandekommen dieses Effektes beteiligt ist, haben wir auch eine Reihe von Thiolen und Disulfiden auf ihre Wirkung hin getestet. Wie erwähnt (vgl. ³), S. 2537 unten!) kommt bei diesen Substanzen ohnehin nur die Untersuchung der nichtenzymatischen Komponente in Frage. Diese wird durch Zusätze (2 $\mu\text{Mol/ml}$) in folgender Weise beeinflusst ($^{14}\text{CO}_2$ -Bildung des Kontroll-

Tabelle 2. *Effekt eines Zusatzes von Human-Serumalbumin auf die strahleninduzierte Formiatoxydation* (Strahlendosis ca. 8000 r, 250 kV)

Protein- konzentration in %	Katalase (20 γ/ml)	$^{14}\text{CO}_2$ -Bildung aus ^{14}C -Formiat in $\mu\text{Mol/Ansatz}$	Relativer Effekt		Mehrumsatz in Gegenwart von Katalase ($\Delta\mu\text{Mol/Ansatz}$)
			Wirkung ohne Eiweiss-Zusatz = 100%	Wirkung ohne Katalase = 100%	
0	—	0,22	—	—	—
	+	0,38	—	173%	0,16
2,5	—	0,12 ⁵	57%	—	—
	+	0,31	82%	246%	0,18 ⁵
5	—	0,08	36%	—	—
	+	0,26	68%	320%	0,18
10	—	0,05	23%	—	—
	+	0,20	53%	400%	0,15

ansatzes = 100%): Cysteamin und Cysteamin-N-Acetat 26%, Cystein 31%, AET 34%, Thio-glycolsäure 52%, Apresolin («CIBA») 68%, Cystamin und Cystamin-NN-Diacetat 75%, Cystein-säure 100%. Die weitgehende Unterdrückung der nicht-enzymatischen $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung aus ^{14}C -Formiat durch Proteine und Thiole dürfte als Ausdruck einer Konkurrenz um die primären Bestrahlungsprodukte zu bewerten sein.

Tabelle 3. *Deuterium-Isotopieeffekte bei der strahleninduzierten Formiatoxydation*
Strahlendosis ca. 15000 r; 250 kV. Mittelwerte aus je 3 Experimenten

Art des H-Donors bzw. (Lösungsmittel)	Katalase (20 γ/ml)	$^{14}\text{CO}_2$ -Bildung aus ^{14}C -Formiat in $\mu\text{Mol/Ansatz}$	Relativer Effekt		Mehrumsatz in Gegenwart von Katalase ($\Delta\mu\text{Mol/Ansatz}$)
			Ansatz mit $\text{HCOO}^-(\text{H}_2\text{O})$ = 100%	Wirkung ohne Katalasezusatz = 100%	
$\text{HCOO}^-(\text{H}_2\text{O})$	—	0,39	—	—	—
	+	0,62	—	159%	0,23
$\text{DCOO}^-(\text{H}_2\text{O})$	—	0,36	92%	—	—
	+	0,61	98%	170%	0,25
$\text{HCOO}^-(\text{H}_2\text{O})$	—	0,34	—	—	—
	+	0,57 ⁵	—	168%	0,23 ⁵
$\text{HCOO}^-(\text{D}_2\text{O})$	—	0,37	108%	—	—
	+	0,66	115%	178%	0,29

Im Gegensatz zu Proteinen und niedermolekularen S^{II}-Verbindungen beeinflussen Elektrolyte und (inerte) Anelektrolyte die ¹⁴CO₂-Bildung kaum. NaCl in einer Konzentration von 0,1–1M ist ohne sicheren Effekt, bei solchen von 2–3M (= 15–20mal isotonisch!) ist hingegen ein Mehrumsatz von ca. 20% zu beobachten. Wesentlich wirksamer sind Schwermetalle, speziell Fe^{II}-Ionen. So bewirken 0,2 μMol/ml Fe^{II}SO₄ eine Verdoppelung der ¹⁴CO₂-Bildung in Abwesenheit von Katalase, während der enzymabhängige Anteil gar nicht beeinflusst wird. Eisen(III)-sulfat in gleicher Konzentration ist ohne sicher fassbaren Effekt (+ 5%). Harnstoff ist bis 10⁻²M ohne Effekt und bewirkt erst in hoher Konzentration (0,2M = 30mal Konzentration im Blut) eine Verminderung um ca. 10%.

5. *Temperaturabhängigkeit.* Bei der Untersuchung des Systems Katalase-¹⁴C-Formiat in gefrorenem Zustand besteht eine Schwierigkeit darin, dass die Ausbeute an ¹⁴CO₂ von der Geschwindigkeit des Einfrierens (und Auftauens) abhängt. So ergeben sich bei langsamem Einfrieren mittels Eiskochsalzgemisch Werte, die im Vergleich zu rasch eingefrorenen Proben (Aceton-Trockeneis), ca. 25% geringer sind (Temperatur der Proben während der Bestrahlung je -3°). Aus Tabelle 4 ist ersichtlich, dass die ¹⁴CO₂-Ausbeuten bei -3° und +3° kaum differieren, sofern rasch eingefroren wird. Im Übrigen geht aus diesen Daten hervor, dass die nicht-enzymatische Oxydation nur sehr wenig, die enzymatische dagegen eher stark temperaturabhängig ist. Das durch letztere gebildete ¹⁴CO₂ macht unter den hier gewählten Versuchsbedingungen bei 20° 73%, bei -40° dagegen nur noch 5% des nicht-enzymatisch gebildeten ¹⁴CO₂ aus.

Tabelle 4. *Temperaturabhängigkeit der strahleninduzierten Formiatoxydation*
Strahlendosis ca. 8000 r; 250 kV. Die bei -3° und -40° bestrahlten Proben wurden in Aceton-CO₂ rasch eingefroren

Temperatur	Ansatz: Katalase (20 γ/ml)	¹⁴ CO ₂ -Bildung aus ¹⁴ C-Formiat in μ Mol/Ansatz	Relativer Effekt	
			Ausbeute bei 20° = 100%	Wirkung ohne Katalasezusatz = 100%
-40°	—	0,19	95%	—
	+	0,20	63%	105%
+20°	—	0,20	—	—
	+	0,32	—	160%
-3°	—	0,20	91%	—
	+	0,25	66%	125%
+3°	—	0,21 ⁸	98%	—
	+	0,27	71%	125%
+20°	—	0,22	—	—
	+	0,38	—	173%

6. *Deuterium-Isotopieeffekt.* Wird H¹⁴COONa durch D¹⁴COONa ersetzt, so kommt es zu einer nur geringgradigen Abnahme der ¹⁴CO₂-Bildung. Wie aus Tabelle 3 ersichtlich, betrifft diese Differenz vor allem die nicht-enzymatische Komponente. Der Befund, wonach bei der enzymatischen Komponente der Umsetzung kein Isotopie-Effekt besteht, passt zur Interpretation früherer Untersuchungen^{8,9}. Ein solcher ist nämlich nur dann zu erwarten, wenn die peroxydatische Formiatoxydation durch die Katalase-Konzentration und nicht (wie hier) durch das H₂O₂-Angebot begrenzt wird.

Verfolgt man die strahleninduzierte Formiatoxydation in D₂O, so resultiert eine deutliche Erhöhung der ¹⁴CO₂-Ausbeute, welche für den nicht-enzymatischen Anteil +9% und für den katalaseabhängigen +24% ausmacht (vgl. Tab. 3); ein Befund, der mit den bei der Radiolyse von D₂O gefundenen erhöhten Umsätzen in Einklang steht, z. B. G_{+H₂O₂} (in Luft) 1,17 bzw. G_{+D₂O₂} (in Luft) 1,24 = +6%¹⁰).

⁸) EVA FREI & H. AEBI, *Helv.* 41, 241 (1958).

⁹) H. AEBI, *Experientia Suppl.* 8, 40 (1960).

¹⁰) H. A. MAHLMAN & J. W. BOYLE, *J. Amer. chem. Soc.* 80, 773 (1958).

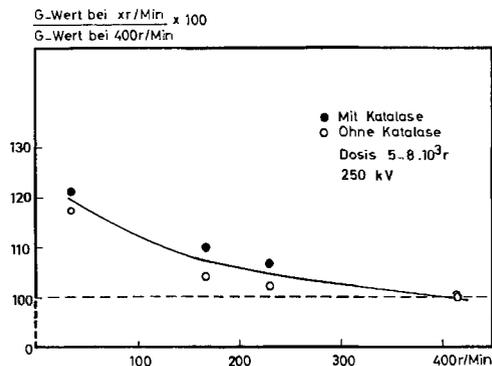


Fig. 2. $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung im System Katalase- ^{14}C -Formiat durch 250-kV-RÖNTGEN-Strahlen bei verschiedener Dosis-Leistung

Ordinate: Quotient aus $^{14}\text{CO}_2$ -Ausbeute bei der betreffenden Dosisleistung bezogen auf diejenige bei 400 r/min (= 100%). Dosis für 160–420 r/min 8000 r, für 35 r/min 5000 r. Messung der Strahlendosis mittels FRICKE-Dosimetrie. Zusammensetzung der Ansätze gemäss Standard-Vorschrift.

7. *Abhängigkeit der $^{14}\text{CO}_2$ -Ausbeute von der Bestrahlungsart.* Im Hinblick auf vergleichende Versuche mit verschiedenen Strahlenquellen interessiert zunächst die Abhängigkeit von der Dosisleistung. Wird diese im Falle der 250-kV-Bestrahlung zwischen 35 und 400 r/min variiert, ändert sich die durch eine bestimmte Strahlendosis produzierte $^{14}\text{CO}_2$ -Menge gemäss der in Fig. 2 dargestellten Kurve. Wie daraus zu entnehmen ist, kann der Zeitfaktor zwischen 150–400 r/min, wenigstens für die nicht-enzymatische Komponente, praktisch vernachlässigt werden. Es ergeben sich indessen bei einer Dosisleistung von 35 r/min G-Werte, die bezogen auf eine solche von 400 r/min, 21 bzw. 18% höher liegen. Dies trifft jedenfalls dann zu, wenn die Umsätze in den zur Kontrolle mitgeführten «FRICKE-Dosimetern» als Berechnungsgrundlage dienen (G-Wert für $250\text{ kV Fe}^{\text{II}} \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}} = 15,5$)¹¹).

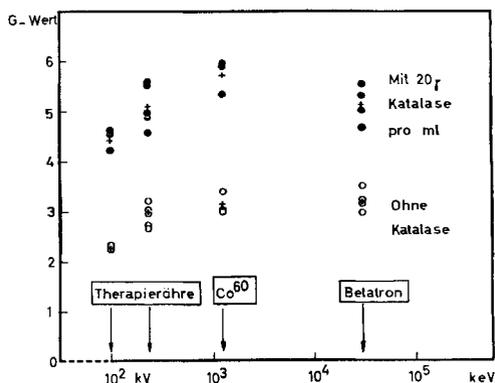


Fig. 3. Einfluss der Bestrahlungsart auf die $^{14}\text{CO}_2$ -Ausbeute im System Katalase- ^{14}C -Formiat
Ordinate: G-Wert ($\mu\text{ Mol } ^{14}\text{CO}_2/1000\text{ r/l}$)

- Ansätze mit Katalase (20 γ /ml)
- Ansätze ohne Katalase

Zur Standardisierung dienen die folgenden Eisenwerte (nach MINDER *et al.*¹¹): $G(\text{Fe}^{\text{II}} \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}})$ für 100 kV = 15,0, für 250 kV = 15,5, für 1,26 MeV = 16,0 und für 31 MeV = 16,3. Korrektur der 1,26-MeV-Werte (Dosis-Leistung 30 r/min!) gemäss Daten in Fig. 2.

¹¹ W. MINDER, H. J. MAURER & C. E. BUCHHEIM, RÖNTGEN-Fortschritte 92, 206 (1960); W. MINDER, Trans. IX. Int. Congress of Radiology, 1381 (1960).

Die Gegenüberstellung der mit verschiedenen Strahlenquellen erzielten Resultate lässt eine Abhängigkeit der $^{14}\text{CO}_2$ -Ausbeute vom Energiegehalt der Strahlung erkennen. Die in Fig. 3 wiedergegebenen Resultate für Röntgenstrahlen, ^{60}Co -Bestrahlung und Betatron zeigen, in welchem Ausmass die Formiatoxydation von der Strahlenqualität abhängt. Die Kurve für die nicht enzymatische $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung steigt erst deutlich und flacht dann ab, analog dem Eisenwert (FRICKE-Dosimetrie), jedoch etwas steiler verlaufend. Der enzymatische Anteil der Formiatoxydation zeigt keine sichere Abhängigkeit. Während der durchschnittliche Mehrumsatz bei 100 und 250 kV etwa gleich ist ($\Delta G = 2,16$ bzw. 2,25), ist er bei 1,26 MeV am grössten (2,59), bei 30 MeV dagegen kleiner (1,92). Gesamthaft ergibt sich daher im Standard-Ansatz bei 1,26 MeV die grösste Ausbeute (Mittel $G_{+\text{CO}_2} = 5,8$); dies selbst nach Vornahme einer entsprechenden Korrektur für die geringere Dosisleistung (vgl. Methodik). Setzt man dagegen die katalase-abhängige $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung in Beziehung zur nicht-enzymatischen, ergeben sich als Folge der ungleichen Abhängigkeit beider Komponenten folgende Verhältniszahlen: Der relative Mehrumsatz in Gegenwart von Katalase beträgt bei 100 kV +94%, bei 250 kV +77%, bei 1,26 MeV +82% und bei 30 MeV +60%. Der durch Katalase-Zusatz erzielbare Effekt zeigt somit mit steigender Härte der Strahlung abnehmende Tendenz.

Um Aufschluss über die Empfindlichkeit des Systems gegenüber kleinen Strahlendosen zu erhalten, sind Experimente mit ^{14}C -Formiat von höherer spezifischer Aktivität ausgeführt worden ($2,0 \cdot 10^4$ counts/min/ μ Äq.). Auf diese Weise lassen sich noch $^{14}\text{CO}_2$ -Mengen erfassen, wie sie bei Bestrahlung mit 50 r im Ansatz gebildet werden (vgl. ^{1,13}). Ein durch Katalase erzielbarer Mehrumsatz tritt dabei erst oberhalb 100 r auf. In Anbetracht dessen, dass strahlengebildetes H_2O_2 hierzu offenbar in einer Mindestkonzentration vorhanden sein muss, sei erwähnt, dass diese Dosis bei Annahme eines Wertes für $G_{+\text{H}_2\text{O}_2}$ von 3 einer H_2O_2 -Konzentration von $3 \cdot 10^{-7}$ molar entspricht.

Diskussion

Der Mechanismus der Formiatoxydation, wie sie sich bei der Bestrahlung (ohne Enzymzusatz) in verdünnter, wässriger Lösung abspielt, ist von HART^{2,13}) eingehend untersucht worden. Danach stellen die gemessenen Umsätze die Resultante einer Reihe miteinander im Gleichgewicht bzw. in Konkurrenz stehender Reaktionen dar. Im wesentlichen folgt die Oxydation der Ameisensäure der Brutto-Gleichung: $\text{HCOOH} + \text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{CO}_2$, wobei jedoch die anaerobe Spaltung in H_2 und CO_2 selbst durch $10^{-2\text{M}}$ O_2 (Luft) nicht völlig unterdrückt wird. Wie aus der in Tab. 5 gegebenen Übersicht zu entnehmen ist, verläuft die Oxydation *via* $\cdot\text{COOH}$ -Radikale in 2 Stufen. Dabei reagieren HCOOH und $\cdot\text{COOH}$ auf verschiedenartige Weise mit den bei der Radiolyse des Wassers gebildeten Produkten, speziell mit $\text{H}\cdot$, $\text{OH}\cdot$ und $\text{HO}_2\cdot$ -Radikalen, sowie mit H_2O_2 . Die wechselseitige Konkurrenz aller gelösten Stoffe um die Radikale macht verständlich, weshalb Proteine und Thiolverbindungen als typische Radikalfänger den nicht-enzymatischen Anteil der $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung stark herabzusetzen vermögen. Andererseits hat die Gegenwart von Stoffen, welche Rückreaktionen unterdrücken und damit das Gleichgewicht zugunsten der Vorwärtsreaktionen verschieben, eine Erhöhung der nicht-enzymatischen $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung zur Folge (z.B. Fe^{II} -Ionen, N_2O als Gasphase).

Da die H_2O_2 -bildenden Reaktionen unter aeroben Bedingungen die H_2O_2 -verbrauchenden überwiegen, wird bei Abwesenheit von Katalase H_2O_2 angehäuft. Durch Zusatz geringer Katalasemengen wird dies verhindert, indem H_2O_2 durch dieses Enzym entweder (katalatisch) in H_2O & $\frac{1}{2}\text{O}_2$ zerlegt wird, oder sich als Katalase-

¹²) T. J. HARDWICK & W. S. GUENTNER, J. physic. Chemistry 63, 896 (1959).

¹³) A. J. SWALLOW; Radiation Chemistry of Organic Compounds (S. 113–116), Pergamon Press, N. Y. 1960; E. J. HART, J. Amer. chem. Soc. 73, 68 (1951); 74, 4174 (1952); 76, 4198 (1954); J. physic. Chemistry 56, 594 (1952).

H_2O_2 -Komplex mit Ameisensäure peroxydatisch umgesetzt. Dieser Mehrumsatz stellt gleichsam die enzymatische Komponente der strahlenbedingten Formiatoxydation dar. Eine Trennung der $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung in 2 Anteile ist theoretisch nur dann gerechtfertigt, wenn sich das H_2O_2 unabhängig von den zu seiner Bildung führenden Radikalreaktionen weiter umsetzt. Es ist indessen möglich, dass das Bestehen dieser Abfangreaktion eine Verschiebung weiterer Gleichgewichte, an denen H_2O_2 beteiligt ist, nach

Tabelle 5. Übersicht über die bei Bestrahlung von Ameisensäure bzw. Formiat (und Katalase) in Betracht kommenden Umsetzungen

$\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H} + \text{OH}$	$(\text{H}_2\text{O} \rightarrow \frac{1}{2}\text{H}_2 + \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}_2)$	$\text{H} + \text{OH} \rightarrow \text{H}_2\text{O}$	1a-c
$\text{HCOOH} + \text{H} \rightarrow \cdot\text{COOH} + \text{H}_2$			2
$\text{H} + \text{O}_2 \rightarrow \text{HO}_2$			3
$\text{H} + \boxed{\text{H}_2\text{O}_2} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{OH}$			4
$(\text{H} + \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2 + \text{OH})$			5
		$\frac{1}{2} \boxed{\text{H}_2\text{O}_2} + \text{O}_2$	6
$\text{HCOOH} + \text{OH} \rightarrow \cdot\text{COOH} + \text{H}_2\text{O}$			7
$\text{OH} + \text{H}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{H}$			8
$\text{OH} + \boxed{\text{H}_2\text{O}_2} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{HO}_2$			9
$(\text{OH} + \text{OH} \rightarrow \boxed{\text{H}_2\text{O}_2})$			10
$\cdot\text{COOH} + \text{O}_2 \rightarrow \text{HO}_2 + \text{CO}_2$			11
$\cdot\text{COOH} + \boxed{\text{H}_2\text{O}_2} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 + \text{OH}$			12
$\cdot\text{COOH} + \cdot\text{COOH} \rightarrow \text{HCOOH} + \text{CO}_2$			13
$\cdot\text{COOH} + \text{HO}_2 \rightarrow \boxed{\text{H}_2\text{O}_2} + \text{CO}_2$			14
$\text{HCOOH} + \text{E} \cdot \boxed{\text{H}_2\text{O}_2} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 + \text{E}$			15
$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{E} \cdot \boxed{\text{H}_2\text{O}_2} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 + \text{E}$			16

sich zieht (z. B. Konkurrenz zwischen den Reaktionen 2 & 4, oder 7 & 9). Für praktische Zwecke erscheint die getrennte Betrachtung des durch Subtraktion errechneten «enzymatischen Anteils» jedenfalls angezeigt. Die Grösse des durch Katalasezusatz erreichten Mehrumsatzes an $^{14}\text{CO}_2$ entspricht zwar nicht ganz der Gesamtmenge an strahlengebildetem H_2O_2 , weil nach Reaktion 16 (evtl. auch 4, 9 und 12) reagierendes H_2O_2 nicht erfasst wird. Je nach Methodik werden bei 250-kV-Bestrahlung und 20 γ Katalase/ml nur 50–80% des H_2O_2 nach Reaktion 15 umgesetzt (vgl. 8)). Der hier für 250-kV-Bestrahlung im Mittel gefundene G-Wert für den enzymatischen Anteil der $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung ($\Delta G = 2,2$) macht vergleichsweise 71% des theoretischen Wertes ($G_{+\text{H}_2\text{O}_2, \text{total}}$) von 3,1 aus.

Dass der enzymatische Anteil tatsächlich auf der Produktion von H_2O_2 beruht, geht aus der Notwendigkeit der Gegenwart von aktivem Enzym, sowie aus der O_2 -Abhängigkeit hervor. Da in N_2 -Atmosphäre die Reaktionen 3, 11 & 14 ausfallen, wird kein H_2O_2 mehr gebildet; somit entfallen auch die Reaktionen 15 & 16. Der nicht-enzymatische Anteil läuft im gesamten pH-Bereich in etwa gleicher Ausbeute und nach demselben Mechanismus ab; der enzymatische Anteil wird dagegen im sauren Bereich durch die pH-Aktivitäts- bzw. Stabilitätskurve der Katalase und im

alkalischen Bereich durch die H-Donor-Konzentration (= freie Ameisensäure) begrenzt. Von praktischer Bedeutung ist schliesslich der Befund, dass die enzymatische Komponente von der Proteinkonzentration im Milieu nahezu unabhängig ist. In bestrahlten Objekten biologischer Herkunft dürfte daher das aus ^{14}C -Formiat gebildete $^{14}\text{CO}_2$ zum überwiegenden Teil auf enzymatisch umgesetztes H_2O_2 zurückzuführen sein. Dies ist deshalb für die in der Zelle herrschenden Bedingungen anzunehmen, weil die bei der Radiolyse des Wassers entstehenden Radikale vor allem mit den in grosser Überzahl vorhandenen Cytoplasmabestandteilen reagieren und sich daher nur zum kleinsten Teil mit ^{14}C -Formiat umsetzen. Dagegen ist das gleichzeitig entstandene H_2O_2 infolge seiner grösseren Stabilität bzw. Reichweite sehr wohl in der Lage, zu den Katalasemolekeln hin zu gelangen und sich dort zum überwiegenden Teil mit HCOOH peroxydatisch umzusetzen. Auf die sich hierbei ergebenden Fragen ist bereits im Rahmen einer Untersuchung über die metabolische H_2O_2 -Bildung eingegangen worden⁴⁾.

Von den Faktoren, welche die Strahlenausbeute beeinflussen, interessiert vor allem der Befund, dass es in N_2O -Phase zu einer beträchtlichen Steigerung der $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung kommt. Obgleich keine Angaben über die Art der für diesen Effekt verantwortlichen Umsetzungen gemacht werden können, ist man versucht, eine Parallele zu den von DAINTON¹⁴⁾ mitgeteilten Beobachtungen zu ziehen. Danach wäre diese Wirkung auf die Umsetzung von H-Radikalen mit N_2O , gemäss Reaktion 5 zurückzuführen. Es ist wahrscheinlich, dass diese Abfangreaktion andere Umsetzungsarten der H-Radikale (inkl. Rückreaktion) unterdrückt und dafür eine äquivalente Menge OH-Radikale liefert. Dass es auch in N_2O zur Bildung von H_2O_2 kommt (durch Rekombination überschüssiger OH?), geht aus dem Vorhandensein eines enzymabhängigen Anteils der $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung hervor. Damit ist aber auch die Möglichkeit gegeben, dass sich die COOH-Radikale neben Reaktion 13 auch nach Reaktion 12 weiter umsetzen. Ob die COOH-Radikale nicht auch mit N_2O direkt zu reagieren vermögen, bleibt abzuklären. Denkbar wäre z. B. die Umsetzung: $\text{N}_2\text{O} + \cdot\text{COOH} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{N}_2 + \text{OH}\cdot$. Gesamthaft bewirkt dieser veränderte Reaktionsablauf in N_2O eine Erhöhung der $^{14}\text{CO}_2$ -Ausbeute gegenüber Luft bzw. O_2 um + 85 bzw. + 44%. Der mit Katalasezusatz in N_2O bestimmte $G_{+ \text{CO}_2}$ -Wert von 7–8 dürfte eher zu niedrig sein, da die enzymatische Überführung des strahlengebildeten H_2O_2 in $^{14}\text{CO}_2$ vermutlich auch in N_2O nicht quantitativ verläuft. Der durch Katalase erzielte Mehrumsatz an $^{14}\text{CO}_2$ bzw. H_2O_2 ist in N_2O etwa halb so gross wie in O_2 . Während das in Gegenwart von O_2 gebildete H_2O_2 vor allem *via* Reaktionen 3 und 6 entstehen wird, kommen in N_2O hierfür eigentlich nur Reaktionen 5 und 10 in Frage. Ob das bei der FRICKE-Dosimetrie zu beobachtende gleiche Verhältnis der Ausbeuten ($G_{\text{Fr}^{e+}}$ in $\text{N}_2\text{O} \sim 8$, in $\text{O}_2 \sim 16$)¹⁴⁾ mehr als nur eine zahlenmässige Analogie bedeutet, sei dahingestellt.

Das als $^{14}\text{CO}_2$ -Mehrumsatz erfasste strahlengebildete H_2O_2 zeigt, im Gegensatz zur nicht-enzymatischen Formiatoxydation, praktisch keine Abhängigkeit vom Energiegehalt der Strahlung (100 kV – 30 MeV; vgl. Fig. 3). Die enzymatische Komponente verschwindet erst, wenn z. B. Strahlen ohne ionisierende Wirkung (UV.-Bestrahlung mit Hg-Lampe) zur Anwendung gelangen. Eine geringgradige Abhängigkeit beider

¹⁴⁾ F. S. DAINTON & D. B. PETERSON, *Nature* 186, 878 (1960).

Komponenten besteht hingegen von der Dosisleistung, und zwar in etwa gleichem Ausmass, wie dies aus den Versuchen Nr. 4–7 und 17–20 in Tabelle 1 von HART²⁾ hervorgeht. Das Bestehen eines Zeitfaktors weist daraufhin, dass sich je nach Bildungsrate bzw. stationärer Konzentration an primären Reaktionsprodukten das Gleichgewicht zwischen den verschiedenen sekundären Umsetzungen etwas verschiebt. Schliesslich stellt sich die Frage, weshalb ein ¹⁴CO₂-Mehrumsatz in Gegenwart von Katalase erst bei Dosen ab 100 r, d. h. bei einer H₂O₂-Anhäufung von ca. 3·10⁻⁷M, feststellbar ist. Dies ist vermutlich auf die Resultantennatur dieses Effektes zurückzuführen, indem bei kleineren Dosen die unspezifische Hemmwirkung als Protein (wie sie bei den Versuchen in N₂ zum Ausdruck kommt) über die Wirkung als Peroxydase überwiegt.

Die Ausführung dieser Untersuchungen erfolgte mit Unterstützung der KOMMISSION FÜR ATOMWISSENSCHAFT DES SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS. Den Herren Prof. W. MINDER (Bern) und Prof. F. S. DAINTON (Leeds) danken wir für wertvolle Ratschläge.

SUMMARY

1. Radiation induced ¹⁴C-formate oxidation has been studied under a variety of experimental conditions. Since the ¹⁴CO₂-yield can be increased by traces of catalase, an enzymatic and a non-enzymatic component may be distinguished.

2. Either component of ¹⁴CO₂-formation is influenced by temperature, pH, gas-phase, effectors and irradiation techniques in a different manner.

3. Highest yields are observed in N₂O-phase ($G_{+CO_2} = 7-8$). Whereas an increasing effect of catalase is observed in O₂ and N₂O, there is none in N₂. A small but distinct dose-rate dependency exists between 35 and 400 r/min (250 kV X-rays).

Medizinisch-chemisches Institut
der Universität Bern

69. Stoffwechselprodukte von Actinomyceten

34. Mitteilung¹⁾

Ferrioxamin G

von W. Keller-Schierlein und V. Prelog

(16. I. 62)

Bei der Herstellung grösserer Mengen von Ferrioxamin B wurde eine Nebenfraktion erhalten, die sich papierchromatographisch ähnlich dem reinen Ferrioxamin B verhielt, sich aber bei nochmaliger Ionenaustauscher-Chromatographie²⁾ in zwei Komponenten auftrennen liess. Die schwerer eluierbare davon erwies sich tatsächlich als identisch mit Ferrioxamin B, die leichter eluierbare stellte dagegen ein bisher nicht beschriebenes Sideramin³⁾ dar, das wir Ferrioxamin G benannten. Dieses unter

¹⁾ 33. Mitt.: Helv. 45, 138 (1962).

²⁾ H. BICKEL, R. BOSSHARDT, E. GÄUMANN, P. REUSSER, E. VISCHER, W. VOSER, A. WETTSTEIN & H. ZÄHNER, Helv. 43, 2118 (1960).

³⁾ H. BICKEL, E. GÄUMANN, W. KELLER-SCHIERLEIN, V. PRELOG, E. VISCHER, A. WETTSTEIN & H. ZÄHNER, Experientia 16, 129 (1960).