

- [6] L. A. WOOTEN & L. P. HAMMETT, J. Amer. chem. Soc. 57, 2289 (1935).  
 [7] J. W. SMITH, J. Chim. physique 61, 125 (1964).  
 [8] H. EYRING, J. chem. Physics 3, 107 (1935); vgl. S. GLASSTONE, K. J. LAIDLER & H. EYRING, The Theory of Rate Process, McGraw-Hill Book Co., Inc., New York 1941.  
 [9] A. J. HUBERT, R. BUYLE & B. HARGITAY, Helv. 46, 1429 (1963).  
 [10] H. A. STAAB, Einführung in die theoretische organische Chemie, S. 560, Verlag Chemie, Weinheim 1959.  
 [11] P. KIRCHNER, Diss. Univ. München 1962.  
 [12] D. J. CRAM & F. A. ABD ELHAFAZ, J. Amer. chem. Soc. 74, 5828 (1952).  
 [13] Vgl. W. KLYNE & V. PRELOG, Experientia 16, 521 (1960).  
 [14] Vgl. H. STAAB, *loc. cit.* [10], S. 682.  
 [15] M. BRENNER & W. HOFER, Helv. 44, 1798 (1961).

## 177. Metallionen-Katalyse bei der $H_2O_2$ - bzw. Radikal-Bildung durch autoxydable Cytostatica. III. Ligand-Effekte

von H. Brintzinger, R. Zell und H. Erlenmeyer

(25. VI. 64)

In früheren Mitteilungen [1] [2]<sup>1)</sup> brachten wir einige Beiträge zu der bekannten Frage nach der Bedeutung von Radikalen bzw.  $H_2O_2$  im Bereich der cytotostatischen Wirkung radiomimetischer, autoxydabler Stoffe.

Bei dieser Gelegenheit wurde bereits darauf hingewiesen [2], dass die *in vitro* ermittelte  $H_2O_2$ -Bildung nicht als ein Mass für die biologische Aktivität *in vivo* betrachtet werden darf. Ergänzend hierzu ist zu erwähnen, dass beispielsweise die Verbindungen II und III in Autoxydationsversuchen  $H_2O_2$ -Bildung erkennen lassen<sup>2)</sup>, ohne jedoch im biologischen Versuch cytotostatisch zu wirken<sup>3)</sup>. Dieses Ergebnis ist unseres Erachtens als weiterer Beleg für die von uns schon am Beispiel des 4-Amino-6-methyl-3-heptanons<sup>4)</sup> diskutierte Bedeutung des Transportproblems bei *in vivo*-Versuchen zu betrachten. Im vorliegenden Beispiel wird dies unmittelbar evident: Die Verbindungen II und III müssen wegen der hohen  $pK_a$ -Werte der Ammonium- bzw. Guanidinium-Gruppe (9,7 bzw. 10,2) im physiologischen pH-Bereich als Kationen vorliegen, im Gegensatz zur biologisch wirksamen Verbindung I, in der keine vergleichbare basische Gruppe vorhanden ist. Hierdurch ist für II und III ein vollständig anderes Verhalten in bezug auf Transport und Verteilung im Organismus zu erwarten als für I<sup>5)</sup>. Diese Überlegungen lassen erkennen, dass Transport und Wirkung in den meisten Testversuchen gekoppelt sind<sup>6)</sup>, und dass aus dem

<sup>1)</sup> Die Zahlen in eckigen Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis, S. 1647.

<sup>2)</sup> Siche Exp. Teil.

<sup>3)</sup> Die Überlassung dieser Verbindungen und ihre biologische Charakterisierung verdanken wir der Firma HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG.

<sup>4)</sup> Diese Verbindung wirkt nur bei lokaler Applikation tumorhemmend [3].

<sup>5)</sup> Ähnliche Verhältnisse liegen bei der bakterio-statischen Wirkung von Acridin-Derivaten vor und sind dort gut untersucht worden [4].

<sup>6)</sup> Eine Verquickung von Strukturbeziehungen zu Rezeptorsystemen [5] und autoxydativer Radikalbildung [6] scheint auch der Monoaminoxidase-Hemmung durch Hydrazin-Derivate wie Phenylisopropyl-hydrazin zugrunde zu liegen.



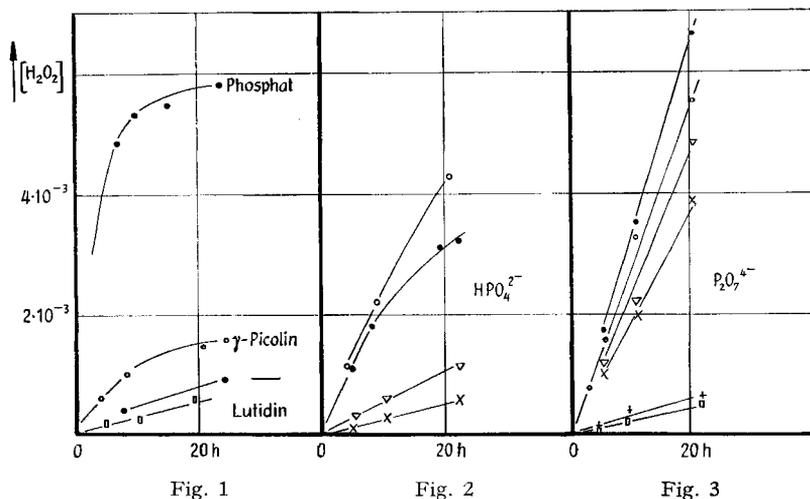


Fig. 1. Katalyse der Autoxydation von I durch  $10^{-5} M MnSO_4$

in 0,06 M Phosphatpuffer (●), in 0,2 M  $\gamma$ -Picolinpuffer (○), in ungepufferter Lösung (—) und in 0,05 M 2,6-Lutidinpuffer (□) (jeweils pH 7,5;  $37,5^\circ$ )

Fig. 2. Steigerung der  $Mn^{2+}$ -Katalyse der Autoxydation von I durch Zusatz von  $HPO_4^{2-}$   $10^{-1} M$  (○),  $10^{-2} M$  (●),  $10^{-3} M$  (▽) und  $10^{-4} M$  (×). ( $[Mn^{2+}] = 10^{-5} M$ ; 2,6-Lutidinpuffer 0,05 M; pH 7,5;  $37,5^\circ$ )

Fig. 3. Steigerung der  $Mn^{2+}$ -Katalyse der Autoxydation von I durch Zusatz von  $P_2O_7^{4-}$   $10^{-1} M$  (○),  $10^{-2} M$  (●),  $10^{-3} M$  (▽),  $10^{-4} M$  (×),  $10^{-5} M$  (+) und  $10^{-6} M$  (□) (gleiche Bedingungen wie in Fig. 2)

Konzentrationsabhängigkeit, dass  $\{Mn^{2+}P_2O_7^{4-}\}$  die reaktive Partikel ist<sup>7)</sup> (Fig. 4). Wegen des im Vergleich zum  $HPO_4^{2-}$  erheblich stärkeren Komplexbildungsvermögens des  $P_2O_7^{4-}$ -Anions liegt schon bei geringer Pyrophosphat-Konzentration<sup>10)</sup> alles  $Mn^{2+}$  als  $\{Mn^{2+}P_2O_7^{4-}\}$  vor; höhere Pyrophosphat-Konzentrationen beeinflussen in Übereinstimmung hiermit die Autoxydationsgeschwindigkeit nicht mehr wesentlich. Die aktivierende Wirkung anderer Liganden wie Citrat<sup>11)</sup> oder Adenosin-triphosphat ist mit der des Phosphats etwa vergleichbar. Die relativ geringe Wirksamkeit kleinerer Konzentrationen dieser Stoffe beruht möglicherweise auf ihrer oxydativen Zerstörung bei der Autoxydation von I.

**Diskussion.** – Die in unseren Versuchen zutage getretene Tatsache, dass  $Mn^{2+}$  erst im Kontakt mit anionischen O-Liganden wie  $HPO_4^{2-}$  oder  $P_2O_7^{4-}$  die Autoxydation von Verbindungen wie I zu katalysieren vermag, erlaubt ziemlich weitgehende Rückschlüsse auf die Mechanismen dieser Reaktion. Von diesen Liganden ist nämlich bekannt (vgl. z. B. [13]), dass sie die dreiwertige Oxydationsstufe des

<sup>10)</sup> Wegen der von ähnlichen Ligandsystemen her bekannten Invarianz der Stabilitäten in der Reihe der 3d-Metallionen [9] lässt sich aus in [10] und [11] angegebenen Daten  $6 < \log K_{Mn}^{Mn} / K_{Mn}^{Mn} < 7$  abschätzen. Beim verwendeten pH von 7,5 ist Pyrophosphat jedoch noch teilweise protoniert; deswegen ist die scheinbare Stabilität von  $\{Mn^{2+}P_2O_7^{4-}\}$  um 1–2 Zehnerpotenzen kleiner, als diesem Wert entspricht.

<sup>11)</sup> Über eine  $Mn^{2+}$ -katalysierte  $H_2O_2$ -Bildung bei der Autoxydation von Isonikotinsäurehydrazid in Gegenwart von Citrat siehe [12].

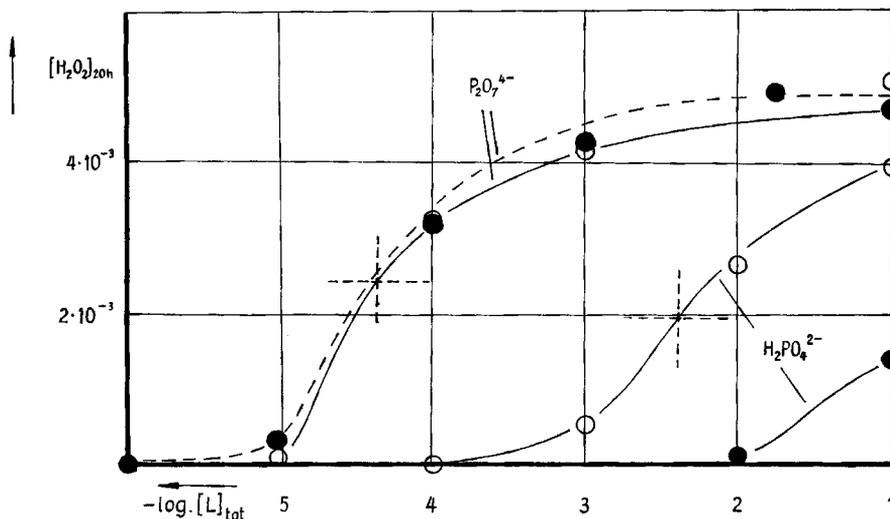
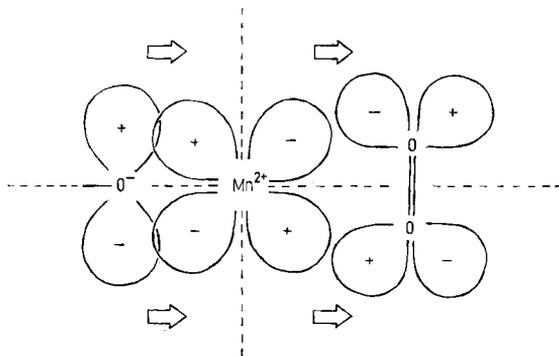


Fig. 4. Abhängigkeit der  $Mn^{2+}$ -Katalyse der Autoxydation von I von der Konzentration zugesetzter Liganden in Lutidinpuffer (○) und in  $\gamma$ -Picolinpuffer (●) (vgl. Fig. 2 und 3)

Mangan-Ions energetisch begünstigen<sup>12)</sup>. Andererseits ist es eine Eigenheit solcher Redoxvorgänge, dass bei vergleichbaren Reaktionen häufig Energetik und Kinetik parallel gehen, d. h. dass die Geschwindigkeit eines Elektronen-Übertragungsschrittes um so grösser sein wird, je grösser der Energiegewinn des Elektrons beim Übergang ist (vgl. z. B. [15]). Ein Charakteristikum der die  $Mn^{2+}$ -Katalyse der Autoxydation aktivierenden Liganden ist also aller Wahrscheinlichkeit nach, dass sie den Reaktionsschritt (1) kinetisch erleichtern. Eine solche Wirkung der aktivierenden Ligandsysteme ist auch in voller Übereinstimmung mit dem von FALLAB [16] angegebenen Orbital-Schema für solche Elektronen-Übertragungsreaktionen:



Liganden mit  $\pi$ -Elektronen-Donatorwirkung – wie dies anionische O-Liganden sind – müssen, energetisch und aus Gründen der Überlappung, den Elektronen-

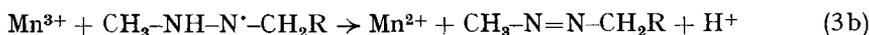
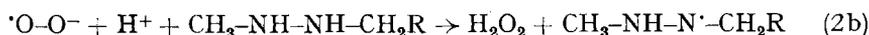
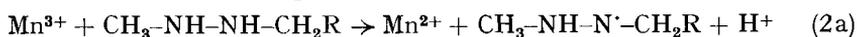
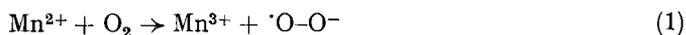
<sup>12)</sup> Auch im – autoxydationskatalytisch ebenfalls aktiven – Mn-Sulphotolocyanin sind offenbar höhere Wertigkeitsstufen des Mangan-Ions begünstigt [14].

übergang vom  $d\varepsilon$ -Orbital eines Metall-Ions in das  $\pi^*$ -Antibindungs-Orbital der  $O_2$ -Molekel erleichtern.

Diese Gegebenheiten würden zugleich bedeuten, dass Reaktion (1) der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Autoxydations-Reaktionskette ist, im Gegensatz zu vielen anderen Autoxydationskatalysen, z. B. durch Kupfer-Ionen (vgl. z. B. [17]), bei denen der geschwindigkeitsbestimmende Schritt entweder die Oxydation des Substrates durch das Metallion ist, gefolgt von der raschen Reoxydation des Metallions durch  $O_2$ , oder die Elektronenübertragung in einem ternären Substrat-Metallion- $O_2$ -Komplex. Die aktivierende Wirkung von *o*-Phenanthrolin auf die Cu-Katalyse der Autoxydation von I [2] lässt sich dahingehend interpretieren, dass hier der Übergang



durch die energetische Begünstigung der  $Cu^I$ -Stufe durch den  $\pi$ -Elektronen-Acceptor *o*-Phenanthrolin kinetisch erleichtert wird<sup>13)</sup>. Bei der von uns untersuchten  $Mn^{2+}$ -Katalyse ist fraglich, ob das Metallion überhaupt mit I in Berührung kommt (2a, 3a) oder ob die Rückreduktion des  $Mn^{3+}$  erst durch ein z. B. nach (2b) entstandenes Oxydationsprodukt von I erfolgt (3b):



Bei der Autoxydation von Hydrazinderivaten wie I kommen hohe  $H_2O_2$ -Akkumulationen zustande. Durch das Reduktionsmittel I wird also das Oxydationsmittel  $O_2$  in das wesentlich stärkere Oxydationsmittel  $H_2O_2$  übergeführt, ohne dass dieses mit dem zunächst im Überschuss vorhandenen Reduktionsmittel I sich weiter umsetzt. Dies hängt offenbar damit zusammen, dass das  $Mn^{2+}$ -Katalysatorsystem auf Grund seiner besonderen Eigenschaften keine peroxydatische Aktivität aufweist.

Den Ursachen und Konsequenzen der Tatsache, dass einmal gebildetes  $H_2O_2$  unter den Bedingungen der  $Mn^{2+}$ -katalysierten Autoxydationsreaktion nicht weiter reagiert, soll in einer späteren Mitteilung nachgegangen werden.

Wir danken der Fa. HOFFMANN-LA ROCHE für die Überlassung von Substanzen. Herrn Dr. B. PRIJS sind wir für Ratschläge bei der Abfassung des Manuskriptes zu Dank verpflichtet.

**Experimentelles.** – Die  $pK_a$ -Werte der Verbindungen I, II und III (s. Tab.) wurden durch potentiographische Titration von  $10^{-2}M$ -Lösungen unter  $N_2$  mit 0,1N NaOH bestimmt.

$pK_a$ -Werte (die eingeklammerten Werte beziehen sich auf die Protonierung der Hydrazin-Gruppe).  $pK_a$ : I – (6,7); II 10,2 (7,1); III 9,7 (6,4).

**Autoxydationsversuche:** 0,2 mMol von I, II oder III wurden in Quarzgefässen in 20 ml Puffer gelöst; das verwendete Wasser war in Quarzgefässen bidestilliert. Zusätze (*p. a.*-Reagenzien (MERCK)) wurden aus so konzentrierter Stammlösung zugegeben, dass Volumenänderungen vernachlässigbar blieben. Inkubierung der Ansätze bei pH 7,5 im Thermostaten bei  $37,5^\circ \pm 0,1^\circ$ .

<sup>13)</sup> Zusatz von Pyrophosphat in Abwesenheit von  $Mn^{2+}$  hemmt die  $H_2O_2$ -Entwicklung. Dies könnte als Unterdrückung einer durch Spuren von Kupfer- oder Eisen-Ionen ausgelösten Autoxydationskatalyse verstanden werden.

Bestimmung der  $H_2O_2$ -Konzentration zu verschiedenen Zeiten wie bisher [2] mit Titanylsulfat. Die in Fig. 4 aufgetragene  $H_2O_2$ -Konzentration nach 20 Std. ist – da deren Zunahme hier noch etwa zeitproportional ist (s. Fig. 2 und 3) – ein Mass für die Geschwindigkeit der Autoxydationsreaktion.

## SUMMARY

The effect of various ligands on  $Mn^{2+}$ -catalysed radical and  $H_2O_2$  formation by autoxidation of cytostatic hydrazine derivatives has been investigated. The catalytic action is activated by ligands which favour formation of the trivalent state of manganese ion. This finding is discussed in terms of possible mechanisms.

Institut für anorganische Chemie  
Universität Basel

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] R. ZELL, H. BRINTZINGER, B. PRIJS & H. ERLLENMEYER, *Experientia* **20**, 117 (1964).
- [2] H. ERLLENMEYER, R. ZELL, H. BRINTZINGER & B. PRIJS, *Helv.* **47**, 792, 876 (1964).
- [3] P. STRÄULI, *Oncologia* **72**, 143 (1959).
- [4] S. D. RUBBO, A. ALBERT & M. MAXWELL, *Brit. J. exptl. Pathol.* **23**, 69 (1942); A. ALBERT, S. D. RUBBO, R. J. GOLDACRE, M. E. DAVEY & J. D. STONE, *ibid.* **26**, 160 (1945); A. ALBERT & R. GOLDACRE, *Nature* **161**, 95 (1948).
- [5] E. A. ZELLER, *Biochem. Z.* **339**, 13 (1963).
- [6] L. E. EBERSON & K. PERSSON, *J. med. pharm. Chemistry* **5**, 738 (1962).
- [7] R. M. SMITH & R. A. ALBERTY, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 2376 (1956).
- [8] K. BERNEIS, M. KOFLER, W. BOLLAG, P. ZELLER, A. KAISER & A. LANGEMANN, *Helv.* **46**, 2157 (1963).
- [9] H. BRINTZINGER, *Helv.* **44**, 935 (1961).
- [10] G. G. HAMMES & M. L. MORRELL, *J. Amer. chem. Soc.* **86**, 1497 (1964).
- [11] G. SARTORI, *Gazz. chim. ital.* **64**, 3 (1934).
- [12] V. C. BARRY, M. L. CONALTY, J. M. DENNENY & F. WINDER, *Nature* **178**, 596 (1957).
- [13] J. I. WATTERS & I. M. KOLTHOFF, *J. Amer. chem. Soc.* **70**, 2455 (1948).
- [14] G. ENGELSMAN, A. YAMAMOTO, E. MARKHAM & M. CALVIN, *J. physic. Chemistry* **66**, 2517 (1962).
- [15] J. HALPERN, *Quart. Rev.* **15**, 207 (1961).
- [16] S. FALLAB, *Chimia* **16**, 189 (1962).
- [17] K. WÜTHRICH & S. FALLAB, *Helv.* **47**, 1440 (1964).

## 178. Recherches sur la formation et la transformation des esters LII [1]<sup>1)</sup>

### Monoesters phosphoreux de divers types d'alcools

par Emile Cherbuliez, F. Hunkeler, G. Weber et J. Rabinowitz

(23 V 64)

Nous avons déjà montré que de nombreux alcools primaires et secondaires pouvaient être estérifiés directement par chauffage avec l'acide phosphoreux, en donnant exclusivement – dans nos conditions de travail et d'isolement – les acides monoalcoylphosphoreux correspondants [2]. Cette réaction marche particulièrement bien dans le cas d'alcools peu volatils comme les amino-alcools, les alcools supérieurs [3], les diols [1], etc., car on peut alors effectuer cette estérification sous vide et éliminer ainsi l'eau qui se forme au cours de la réaction.

<sup>1)</sup> Les chiffres entre crochets renvoient à la bibliographie, p. 1653.