

- [14] F. C. MCKAY & N. F. ALBERTSON, J. Amer. chem. Soc. *79*, 4686 (1957); G. W. ANDERSON & A. C. MCGREGOR, *ibid.* *79*, 6180 (1957).
- [15] R. HUISGEN, H. BRADE, H. WALZ & I. GLOGGER, Chem. Ber. *90*, 1437 (1957).
- [16] Vgl. z. B. L. J. BELLAMY, *The Infra-red Spectra of Complex Molecules*, Methuen, London 1959.
- [17] R. SCHWYZER, unpublizierte Versuche.
- [18] I. GRÄNACHER, Helv. phys. Acta *34*, 272 (1961); E. A. ALLAN & L. W. REEVES, J. physical Chemistry *66*, 613 (1962).
- [19] J. N. SCHOOLERY in [21].
- [20] C. FRANCONI, Z. Elektrochem. *65*, 645 (1961).
- [21] J. D. ROBERTS, Nuclear Magnetic Resonance, McGraw-Hill, New York N. Y. 1959.
- [22] A. HVIDT & K. LINDERSTRØM-LANG, Biochim. biophys. Acta *14*, 574 (1954) und spätere Arbeiten.
- [23] M. KARPLUS, J. chem. Physics *30*, 11 (1959); C. D. JARDETZKY, J. Amer. chem. Soc. *84*, 62 (1962).
- [24] J. C. SHEEHAN & G. P. HESS, J. Amer. chem. Soc. *77*, 1067 (1955).
- [25] H. N. RYDON & P. W. G. SMITH, J. chem. Soc. *1956*, 3642.
- [26] B. ISELIN & R. SCHWYZER, Helv. *43*, 1760 (1960).
- [27] B. ISELIN, W. RITTEL, P. SIEBER & R. SCHWYZER, Helv. *40*, 373 (1957).
- [28] D. F. ELLIOTT & D. W. RUSSELL, Biochem. J. *66*, 49P (1957); M. ROTHE & F. W. KUNITZ, Liebigs Ann. Chem. *609*, 88 (1957).
- [29] R. SCHWYZER, B. ISELIN & M. FEURER, Helv. *38*, 69 (1955).
- [30] a) N. C. DAVIS & E. L. SMITH, J. biol. Chemistry *200*, 373 (1953); b) S. SIMMONDS & J. S. FRUTON, *ibid.* *174*, 705 (1948).
- [31] R. SCHWYZER & P. SIEBER, Helv. *40*, 624 (1957).
- [32] R. B. WOODWARD & R. A. OLOFSON, J. Amer. chem. Soc. *83*, 1007 (1961); R. B. WOODWARD, R. A. OLOFSON & H. MAYER, *ibid.* 1010.
- [33] A. WISHNIA & M. SAUNDERS, J. Amer. chem. Soc. *84*, 4235 (1962).

55. Flavosemichinon-Metallchelate: Modelle zur Erklärung der «active site» in den mitochondrialen Flavoenzymen

Zum Verhalten des Riboflavins gegen Metallionen III [1]¹⁾

von P. Hemmerich

(19. XII. 63)

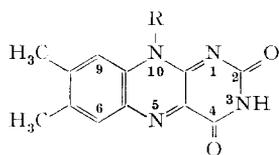
In vorangehenden Arbeiten [2] wurde gezeigt, dass in verdünnter wässriger O₂-freier Lösung keine Wechselwirkung des Isoalloxazin-(Flavin)-Systems, d.h. der prosthetischen Gruppe der Flavoenzyme, mit zweiwertigen Metallionen – ausgenommen Hg²⁺ – feststellbar ist. Eine auffallend starke Affinität besteht jedoch beim Ag⁺, welches mit Flavinen intensiv rote 1:1-Chelate oxinat-analoger Struktur auszubilden vermag. Deren Stabilität, welche mit $\log K_{\text{FlAg}}^{\text{Ag}} \cong 8$ um mindestens fünf Zehnerpotenzen grösser gefunden wurde als diejenige des (nicht mehr messbaren) Cu^{II}-Analogen, wurde auf einen Metall-Ligand-Ladungstransfer zurückgeführt, bei welchem ein Elektron aus einem gefüllten d_e -Orbital des d^{10} -Ions in das energieärmste π^* -Orbital²⁾ des Akzeptorliganden delokalisiert ist.

¹⁾ Die Ziffern in eckigen Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis, Seite 475.

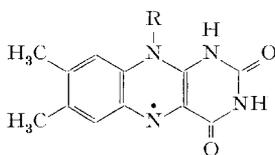
²⁾ Zur Elektroaffinität des Flavochinons vgl. KARREMAN [3].

Daraus waren zwei Schlüsse zu ziehen:

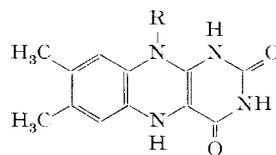
1. Die oxydierte Stufe des Flavins (FIH, «Flavochinon») hat offenbar eine *spezifische* Affinität zu Donor-Metallionen. Es musste sich also, unter geeigneten Bedingungen, eine Wechselwirkung mit allen diesen Metallionen feststellen lassen, also mit Ag^+ , Cu^+ , Au^+ , Hg_2^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{2+} , MoO_3^{3+} . Tatsächlich konnten wir inzwischen mit allen diesen Ionen – allerdings grossenteils nur in wasserfreiem oder wasserarmem Milieu – Flavinkomplexe in Lösung nachweisen und analysieren [4].



«Flavochinon» (FIH)



«Flavosemichinon» (FIH₂)



Leukoflavin (FIH₃)

2. Die um ein Elektron reichere Radikalstufe des Flavins (FIH₂, «Flavosemichinon») musste hingegen normale Affinität zu allen *d*-Metallionen zeigen. Der pH-metrisch geführte Nachweis, dass dies zutrifft, ist Inhalt dieser Arbeit: Man findet bei der pH-Titration unter O₂-Ausschluss einer zu 50% oxydierten Lösung des Leukoflavins (FIH₃) bei pH ≥ 6 eine starke Aufhellung von oliv nach hellgelb, welche auf das Verschwinden des freien Semichinons FIH₂ hindeutet [4]. Die Rechnung (siehe unten) macht verständlich, warum sich das Gleichgewicht $2 \text{FIH}_2 \rightleftharpoons \text{FIH} + \text{FIH}_3$ im physiologischen pH-Bereich mit steigendem pH stetig nach rechts verschiebt (Fig. 1).

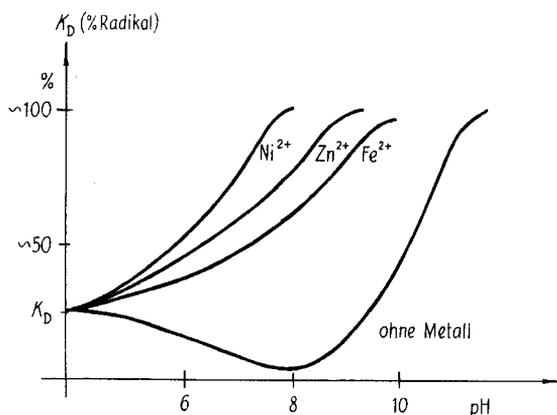


Fig. 1. Schematische Darstellung der pH-Abhängigkeit der Flavosemichinon-Disproportionierung

Titriert man das System unter H₂ in Gegenwart von Pd/SiO₂, also *in vollständig reduziertem Zustand*, so findet man gegenüber der Semichinontitration nur die *Menge* der Säure von $\text{pK}_a = 7 \pm 0,5$ erhöht, nicht aber die Lage des Puffergebiets verändert. Freisetzung von H⁺ oder Farbänderungen durch zugegebene Schwermetallionen (Me²⁺) treten dann unterhalb des Me²⁺-Hydrolysenbereiches nicht auf. *Dem Leukoflavin kommt somit keine messbare Metallaffinität zu.*

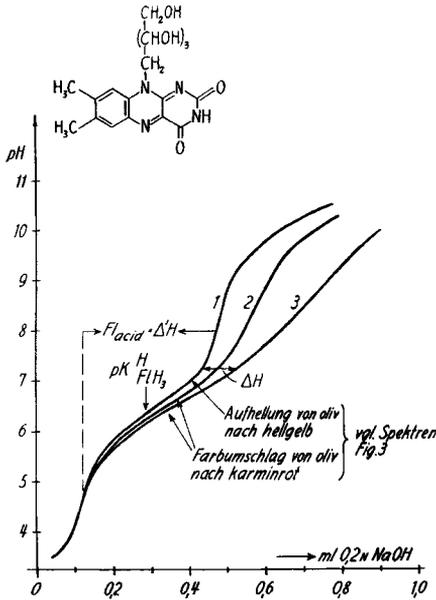


Fig. 2. BJERRUM-Titrationen des Flavosemichinons

je 40 ml $4 \cdot 10^{-3} M$ Lösung ($= 1,6 \cdot 10^{-4}$ Mol) in 50-proz. EtOH, 50% red., $10^{-3} N$ an $HClO_4$ und $0,1 N$ an $NaClO_4$, titriert bei 50° unter N_2
 1 ohne Metall
 2 + 0,3 ml $0,05 M Ni^{2+}$
 3 + 0,8 ml $0,05 M Ni^{2+}$

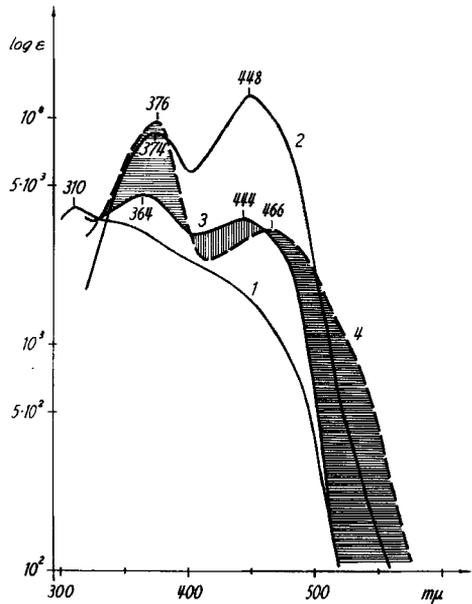
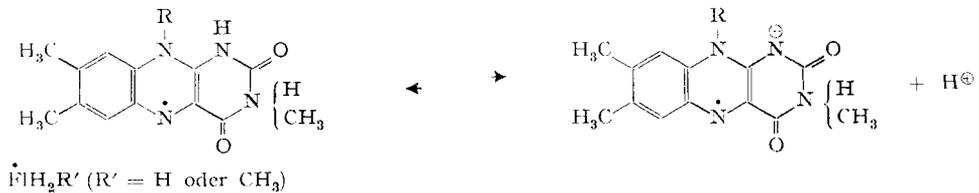


Fig. 3. Autoxydation von kat. hydriertem FAD, $10^{-4} M$ in $0,1 N N$ -Methylmorpholinpuffer $pH 8,0$. Lumiflavin-3-essigsäure gibt ein identisches Bild.

- 1 total reduziert } $Ni^{2+} 10^{-2} M$ hat keinen Einfluss
- 2 total reoxydiert }
- 3 partiell reoxydiert
- 4 partiell reoxydiert in Gegenwart von $10^{-2} M Ni^{2+}$

Anders bei der (O_2 -freien) Titration des halbreduzierten Systems in Gegenwart von Me^{2+} : Es tritt hier nicht Aufhellung ein, sondern Farbumschlag von oliv nach tiefrot; gleichzeitig werden zusätzliche Protonen frei (Fig. 2 und 3). Lässt man O_2 Zutreten, so schlägt die rote Farbe momentan in das Gelb des Flavinchromophors um. Zugleich treten $Me(OH)_2$ -Fällungen auf, die O_2 -Reaktion ist daher irreversibel.

Ersetzt man im Flavinderivat FIH den Wasserstoff in 3-Stellung durch CH_3 ($FICH_3$), so ändert sich das pK_a der reduzierten Form nicht wesentlich (s. Tabelle). Die Dissoziation des FIH_3 und des $FICH_3$ muss somit in 1-Stellung erfolgen (s. Formeln). Auch das Verhalten des halbreduzierten Systems gegen Me^{2+} ist beim $FICH_3$ und beim FIH in erster Näherung gleich.



Da auch dem Flavochinon, wie eingangs erwähnt, keine messbare Metallaffinität-Donor-Metallionen ausgenommen - zukommt, erschien die Annahme selektiver Komplexbildung des Semichinons gerechtfertigt. Unter dieser Annahme konnten wir, wie im folgenden dargelegt, unsere Daten quantitativ auswerten.

Stabilitäten der Flavosemichinon-chelate

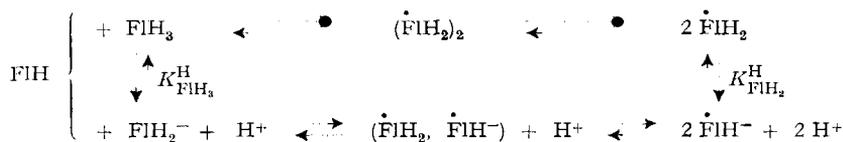
Die angegebenen Daten beziehen sich auf 50°C, Fl_{tot} = 4 · 10⁻³M, die Werte in () auf Fl_{tot} = 1,33 · 10⁻³M. Lösungsmittel 50-proz. wässer. C₂H₅OH, 0,1N NaClO₄.

	pK _{FlH₃} ^H	K _D	Me ²⁺	log K _{FlHMe} ^{Me} ± 0,1
Riboflavin	6,30	0,22 (0,45)	Cd	(4,0)
			Zn	(4,1)
			Ni	(4,0)
			Co	4,0
			Fe	3,7
Tetra-O-acetyl-riboflavin	6,30	0,22 (0,45)	Ni	4,4 (4,0)
3-Methyl-tetra-O-acetyl-riboflavin	6,43	0,12	Cd	4,1
			Zn	4,7
			Ni	4,9
			Co	4,5
Flavin-Mononucleotid (FMN)	enthält sek. Phosphat		wegen Niederschlagsbildung nicht quantitativ auswertbar	
Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD)	6,60		wegen Unreinheit	

A. Diskussion der Säure-Basen-Gleichgewichte im Flavin-Redoxsystem

Flavin kann in der Chinonstufe als Kation (FlH₂⁺), Neutralkörper (FlH) und Anion (Fl⁻) vorliegen, in der Semichinonstufe als Kation («Rhodoflavin», FlH₃⁺) [5], monomerer (FlH₂) und dimerer Neutralkörper ((FlH₂)₂) sowie als Anion (FlH⁻) und dimeres Monoanion («Verdoflavin» [5], (FlH₂, FlH⁻)³), in der Leukostufe nur als Neutralkörper (FlH₃) und Anion (FlH₂⁻). Das Leuko-Kation FlH₄⁺ tritt nur bei negativen pH-Werten auf.

Im uns interessierenden pH-Bereich zwischen 3 und 8 sind in einer zu ~ 50% oxydierten Leukoflavin-Lösung folgende Gleichgewichte zu berücksichtigen [7]:



Wenn wir die dimeren Partikeln als Ladungstransfer-Komplex betrachten, z. B. (FlH₂)₂ ↔ (FlH, FlH₃), so lässt sich verstehen, dass ihre Säure-Basen-Eigenschaften denen des disproportionierten Gemisches *in erster Näherung* gleich sind: Das Dimere («Flavochinhydrone») (FlH₂)₂ gibt ein Proton ab, welches annähernd ebenso sauer ist

³) Weitere assoziierte Partikel in konz. aq. Lösung wurden nachgewiesen durch GIBSON, MASSEY & ATHERTON [6]. Wir haben deshalb die Standardbedingungen unserer Messungen (50-proz. Äthanol, 50°) so gewählt, dass Assoziationsphänomene weitgehend zurückgedrängt werden.

wie das Leukoflavin-Proton, wie unsere Titrations zeigen: $K_{\text{FlH}_3}^{\text{H}}$ ist – wie schon erwähnt – nicht merklich vom Reduktionsgrad abhängig. Bei Abgabe eines zweiten Protons zerfällt das Dimere, da ein Ladungstransferkomplex aus gleichsinnig geladenen Partnern nicht stabil ist. Auch die Metallaffinität eines solchen Molekel-(Ladungstransfer)-Komplexes kann vernachlässigt werden, da dieser – ebenso wie bei der Deprotonierung – bei Metallassoziation in seine Komponenten zerfällt. Bei der Auswertung pH-metrischer Messungen lässt sich daher Flavochinhydrin in erster Näherung als vollständig disproportioniert ansehen. Diese erste Näherung ist, wie SCHWARZENBACH & MICHAELIS [7] zeigten, bei Konzentrationen $\text{Fl}_{\text{tot}} \leq 10^{-4} \text{M}$ sogar absolut gültig. Spektrophotometrisch macht sich die Assoziation unter 600 m μ ebenfalls nicht bemerkbar [6].

Wir können also das zwischen pH 3 und 8 vorliegende System in erster Näherung stark vereinfachend als aus den Partikeln FlH , $\dot{\text{FlH}}_2$, FlH_3 , $\dot{\text{FlH}}^-$ und FlH_2^- bestehend betrachten. Dieses System ist definiert durch die Dissoziationskonstanten von Semichinon ($K_{\text{FlH}_3}^{\text{H}}$) und Leukoflavin ($K_{\text{FlH}_2}^{\text{H}}$)⁴ sowie durch die Disproportionierungskonstante K_{D} des neutralen Semichinons:

$$K_{\text{D}} = \frac{[\dot{\text{FlH}}_2]^2}{[\text{FlH}] \cdot [\text{FlH}_3]} \quad (1)$$

Es seien nun die Konzentrationen an Gesamtflavin Fl_{tot} , an reduziertem Flavin (jodometrisch ermittelt) Fl_{redox} und an schwacher Säure (acidimetrisch ermittelt) Fl_{acid} ($\text{p}K_{\text{a}} = 7 \pm 0,5$), so folgt:

$$\text{Fl}_{\text{tot}} = [\text{FlH}] + [\dot{\text{FlH}}^-] + [\text{FlH}_2^-], \quad (2)$$

$$\text{Fl}_{\text{redox}} = [\dot{\text{FlH}}^-] + 2[\text{FlH}_2^-], \quad (3)$$

$$\text{Fl}_{\text{acid}} = [\dot{\text{FlH}}^-] + [\text{FlH}_2^-]. \quad (4)$$

Die Anionen sind hier statt der freien Säuren $\dot{\text{FlH}}_2$ und FlH_3 einzusetzen, damit dieses Gleichungssystem beim Äquivalenzpunkt acidimetrischer Titration ($\text{pH} = 8,0$) Gültigkeit hat. Aus (2) bis (4) lassen sich die Konzentrationen der einzelnen Partikeln bei pH 8 errechnen:

$$[\text{FlH}] = \text{Fl}_{\text{tot}} - \text{Fl}_{\text{acid}}, \quad (5)$$

$$[\text{FlH}_2^-] = \text{Fl}_{\text{redox}} - \text{Fl}_{\text{acid}}, \quad (6)$$

$$[\dot{\text{FlH}}^-] = 2 \text{Fl}_{\text{acid}} - \text{Fl}_{\text{redox}}. \quad (7)$$

Da die Lage des Puffergebiets, gegeben durch $K_{(\text{FlH}_3 + \text{FlH}_2)}^{\text{H}}$ – im Gegensatz zur Menge an schwacher Säure – in erster Näherung vom Oxydationsgrad unabhängig gefunden wird, folgt $[\dot{\text{FlH}}^-] \ll [\text{FlH}_2^-]$. Es kann also $K_{\text{FlH}_3}^{\text{H}} \cong K_{(\text{FlH}_2 + \text{FlH}_3)}^{\text{H}}$ direkt aus dem Titrationshalbwert abgelesen werden.

Aus (1) folgt für die nun unter Benutzung von (5), (6) und (7) experimentell bestimmbare Disproportionierung des Semichinon-Anions:

$$K_{\text{D}}' = \frac{[\dot{\text{FlH}}^-]^2}{[\text{FlH}] \cdot [\text{FlH}_2^-]} = K_{\text{D}} \cdot \frac{2a^2}{[\text{H}]b} \quad (8)$$

$$\text{wo } a \equiv K_{\text{FlH}_2}^{\text{H}}, \quad b \equiv K_{\text{FlH}_3}^{\text{H}}$$

K_{D}' steigt monoton mit steigendem pH an. Für $[\text{H}] = \text{H}_{\text{Äq}}$ ist K_{D}' bekannt (pH 8, Äquivalenzpunkt der Titration). Durch Einsetzen in Gl. (8) lässt sich nun $K_{\text{D}} \cdot a^2$ ausrechnen.

⁴ Die Schreibweise der Symbole bezieht sich auf die im Standardwerk «Stability Constants», Chem. Soc. (London), Spec. Publ. 1957, Nr. 6, gegebenen Regeln.

Betrachtet man andererseits die von SCHWARZENBACH & MICHAELIS [7] eingeführte «over-all-Konstante» k für die pH-abhängige Disproportionierung, so ergibt sich diese zu

$$k = \frac{([\dot{\text{F}}\text{IH}_2] + [\dot{\text{F}}\text{IH}^-])^2}{[\text{F}\text{IH}] \cdot ([\text{F}\text{IH}_3] + [\text{F}\text{IH}_2^-])} \quad (9)$$

$$\frac{[\dot{\text{F}}\text{IH}_2]^2 \cdot (1 + K_{\text{F}\text{IH}_2}^{\text{H}}/[\text{H}])^2}{[\text{F}\text{IH}] \cdot [\text{F}\text{IH}_3] \cdot (1 + K_{\text{F}\text{IH}_3}^{\text{H}}/[\text{H}])} \quad (10)$$

Mit Hilfe von (1) ergibt (10) die einfache Form:

$$k(\text{H}) = K_{\text{D}} \cdot (1 + a/[\text{H}])^2 / (1 + b/[\text{H}]) \quad (11)$$

Im Bereich von $10^{-11} < [\text{H}] < 10^{-3}$ (grob $0 < [\text{H}] < 1$) verhält sich k wie folgt:

- a) für $[\text{H}] \rightarrow 0$ geht $k \rightarrow K_{\text{D}}'$ (Vernachlässigung von 1 gegen $a/[\text{H}] \cdot b/[\text{H}]$ führt (11) in Gl. (8) über);
- b) für $[\text{H}] \rightarrow 1$ geht $k \rightarrow K_{\text{D}}$ ($a, b \ll 1$);
- c) für $a = b$ degeneriert k zu $k = K_{\text{D}} \cdot (1 + a/[\text{H}])$, für $1 > [\text{H}] > 0$ monoton ansteigend. Für $a > b$ steigt die Funktion noch stärker an;
- d) für $a < b$ durchläuft – von einer gewissen Grenze ($b > 2a$) an – k ein Minimum, wie es experimentell gefunden wird.

$$\frac{dk}{d[\text{H}]} = K_{\text{D}} \cdot \frac{(1 + b/[\text{H}]) \cdot 2 \cdot (1 + a/[\text{H}]) \cdot (-a/[\text{H}]^2) - (1 + a/[\text{H}])^2 \cdot (-b/[\text{H}]^2)}{(1 + b/[\text{H}])^2} \quad (12)$$

wird dann im Diskussionsbereich gleich Null für

$$[\text{H}]_{\text{min}} = ab/(b - 2a) \quad (13)$$

Wenn man mit (13) in (11) bzw. (8) eingeht, so folgt:

$$k_{\text{min}} = K_{\text{D}} \cdot 4a \cdot (b - a)/b^2, \quad (14)$$

$$\text{bzw. } K_{\text{D}}' = K_{\text{D}} \cdot 2a \cdot (b - 2a)/b^2 \quad (15)$$

beim pH minimaler Disproportionierung.

Bei Vernachlässigung von a gegen b erhält man aus (14) und (15) $k_{\text{min}} = 2K_{\text{D}}'$, d. h. im Bereich des k -Minimums liegt das Semichinon noch nicht vollständig dissoziiert vor, denn für $[\text{H}] = \text{H}_{\text{Aq}}$ gilt schon $k = K_{\text{D}}'$, es gilt also $[\text{H}]_{\text{min}} \leq \text{H}_{\text{Aq}}$.

Die totale Radikalkonzentration durchläuft also bei $\text{pH} < 8$ ein Minimum, in Übereinstimmung mit unseren Experimenten und auch mit den jüngsten Elektronenspinresonanz-Daten EHRENBURG's [8], wofern die Dissoziationskonstante der Radikalform gegen die der Leukoform vernachlässigbar, d. h. um mindestens eine pK-Einheit kleiner ist ($b \gg a$). (Für $b = 2a$ wäre $[\text{H}]_{\text{min}} = \infty$! gemäss Gl. (13).)

Aus (13) folgt:

$$[\text{H}]_{\text{min}} \cong a, \quad (16)$$

$$\text{d. h. } b \gg a \sim [\text{H}]_{\text{min}} \cong \text{H}_{\text{Aq}} \quad (17)$$

$10^{-7.5}$ ist daher eine gute Abschätzung für die Dissoziationskonstante $K_{\text{F}\text{IH}_2}^{\text{H}} \cong a$, wenn $b = 10^{-6.5}$ und $\text{H}_{\text{Aq}} = 10^{-8.0}$ ist.

Das Produkt $K_{\text{D}} \cdot a^2$ ist aus (8) bekannt, folglich auch K_{D} selbst. Überdies ist nun $k(\text{H})$ gemäss (11) bekannt für alle $[\text{H}]$ des Interessenbereichs.

Nachdem so die pH-Abhängigkeit der Radikal-Konzentration geklärt ist, steht noch deren Abhängigkeit vom Redox-Grad des Systems zur Diskussion. Diese lässt sich wie folgt abschätzen:

Es sei

$$\begin{aligned} A &= [\text{Gesamtes Semichinon}]: \quad [(\dot{\text{F}}\text{IH}_2 + \dot{\text{F}}\text{IH}^-)] \\ B &= [\text{Gesamtes Leukoflavin}]: \quad [(\text{F}\text{IH}_3 + \text{F}\text{IH}_2^-)] \\ C &= [\text{Gesamtes Flavochinon}]: \quad [\text{F}\text{IH}] \end{aligned}$$

$A + B + C = Fl_{\text{tot}}$, $A^2/B \cdot C = k$ (Disproportionierungskonstante). Mit Einführung der neuen Variablen $n = B/C$, welche mit zunehmender Reduktion von 0 über 1 (50% Red.) gegen ∞ (100% Red.) läuft, folgt:

$$C = (Fl_{\text{tot}} - A)/(n + 1), \quad (18)$$

$$k = \frac{A^2 \cdot (n + 1)^2}{n \cdot (Fl_{\text{tot}} - A)^2} \quad \text{und} \quad (19)$$

$$A = \frac{Fl_{\text{tot}} \cdot \sqrt{k}}{1/\sqrt{n} + \sqrt{n} + \sqrt{k}} \quad (20)$$

Aus $A(n) = A(1/n)$ folgt

$$A_{\text{max}} \equiv A(n = 1) = \frac{Fl_{\text{tot}} \cdot k^{1/2}}{2 + k^{1/2}} \quad (21)$$

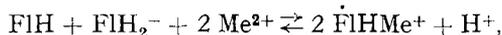
Daraus folgt mit (20) für denjenigen Reduktionsgrad, bei welchem die Semichinonkonzentration A halbmaximal ist:

$$n \left(\frac{A_{\text{max}}}{2} \right) \cong 16 \quad \text{bzw.} \quad 1/16,$$

solange k gegen 1 vernachlässigt werden kann, was im physiologischen pH-Bereich immer der Fall ist. D.h. erst bei 6% bzw. 94% Reduktion ist der Semichinon-Anteil auf die Hälfte des Maximalwertes (bei 50% Reduktion) gesunken. Im Bereich des (sehr flachen) Maximums ist A daher von n so gut wie unabhängig, so dass Mittelung über Fl_{acid} und Fl_{redox} in diesem Bereich erlaubt ist.

B. Analyse des Flavin-Redoxsystems in Gegenwart von Metallionen

Setzt man dem halbreduzierten System Me^{2+} zu, so muss im Falle einer selektiven Komplexbildung mit dem Semichinon dessen Puffergebiet, welches dasjenige des im starken Überschuss vorhandenen Leukoflavins überlappt, selektiv zu niedrigeren pH-Werten verschoben werden, d.h. es tritt der virtuelle Fall $K_{FlH_2}^H > K_{FlH}^H$ ein (bezogen auf (11)). Die Abnahme der Radikal-Konzentration mit steigendem pH im Bereich $5 < \text{pH} < 8$ wird durch Me^{2+} ins Gegenteil verkehrt. Daraus ergibt sich eine Verschiebung des Komproportionierungs-Gleichgewichts zugunsten des Semichinons, so dass bei völliger Neutralisation in Gegenwart von Me^{2+} im Falle vollständiger Ausbildung des Semichinonchelates zusätzlich 1 Äq. Protonen frei wird nach der Gleichung:



also $1/2$ Proton pro Metallion. Bei $0,5 H^+/Me^{2+}$ findet man in der Tat experimentell einen deutlichen Äquivalenzpunkt, $\text{pH} \sim 7$ (Fig. 2).

Das Experiment zeigt aber, dass die Komplexbildung bei höherem pH noch weiter geht, d.h. es werden pro Metallion mindestens 1,5 Protonen frei. *2:1-Komplexbildung* kann auf Grund folgender Beobachtung ausgeschlossen werden: bei Variation der Me^{2+} -Menge wird eine Me^{2+} proportionale Menge H^+ freigesetzt, bis zum Metall-Liganden-Verhältnis 1 : 1. Ausserdem müsste im Falle der Reaktion $FlH + FlH_2^- + Me^{2+} \rightleftharpoons (FlH)_2Me + H^+$ insgesamt $1 H^+/Me^{2+}$ frei werden, was nicht der Fall ist (vgl. oben).

Die Freisetzung eines zweiten Protons aus dem Ligand kann ebenfalls ausgeschlossen werden: $FlHMe^+ \rightleftharpoons FlMe + H^+$ gäbe zwar eine Freisetzung von insgesamt 1,5 H^+/Me^{2+} , wie sie tatsächlich gefunden wird; jedoch bilden Liganden der Form FlR

(3-ständig alkyliertes Flavosemichinon) nach Aussage der BJERRUM-Titration mit Zn^{2+} , Cd^{2+} usw. analoge Komplexe wie $\dot{F}iH^-$, die sogar etwas stabiler sind als diese.

Wir erklären daher die weitere Freisetzung von Protonen bei den Nicht-Akzeptor-Ionen durch Ausbildung von Hydroxokomplexen gemäss:



In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von MARTELL *et al.* [9] bilden sich solche Hydroxokomplexe nicht unterhalb pH 7.

C. Stabilitätsbestimmung der Radikalchelate

Unterhalb des in den Titrationen gut abgrenzbaren Bereichs der Hydroxo-Komplexbildung gilt:

$$K_{FiHMe}^{Me} = \frac{[FiHMe^+]}{[Me^{2+}][FiH^-]} = \frac{2 \Delta H}{(Me_{tot} - 2 \Delta H) [FiH^-]} \quad (22)$$

$[FiH^-]$, die Konzentration des freien Semichinon-Anions, geht aus (8) hervor:

$$[FiH^-] = \sqrt{[FiH_2^-] \cdot [FiH]} \cdot K_D \cdot a^2/b \cdot [H] \quad (23)$$

Die nur indirekt pH-abhängige $[FiH]$ kann unter Vernachlässigung des Semichinons (als Summand) gleichgesetzt werden mit:

$$[FiH] = Fi_{tot} - 1/2 Fi_{redox} - \Delta H \quad (24)$$

und analog:

$$[FiH_2^-] = Fi_{acid} = \Delta'H - \Delta H \quad (25)$$

ΔH vernachlässigt,

so dass folgt:

$$K_{FiHMe}^{Me} \cong \frac{2 \sqrt{b} \cdot [H] \cdot \Delta H}{\sqrt{K_D} \cdot a \cdot (Me_{tot} - 2 [H]) \sqrt{(Fi_{tot} - 1/2 Fi_{redox}) \cdot \Delta'H}} \quad (26)$$

Solange $\Delta H \ll \Delta'H$ ist, gilt das Gleichheitszeichen.

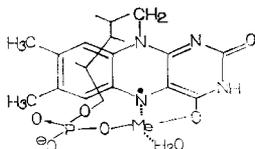
Bedeutung der einzelnen Symbole:

$[H]$	Wasserstoffionenkonzentration
$H_{\bar{A}q}$	$[H]$ beim Äquivalenzpunkt der BJERRUM-Titration, pH 8 (vgl. Fig. 2)
K_{FiHMe}^{Me}	Beständigkeitskonstante der Komplexe $FiHMe^+$
ΔH	Differenz der Neutralisationsäquivalente bei Titration mit und ohne Metallionen
$\Delta'H$	Differenz der Neutralisationsäquivalente bei Titration des partiell reduzierten und des nicht reduzierten Systems
$\Delta'H (H_{\bar{A}q}) = Fi_{acid}$	Gesamte Säurekonzentration vom pK $7 \pm 0,5$.

Diskussion. - Im halbreduzierten Flavinsystem tritt ein Maximum der Disproportionierung (Minimum der Radikalkonzentration) bei pH 7,5 auf. Bei Zusatz von Schwermetallionen wird die Disproportionierung hingegen völlig zurückgedrängt unter primärer Bildung von 1:1-Chelaten $\dot{F}iHMe^+$ aus dem zweizähligen Radikal-Anion $\dot{F}iH^-$ und von deren Hydroxo-Derivaten $\dot{F}iHMeOH$. Die Stabilitäten gehorchen der IRVING-WILLIAMS-Reihe [10], wie aus der Tabelle S. 467 ersichtlich. Alkylsubstitution am N-3 des Flavins beeinflusst die Stabilität der Radikalchelate nur wenig. Auf physiologische Verhältnisse angewandt, heisst das: Die 3-ständige Imid-Funktion steht auch im Radikalchelate für eine potentielle Bindung an das

Apoprotein zur Verfügung⁵⁾. Ebenfalls keinen Einfluss auf die Radikalchelate-Bildung hat die Ribityl-Seitenkette, deren Acetylierung die Komplexstabilität nicht ändert.

Anderes gilt für phosphathaltige Seitenketten: Im Falle der eigentlichen Flavokoenzyme beteiligt sich die PO-Funktion an der Metallkoordination. Die Radikalchelate werden daher schwerer löslich, obwohl die freien P-haltigen Liganden viel leichter löslich sind als ihre P-freien Analogen:



Die FMN-Radikalchelate konnten wir unter keinen Umständen in Lösung halten. Die FAD-Analogen konnten nicht quantitativ untersucht werden, da uns kein genügend reines FAD-Präparat zur Verfügung stand.

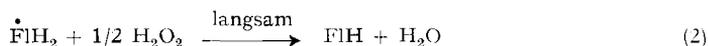
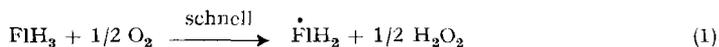
Infolge Vernachlässigung der Semichinon-Dimerisierung behalten die $K_{\text{FIHMc}}^{\text{Mc}}$ -Werte eine Abhängigkeit von Fl_{tot} , welche deutlich über der Versuchsfehlergrenze liegt.

Die Bildung von Radikalchelaten, gleichbedeutend mit einer Komproportionierung des halbreduzierten Flavin-Systems unter dem Einfluss von Metallionen, welche in dieser Arbeit pH-metrisch und spektrophotometrisch nachgewiesen wird, haben wir inzwischen auch durch direkte Messung der Radikalkonzentrationen elektronenspinresonanzspektroskopisch bestätigen können [11].

Das Metallion stabilisiert demnach die Radikalstufe des Flavin-Redoxsystems. Diese Stabilisierung ist hinreichend zur Erklärung der Spektren und Elektronentransfer-Eigenschaften nativer Metallflavoproteine. Zum Verständnis der Zusammenhänge müssen allerdings Donor-Metallionen in die Diskussion mit einbezogen werden. Rückschlüsse auf biologische Verhältnisse werden an anderer Stelle eingehend diskutiert [4].

Experimenteller Teil

Ein dosierbares Reduktionsmittel, welches die komplexchemische Analyse nicht stört, konnten wir nicht finden. Wir behielten uns mit katalytischer Hydrierung zum Leukoflavin, wobei sich Pd auf Silicagel als störungsfreier, schnell wirkender Katalysator erwies. Die unter vollständigem O_2 -Ausschluss heiss filtrierte Lösung wird dann auf das gewünschte Volumen gebracht und durch Reoxydation auf den gewünschten Redox-Grad eingestellt. Die Reoxydation kann durch Spülen



mit Luft oder durch J_2 erfolgen. Das Spülen mit Luft hat den Nachteil, dass das gemäss (1) entstehende H_2O_2 , welches nur langsam nach (2) weiterreagiert, die Lösung destabilisiert. Die Reoxydation mit J_2 wiederum kann nicht in Gegenwart J^- -affiner Metallionen (Cu^{2+}) angewandt werden und erfordert Berücksichtigung der freigesetzten H^+ -Ionen.

Die Hydrierungen wurden in einem Spezialgefäss ausgeführt (Fig. 4): Der Ligand wird in Suspension mit dem Katalysator in 50-proz. Äthanol im zylindrischen Raum I vorgelegt und nach Verdrängung der Luft hydriert (Dauer ca. $1/2$ Std.). Darauf wird der Zylinderinhalt durch Einleiten von Wasserdampf in den Mantel zum Sieden erwärmt. Während man oben durch einen Zulauf-

⁵⁾ Die Coenzym-Apoprotein-Verknüpfung ist, zumal bei den nicht reversibel dissoziablen mitochondrialen Flavoproteinen, noch ganz ungeklärt, vgl. [4].

trichter mit Druckausgleich frisches, O₂-freies Lösungsmittel zugebt, wird der Zylinderinhalt bei mässigem Vakuum durch die Fritte II in einen mit N₂ gefüllten 500-ml-Vorlage-Messkolben abgesaugt. Nach Filtration von ca. 300–400 ml ist oberhalb der Fritte nur noch Katalysator zurückgeblieben. Die filtrierte Lösung wird unter dauernder N₂-Zuführung im Thermostat bei gewünschter Temperatur auf 500 ml gebracht. Aliquote Teile dieser Stammlösung werden mit vorgewärmten, mit N₂ gefüllten Pipetten entnommen.

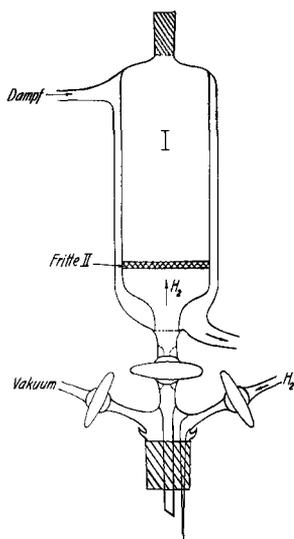


Fig. 4. Hydriergefäss

Zur Kontrolle des Redox-Grades liess man den Pipetteninhalt unter die Oberfläche eines Überschusses an KJ₃ in 2N H₂SO₄ laufen und titrierte mit Thiosulfat das unverbrauchte J₂ zurück. Danach wurde die zur Einstellung des gewünschten 50-proz. Redox-Grades berechnete Menge 0,1N Jod zur Stammlösung gegeben und letztere erneut auf 500 ml aufgefüllt.

Zur pH-Titration entleerte man die Pipette in ein mit N₂ vorgespültes thermostatisiertes Elektrodengefäss, je nachdem unter weiterem Zusatz der gewünschten Menge einer 0,1M Me(ClO₄)₂-Lösung. Nach der Titration wurde die Redox-Potentialkonstanz durch erneute J₂-Titration geprüft.

Die Konstanz von Fl_{tot} lässt sich während der Untersuchung durch spektrophotometrische Bestimmung des Flavingehalts in Proben (ohne O₂-Ausschluss) bei 445 m μ kontrollieren. Es zeigte sich, dass unter den beschriebenen Bedingungen bei Ausschluss hellen Lichtes im Laufe mehrerer Stunden kein nennenswerter Zerfall (Photolyse, Thermolyse) des Flavins eintritt. FAD und peracetyliertes Flavins können auch im vollen Tageslicht gehandhabt werden.

Die Titrationen wurden an einem thermostatierten METROHM-Combittitratoren mit Glaselektrode XU 100 unter V²⁺-deoxygeniertem Stickstoff ausgeführt. Die dennoch mitgeführte Sauerstoffkonzentration lag unter 10⁻⁷M.

Reagenzien: FMN, FAD⁶⁾ und Riboflavin waren Produkte der FLUKA AG., Buchs. Das Riboflavin wurde mehrfach aus 0,1N NaOH in siedender 2N Essigsäure umgefällt, bis das Material nach 12stdg. Trocknung bei 100°/12 Torr die richtigen [12] Werte für die Extinktionen bei 446 und 375 m μ zeigte. FMN und FAD wurden nicht weiter gereinigt; die Flavingehalte wurden, wenn nötig, auf Grund der gemessenen Extinktionen berechnet. Beim FAD wurde spektrophotometrisch eine Reinheit von 91% festgestellt, bezogen auf C₂₇H₃₃O₁₅N₉P₂, d. h. freie FAD-Säure, übereinstimmend mit den Angaben der Lieferfirma. Acidimetrisch wurden jedoch nahezu zwei Protonenäquivalente vom pK_a ~ 10 (anstelle nur eines Äquivalents) gefunden und null Äquivalent an stärker sauren Protonen (anstelle von zwei Äquivalenten für FAD-Säure). Das FAD-Präparat liegt also in Form eines NH₄⁺-haltigen Salzgemisches vor. Die quantitative acidimetrische Auswertung des halbreduzierten Systems wird dadurch verunmöglicht.

Die Darstellung von *Tetra-O-acetylriboflavin* wurde schon früher beschrieben [13]. 3-ständig alkylierte Flavine wurden nahezu quantitativ mit Dimethylformamid-Alkylhalogenid und K₂CO₃ als Katalysator bei Raumtemperatur erhalten. Seitenketten-OH-Gruppen müssen zuvor durch Acetylierung geschützt werden. Die Aufbereitung erfolgt, sobald dünnschichtchromatographisch kein Ausgangsmaterial mehr nachweisbar ist, durch Einengen im Vakuum und Aufnehmen in Chloroform/Wasser. Die organische Phase liefert nach Auswaschen mit kalter 0,1N NaOH und Trocknung bei Zusatz von Äther kristallines, reines 3-Alkylflavin, welches aus Alkohol/Isopropyläther umkristallisiert wird. So wurden dargestellt (Smp. korr.):

3-Äthyl-tetra-O-acetylriboflavin, Smp. 169–171°, aus Tetra-O-acetylriboflavin.

C ₂₇ H ₃₂ O ₁₀ N ₄	Ber. C 56,6	H 5,8	O 27,9	(N)C ₂ H ₅ 5,1%
	Gef. „ 56,5	„ 5,8	„ 28,0	„ 4,8%

⁶⁾ Abkürzungen: FMN = Flavin-Mononucleotid; FAD = Flavin-Adenin-Dinucleotid.

3-Methyl-tetra-O-acetylriboflavin, Smp. 189–191°, aus Tetra-O-acetylriboflavin.

$C_{26}H_{30}O_{10}N_4$ Ber. C 55,9 H 5,4 N 10,0% Gef. C 55,8 H 5,4 N 10,2%

3-Benzyl-lumiflavin, Smp. 244–247°, aus Lumiflavin [14].

$C_{20}H_{18}O_2N_4$ Ber. C 69,3 H 5,2 N 16,2% Gef. C 69,5 H 5,2 N 16,1%

3-Äthyllumiflavin und *3-Methylumiflavin*, identisch mit früher [13] von uns auf andere Art in schlechter Ausbeute erhaltenen Präparaten.

3-Äthoxycarbonylmethyl-lumiflavin, Smp. 280–283°, aus Lumiflavin [14].

$C_{17}H_{18}O_4N_4$ Ber. C 59,6 H 5,3 N 16,4% Gef. C 59,5 H 5,5 N 16,2%

Da die Unlöslichkeit der Isoalloxazine auf intermolekulare H-Brücken zurückzuführen ist, sind die 3-Alkylderivate in polaren organischen Lösungsmitteln und oft sogar in Wasser weit besser löslich als die Muttersubstanzen. Durch wässriges Alkali werden die 3-Alkylderivate schnell hydrolysiert, sie müssen also unter Ausschluss von Wasser dargestellt werden. Die Desacetylierung des acylierten Ribitylrestes erfolgt leicht mit NH_3 in Äthanol.

Lumiflavin-3-essigsäure: Eine 3-ständige $-CH_2COOR$ -Funktion lässt sich nicht selektiv mit Basen spalten (Ringöffnung!). Die Hydrolyse eines solchen Esters erfolgt jedoch selektiv und quantitativ durch kurzes Erwärmen in konz. HCl. Beim Verdünnen fällt Lumiflavin-3-essigsäure, Zers. ca. 300°, gut kristallisiert aus. Zur Analyse wurde sie aus Hydrogencarbonat mit siedender 2N Essigsäure umgefällt und bei 100°/0,01 Torr getrocknet.

$C_{15}H_{14}O_4N_4 \cdot H_2O$ Ber. C 54,1 H 4,8 N 16,9% Gef. C 53,8 H 4,7 N 16,9%

Lumiflavin-3-acetat ist im pH-Bereich 6–9 in allen Redoxstufen leicht wasserlöslich.

Optische Daten: Die in Fig. 3 gezeigten Spektren wurden mit einem Gerät BECKMAN DU mit Photovolt Recorder aufgenommen. Das Flavosemichinon-Chelat ist unter den gegebenen Bedingungen noch nicht vollständig ausgebildet. Quantitative Chelatbildung ist (vgl. Stabilitätskonstanten, Tabelle) erst bei höheren Konzentrationen zu erreichen, zu deren spektraler Erfassung TUNBERG-Küvetten von weniger als 2 mm Lichtweg benötigt werden. Die nicht einfache quantitative Analyse der Spektren wird Gegenstand einer weiteren Arbeit sein.

Ich danke dem Mikroanalytischen Laboratorium der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT (Dr. H. PADOWETZ) für die Ausführung der Mikroanalysen. Am experimentellen Teil der Arbeit hat meine techn. Assistentin E. ROMMEL in verdienstvollster Weise mitgearbeitet. Durch Diskussionen und Ratschläge haben die Herren Dr. H. BRINTZINGER und Dr. B. PRIJS (Basel), Dr. A. EHRENBERG (Stockholm), D. DERVARTANIAN und Dr. C. VEEGER (Amsterdam) sowie Prof. H. BEINERT (Madison) wesentlich beigetragen. Ihnen allen gilt mein Dank, ebenso wie Herrn Prof. H. ERLMAYER für die Ermöglichung und Ermutigung zu diesen Studien. Dem SCHWEIZ. NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG danke ich für die gewährte finanzielle Hilfe.

SUMMARY

The behaviour of half reduced isoalloxazine (flavocoenzyme) systems, riboflavin and analogues, has been studied acidimetrically and spectrophotometrically in aqueous solution, in the presence or absence of non-redox *d*-metal ions. The metal has been found to combine selectively with the flavin semiquinone anion, forming deep red radical chelates with comproportionation of the ligand system. Colour and reactivity of native metal-containing flavoenzymes might be explained satisfactorily by this. Reference has been made to biological conclusions advanced elsewhere.

Institut für Anorganische Chemie,
Universität Basel

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Auszug aus der Habilitationsschrift P. HEMMERICH, Basel 1963; vorläuf. Mitt.: *Experientia* 16, 534 (1960).
- [2] Teil II: P. BAMBERG & P. HEMMERICH, *Helv.* 44, 1001 (1961).
- [3] G. KARREMAN, *Bull. math. Biophysics* 23, 55 (1961).
- [4] P. HEMMERICH in «Mechanismen enzymatischer Reaktionen», 14. Mosbacher Colloquium der Gesellschaft für Physiologische Chemie 1963, im Druck bei Springer-Verlag, Berlin. Eine weitere ausführliche Mitt. ist in Vorbereitung.
- [5] R. KUHN & R. STRÖBELE, *Ber. deutsch. chem. Ges.* 70, 753 (1937).
- [6] Q. H. GIBSON, V. MASSEY & N. M. ATHERTON, *Biochem. J.* 85, 369 (1962).
- [7] L. MICHAELIS & G. SCHWARZENBACH, *J. biol. Chemistry* 123, 538 (1937).
- [8] A. EHRENBERG, *Ark. Kemi* 19, 97 (1962).
- [9] A. E. MARTELL, S. CHABEREK, R. C. COURTNEY, S. WESTERBACK & H. HYYTIAINEN, *J. Amer. chem. Soc.* 79, 3036 (1957).
- [10] H. IRVING & R. J. P. WILLIAMS, *Nature* 162, 746 (1948).
- [11] P. HEMMERICH, D. V. DERVARTANIAN, C. VEEGER & J. D. W. VANVOORST, *Biochim. biophys. Acta* 77, 504 (1963).
- [12] L. G. WHITBY, *Biochem. J.* 54, 437 (1953).
- [13] P. HEMMERICH, B. PRIJS & H. ERLLENMEYER, *Helv.* 43, 372 (1960).
- [14] P. HEMMERICH, S. FALLAB & H. ERLLENMEYER, *Helv.* 39, 1242 (1956).

56. Les spectres de masse dans l'analyse

3^e communication [1]¹)

Les spectres de masse des hydrocarbures monoterpéniques

par Alan F. Thomas et B. Willhalm

(28 XII 63)

Les hydrocarbures en $C_{10}H_{16}$ comptent parmi les composés les plus répandus dans les huiles essentielles, et comme ils existent presque toujours dans des mélanges très complexes, d'énormes efforts ont été consacrés au développement de méthodes d'analyse valables. Au cours des dernières années, des progrès notables ont été accomplis dans la séparation de ces mélanges par des méthodes de chromatographie en phase gazeuse [2], et, dans notre laboratoire, la technique maintenant courante est d'isoler de petits échantillons en utilisant une de ces dernières méthodes, et d'identifier ces substances par la spectrométrie de masse. Nous avons tout récemment noté qu'une méthode semblable avait été utilisée dans l'examen de l'huile essentielle des feuilles de cassis (*Ribes nigrum* L.) [3]. Pour cette raison, nous avons décidé d'exposer sans tarder les résultats de notre étude des spectres de masse d'hydrocarbures en $C_{10}H_{20}$, $C_{10}H_{18}$ et $C_{10}H_{16}$. Nous traiterons des spectres de masse d'autres composés terpéniques dans des mémoires ultérieurs.

Le squelette le plus souvent rencontré dans les huiles essentielles est celui du menthane. Nous donnons les spectres de masse des *p*-menthanes *cis*- et *trans*- dans le tableau 1. Comme on pouvait s'y attendre, le *trans-p*-menthane s'est révélé un peu plus stable que son isomère *cis*, dans lequel la tension causée par le substituant

¹) Les chiffres entre crochets renvoient à la bibliographie, p. 487.