

73. Autoxydation N²-substituierter Methylhydrazine; Beeinflussung der Cu- & Fe-Katalyse durch Proteine, Desoxyribonucleinsäure (DNS) und EDTA¹⁾

von H. Aebi, Beatrice Dewald und Hedi Suter

(5. III. 65)

Die Autoxydation zahlreicher Hydrazinverbindungen und Amine wird durch Schwermetalle, besonders Cu und Fe, katalysiert. Dies ist z. B. bei Hydrazin [1], Phenylhydrazin [2], β -Phenyl-isopropylhydrazin [3], *o*-Phenylendiamin [4] und α -Aminoketonen [5] der Fall. Wie aus den Untersuchungen von BERNEIS *et al.* [6] und ERLLENMEYER *et al.* [5] [7] hervorgeht, trifft dies auch für verschiedene Methylhydrazin-Derivate mit cytotostatischer Wirkung zu. Die Stabilität der Methylhydrazine sowie auch deren Einfluss auf die Viscositätsabnahme wässriger DNS-Lösungen werden durch Schwermetallspuren und Zusätze von Chelaten stark beeinflusst (BERNEIS *et al.* [8]). Im Verlauf der Autoxydation von Hydrazinverbindungen werden – wie dies bereits 1901 im Falle des Hydrazobenzols von MANCHOT & HERZOG [9] gezeigt worden ist – peroxidäquivalente Produkte gebildet. Diese lassen sich im Falle der Methylhydrazine teilweise direkt als Wasserstoffperoxid fassen (ERLLENMEYER *et al.* [5], AEBI *et al.* [10]); teils dürfte es sich auf Grund der Beobachtungen von BERNEIS *et al.* [8] um Radikale, z. B. OH \cdot , handeln.

Da sich auch andere Klassen cytotostatisch wirkender Substanzen, wie z. B. Chinone [11], durch Peroxidbildung auszeichnen, stellt sich die Frage, ob und inwiefern eine eventuelle protrahierte Freisetzung peroxidäquivalenter Produkte in den Geweben mit der biologischen Wirkung dieser Stoffe in Zusammenhang steht. Bevor in dieser Hinsicht irgendwelche Aussagen gemacht werden können, muss untersucht werden, wie diese Methylhydrazinderivate im Organismus bzw. in überlebenden Geweben umgesetzt werden. Wie RAAFLAUB & SCHWARTZ [12] kürzlich gezeigt haben, darf auf Grund der in Blut und Harn aufgefundenen Metaboliten von 1-Methyl-2-*p*-(isopropyl-carbamoyl)-benzyl]-hydrazin-hydrochlorid angenommen werden, dass es auch *in vivo* vorerst zu einer Dehydrierung des Methylhydrazin-Restes unter Bildung der entsprechenden Azoverbindung kommt:



Dabei bleibt zunächst offen, inwieweit es sich um eine enzymatische Umsetzung oder um eine durch Schwermetall-Verbindungen katalysierte Autoxydation handelt.

Mit den hier beschriebenen Versuchen soll ein Beitrag zur Frage geleistet werden, ob und in welchem Ausmass nach Verabreichung von am N² substituierten Methylhydrazinen (im folgenden kurz Methylhydrazine genannt) auch in der lebenden Zelle eine katalytische Autoxydation erfolgt. Mit dieser Möglichkeit muss jedenfalls auf

¹⁾ Über die hier mitgeteilten Experimente ist in einem am 6. Dezember 1963 vor der Berner Chemischen Gesellschaft gehaltenen Vortrag berichtet worden.

Grund verschiedener Befunde gerechnet werden. Dafür sprechen z.B. die Beobachtungen von UDENFRIEND *et al.* [13] bei der Oxydation aromatischer Verbindungen durch Eisen + EDTA + Ascorbat, und diejenigen von FLESCH *et al.* [14] bei der Oxydation von Adrenalin, Linolsäure und Ascorbat. In beiden Fällen liess sich die Eisen-katalysierte Autoxydation durch EDTA-Zusatz stark beschleunigen. Nach BRINTZINGER *et al.* [7] sind auch bei der Autoxydation von Methylhydrazinen ausgeprägte Ligand-Effekte zu beobachten. Die vorliegenden Experimente beschränken sich im Wesentlichen auf die beiden Oligoelemente Eisen und Kupfer. Dabei ist einerseits die Wirkung der entsprechenden Fe- und Cu-Metalloproteide (Siderophilin, Ferritin, Hämine bzw. Coeruloplasmin), andererseits diejenige von Eisen- und Kupfer-Salzen in Gegenwart komplexbildender Zellbestandteile, wie z.B. Albumin und Desoxyribonucleinsäure, auf die Oxydationsgeschwindigkeit von Methylhydrazinen geprüft worden. Dabei hat sich ergeben, dass die Kupfer-katalysierte Autoxydation von Methylhydrazinen durch verschiedene Komplexbildner, wie z.B. EDTA, praktisch vollständig unterdrückt werden kann. Für den Biologen ist dabei von Interesse, dass Desoxyribonucleinsäure in diesem System als Chelat etwa 30mal wirksamer ist als Serumalbumin, sofern gleiche Mengen verglichen werden. Bei der Eisen-katalysierten Methylhydrazin-Oxydation besteht ein entgegengesetztes Verhalten, indem Eisen(II)- oder Eisen(III)-Salze in freier Form kaum, als EDTA-Komplex dagegen stark reaktionsbeschleunigend wirken. Das «Hydroxylase-Modell» Eisen(II)-EDTA von UDENFRIEND *et al.* [13] gilt somit auch für die Oxydation von Methylhydrazinen. Während sich andere Eisenkomplexe als wirkungslos erwiesen haben, sind Myoglobin und Transferrin gute Katalysatoren der Autoxydation von Methylhydrazinen. Eine mögliche Extrapolation dieser im Modellversuch erhobenen Befunde auf die lebende Zelle wird dadurch wesentlich kompliziert und erschwert, dass ein jedes der hiefür in Frage kommenden Oligoelemente gesondert betrachtet werden muss.

Experimenteller Teil

1. Methodisches. – a) *Manometrische Bestimmung des O_2 -Verbrauches.* Es wurde zur fortlaufenden Verfolgung des Gasumsatzes ausschliesslich die direkte Methode nach WARBURG verwendet. Inkubierungsbedingungen der Ansätze in der WARBURG-Apparatur: Temperatur 30°; Gasphase: Luft; Schüttelfrequenz 90–100 Oszillationen pro min. Es wurden konische ein- oder zweiarmlige Gefässe benutzt, wobei die Methylhydrazinlösung nach einer Temperaturlausgleichsperiode von 15 min aus dem bzw. einem der Seitenarm(e) zugekippt wurde. In den Hauptraum wurden Puffer, Salzlösung (Metall-Ionen) und ev. Effektoren und Chelate pipettiert, wobei das Gesamtflüssigkeitsvolumen konstant (2,3 ml) gehalten wurde. Der Seitenarm enthielt 0,4 ml Lösung des Methylhydrazinderivates. Die Konzentration wurde im Standard-Experiment derart gewählt (27 μ Mol/0,4 ml), dass nach Zukippen dieser Lösung zum Reaktionsgemisch (total 2,7 ml) die Endkonzentration 10 mm war. Die Manometerablesungen erfolgten in der Regel alle 15 min während einer Versuchsdauer von 2–4 Std.

b) *Chemikalien.* – *Pufferlösungen:* Phosphatpuffer 0,067 M, nach SÖRENSEN, pH 7,0 und pH 7,5; TRIS-Puffer 0,05 M, pH 7,5 (TRIS *puriss.* «FLUKA»); Pyrophosphat-Puffer 0,05 M, pH 7,0; Imidazol-Puffer 0,05 M, pH 7,0.

Am N^2 substituierte Methylhydrazine (s. Tabelle 4): Der Grossteil der Versuche wurde mit 1-Methyl-2-[*p*-(isopropyl-carbamoyl)-benzyl]-hydrazin-HCl (= Methylhydrazin I; interne Bezeichnung Ro 4-6467/1) ausgeführt²). Diese Substanz (Mol.-Gew = 257,76) ist ein weisses, bitter schmeckendes, zu ca. 10% in Wasser lösliches Pulver, das sich bei verschiedenen Versuchsanordnungen als starkes Cytostaticum erwiesen hat [15]. In wässriger Lösung ist Methylhydrazin I bei neutraler und alkalischer Reaktion leicht oxydabel und wirkt als Reduktionsmittel.

Metallsalze: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; $\text{CdSO}_4 \cdot 8/3\text{H}_2\text{O}$; $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: alle «MERCK» pro analysi. VCl_3 purum «FLUKA».

Chelatbildner: EDTA- Na_2 (Komplexon III) «SIEGFRIED»; o-Phenanthrolin p.a. «MERCK».

Zur Herstellung der Lösungen wurde ausschliesslich doppelt-quarzdestilliertes Wasser verwendet.

c) *Biologische Präparate.* – *Albumin:* Dried Bovine Albumine, POVIET PRODUCTEN N. V., Amsterdam. – *Desoxyribonucleinsäure,* isoliert aus Kalbsthymus, entweder nach SIGNER & SCHWANDER [16] oder nach KAY et al. [17]. – *Coeruloplasmin,* BEHRINGWERKE AG., Marburg³⁾ (Op. 2492/94); Stammlösung enthaltend 9,8% Protein. – *Transferrin,* SRK Bern (Frakt. I 21. 11. 62), Eisenbindungsvermögen ca. 80% der Theorie. – *Ferritin* «PENTEX» (Kankakee/Ill. USA), aus Pferdemiilz; Stammlösung enthaltend 3,2 mg Eisen und 7,2 mg Protein-N pro 1 ml Lösung. – *Cyanocobalamin* krist. USP (MERCK, SHARP & DOHME H 69305). – *Katalase* krist. aus Rinderleber, «BOEHRINGER». – *Hämoglobin* (Mensch) und Myoglobin (Wal), dargestellt von K. SCHMID³⁾ [18].

2. Abhängigkeit der Oxydationsgeschwindigkeit von der Kupfer(II)-Ionen-Konzentration. – Arbeitet man in einem Puffersystem, dessen Komponenten keine ausgesprochene Chelatwirkung auf die Kupfer(II)-Ionen ausüben, bewirken bereits kleinste Konzentrationen von Cu^{2+} eine starke Beschleunigung der Autoxydation von Methylhydrazin I. In 0,05 M Phosphat (pH = 7,0) ist z. B. bereits bei $3 \cdot 10^{-7} \text{ M } [\text{Cu}^{2+}]_t$ eine signifikante O_2 -Aufnahme (ca. $10 \text{ mm}^3/\text{h}$) zu beobachten. Entsprechende Kontrollansätze ohne Kupfer, jedoch mit 0,001 M EDTA, zeigen demgegenüber selbst nach 240 min nur einen knapp messbaren O_2 -Verbrauch ($-\text{O}_2 \sim 2 \text{ mm}^3/\text{h}$). Wird die Konzentration des zugesetzten Kupfersulfats unter den oben angegebenen Standard-

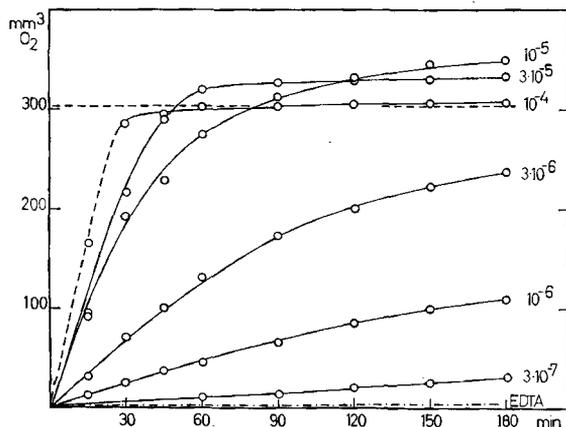


Fig. 1. Oxydation von Methylhydrazin I in Abhängigkeit von der Cu^{2+} -Konzentration

Ordinate: O_2 -Verbrauch in $\text{mm}^3/\text{Ansatz}$; Abszisse: Zeit in Minuten. Die Horizontale bei $302 \text{ mm}^3 \text{ O}_2$ entspricht einem O_2 -Verbrauch von $1/2 \text{ Mol O}_2$ pro Mol Methylhydrazin I ($27,0 \mu\text{Mol}/\text{Ansatz}$). Die Zahlen bei den Zeit-Umsatzkurven bedeuten molare Endkonzentration bezüglich $[\text{Cu}^{2+}]_t$. - - - - = Kontrolle ohne Zusatz von CuSO_4 , jedoch mit 10^{-3} M EDTA . Pufferung der Ansätze mit 0,05 M Phosphat, pH 7,0

²⁾ Markenname «Natulan» Fa. F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. – Den Herren Prof. A. PLETSCHER und Dr. K. F. GEY (Medizinische Forschungs-Abteilung der Fa. HOFFMANN-LA ROCHE, Basel) sei für die Überlassung der Versuchsmengen von Natulan und der in Tabelle 4 angeführten Methylhydrazine bestens gedankt.

³⁾ Herrn Prof. H. SCHULTZE, Marburg, sei für die Überlassung der Proben von Coeruloplasmin, Herrn Prof. K. SCHMID, Boston, für die Proben von krist. Myoglobin und Hämoglobin bestens gedankt.

Versuchsbedingungen systematisch variiert, ergibt sich die in Fig. 1 dargestellte Kurvenschar. Es lässt sich daraus entnehmen, dass über einen Konzentrationsbereich von ca. 10^{-6} – 10^{-4} M $[\text{Cu}^{2+}]_t$ angenäherte Proportionalität zwischen Oxydationsgeschwindigkeit und zugesetzter Menge besteht. In Gegenwart eines Cu^{II} -Überschusses ($\text{Cu} > 10^{-4}$ M) erfolgt die Oxydation sehr rasch, so dass eine manometrische Messung infolge Limitierung des Gasaustausches durch Diffusion nicht mehr möglich ist. Es stellt sich dabei innert 30–40 min ein Gleichgewicht ein, entsprechend einem stöchiometrischen Verhältnis von 1 Mol Methylhydrazin I: $\frac{1}{2}$ Mol O_2 . Sind im Ansatz total 27,0 μMol Methylhydrazin I vorhanden, entspricht dies einem Gesamt- O_2 -Verbrauch von total 302 $\text{mm}^3/\text{Ansatz}$.

Als Mass für die Oxydationsgeschwindigkeit kann z. B. der reziproke Wert des Zeitintervalles zwischen Start und hälftiger Oxydation ($-\text{O}_2 = 151 \text{ mm}^3/\text{Ansatz}$) genommen werden. Bei Auswertung der in Fig. 1 dargestellten Kurvenschar ergibt sich eine S-Kurve, wenn v bzw. $1/t$ als Funktion von $\log[\text{Cu}^{2+}]_t$, und eine Gerade, wenn $1/v$ als Funktion von $1/[\text{Cu}]$ aufgetragen werden. Halbe Maximalgeschwindigkeit resultiert bei einer Cu-Konzentration von ca. $2 \cdot 10^{-5}$ M. Aus Fig. 1 geht ferner hervor, dass in einem mittleren Konzentrationsbereich von 10^{-5} – $3 \cdot 10^{-5}$ M $[\text{Cu}^{2+}]$ schon nach ca. 1 Std. Gasumsätze resultieren, welche den oben angegebenen Grenzwert von 302 $\text{mm}^3 \text{ O}_2/\text{Ansatz}$ überschreiten. Dies deutet darauf hin, dass sich entweder die Autoxydation unter diesen Bedingungen nicht auf den ersten Reaktionsschritt (Methylhydrazin \rightarrow Azoderivat) beschränkt, oder dass das im Verlauf dieser Dehydrierung anfallende H_2O_2 trotz Gegenwart von Cu^{2+} nicht vollständig in H_2O und O_2 zerlegt wird. Wie in der folgenden Arbeit gezeigt wird [10], lassen sich diese Abweichungen vom theoretischen Wert zwanglos durch das in den Ansätzen angehäufte H_2O_2 erklären. Es trifft somit die zweiterwähnte Alternative zu.

Ein Vergleich der katalytischen Wirkung verschiedener Schwermetall-Ionen auf die Autoxydation von Methylhydrazin I zeigt, dass Cu^{II} -Ionen mit Abstand am wirksamsten sind (Tab. 1). Bei der hohen Katalysatorkonzentration von 10^{-3} M, wie sie hier aus Gründen der Vergleichbarkeit gewählt werden musste, wird im Falle von Cu^{2+} ein Endwert – entsprechend ca. $\frac{1}{2}$ Mol O_2 pro Mol oxydiertes Methylhydrazinderivat – bereits innert 30 min erreicht. Demgegenüber beginnt der O_2 -Verbrauch in allen andern Ansätzen nach diesem Zeitpunkt eben erst gut messbar zu werden. Während sich die Oxydation bei Zusatz von Co^{2+} , V^{3+} und Mn^{2+} im WARBURG-Versuch verfolgen lässt, ist ein reaktionsbeschleunigender Effekt im Falle von Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} oder Cd^{2+} innert 3 Std. bei 30° und pH 7,5 in TRIS-Puffer nicht zu beobachten.

Die in Tabelle 1 angegebenen Werte geben die Verhältnisse insofern unvollständig wieder, als die einzelnen Schwermetall-Effekte auf die Autoxydation von Methylhydrazin I durch Chelat-zusätze und Puffer-Ionen ganz verschieden beeinflusst werden. So verhält sich z. B. Co^{2+} gleich

Tabelle 1. *Wirkung verschiedener Schwermetallsalze auf die Oxydationsgeschwindigkeit von Methylhydrazin I*

Manometrische Bestimmung des O_2 -Verbrauchs mit der WARBURG-Apparatur. Ansätze enthaltend: 13,5 μMol Methylhydrazin I; Pufferung durch 0,05 M TRIS-Puffer, pH = 7,5. Endkonzentration aller Salzzusätze 10^{-3} M

Art des Zusatzes	O_2 -Verbrauch in $\text{mm}^3 \text{ O}_2/\text{Ansatz}$			
	30 min	60 min	120 min	180 min
Kupfer(II) (CuSO_4)	133	135	134	136
Kobalt(II) (CoCl_2)	12	27	54	91
Vanadium(III) (VCl_3)	14	22	39	92
Mangan(II) (MnSO_4)	3	8	17	33
Molybdän(VI) (Na_2MoO_4)	<1	<1	2	9
Chrom(III) ($\text{KCr}(\text{SO}_4)_2$)	<1	1	2	5
Zink(II) (ZnSO_4)	<1	<1	<1	<1
Eisen(II) (FeSO_4)				
Eisen(III) ($\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$)				
Cadmium(II) (CdSO_4)				
Kontrolle (+ 0,001 M EDTA)	<1	<1	<1	<1

wie Cu^{2+} , indem ein Zusatz von 0,001M EDTA genügt, um die katalytische Wirkung dieser Kationen praktisch vollständig zu unterdrücken. Andererseits bewirkt derselbe Zusatz von 10^{-3} M EDTA im Falle von Eisen(II) oder Eisen(III) eine beträchtliche Steigerung des katalytischen Effektes. Die Beobachtung, wonach andere Chelatbildner wie z. B. *o*-Phenanthrolin, die Kupferkatalyse steigern, diejenige von Eisen dagegen hemmen (vgl. Abschnitt 6), dürfte mit hinreichender Deutlichkeit zeigen, dass eine allgemeingültige Rangordnung unter den geprüften Schwermetallen hinsichtlich katalytischer Wirkung nicht gegeben werden kann.

3. Wirkung von Eisen(III)-Äthylendiamintetraacetat auf die Oxydation von Methylhydrazin I. – Während Eisen(II)- oder Eisen(III)-Salze für sich allein praktisch wirkungslos sind, üben sie in Gegenwart von EDTA eine starke katalytische Wirkung auf die Oxydation der Methylhydrazine aus. Die von UDENFRIEND *et al.* [13] am «Hydroxylasemodell» ($\text{Fe} + \text{EDTA} + \text{Ascorbat}$) gemachten Beobachtungen scheinen somit auch für die katalytische Dehydrierung von Methylhydrazinen zuzutreffen. Wie aus den Daten in Tabelle 2 hervorgeht, wird der Effekt bei unabhängiger Variation des Fe-Salz- und EDTA-Zusatzes im wesentlichen durch die in geringerer Konzentration vorhandene Komponente bestimmt. Vergleicht man die mit $[\text{Fe}] = [\text{EDTA}]$ erhaltenen Zeit-Umsatzkurven mit denjenigen in Fig. 1 (Cu^{2+} -Katalyse), ergibt sich ein Unterschied bezüglich katalytischer Wirksamkeit von 1:25 bis 1:30, sofern äquimolare Konzentrationen von Cu- und Fe-Salz einander gegenübergestellt werden. So verläuft z. B. die Autoxydation in Gegenwart von 10^{-4} M Fe-EDTA (Tabelle 2; drittunterste Zeile) etwa gleich rasch wie mit $3 \cdot 10^{-6}$ M Cu^{2+} (Fig. 1; Kurve 3).

Tabelle 2. Oxydation von Methylhydrazin I in Gegenwart von Eisen(II)- bzw. Eisen(III)-Salzen und Äthylendiamintetraacetat

Manometrische Bestimmung des O_2 -Verbrauchs. Ansätze enthaltend: $27,0 \mu\text{Mol}$ Methylhydrazin I; Pufferung durch 0,05M Phosphat, $\text{pH} = 7,0$. $\text{Fe}^{2+} = \text{FeSO}_4$; $\text{Fe}^{3+} = \text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$

	Zusätze (molare Endkonzentration)			O_2 -Verbrauch in $\text{mm}^3 \text{O}_2/\text{Ansatz}$		
	Fe^{2+}	Fe^{3+}	EDTA	60 min	120 min	180 min
Kontrollen	—	—	10^{-4}	<1	1	3
	10^{-3}	—	—	10	11	11
	—	10^{-3}	—	9	12	16
$[\text{Fe}] > [\text{EDTA}]$	—	10^{-3}	10^{-4}	110	171	215
	—	$3 \cdot 10^{-4}$	10^{-4}	93	158	205
$[\text{EDTA}] > [\text{Fe}]$	—	10^{-5}	10^{-3}	18	34	53
	—	$3 \cdot 10^{-5}$	10^{-3}	39	75	116
	—	10^{-4}	10^{-3}	94	171	235
	—	$3 \cdot 10^{-4}$	10^{-3}	170	279	343
$[\text{Fe}] = [\text{EDTA}]$	—	$3 \cdot 10^{-6}$	—	12	20	26
	—	10^{-5}	—	25	42	53
	—	$3 \cdot 10^{-5}$	—	49	84	111
	—	10^{-4}	—	115	178	221
	—	$3 \cdot 10^{-4}$	—	219	300	340
	—	10^{-3}	—	330	377	391

4. Einfluss der Puffer-Ionen. – Um Aufschluss über Chelat-Effekte von seiten des verwendeten Puffers zu erhalten, wurde die Autoxydation von Methylhydrazin I in vier Puffersystemen vergleichend untersucht. Wie aus Fig. 2 ersichtlich, hängt die Oxydationsgeschwindigkeit bei gegebener Cu^{II} -Konzentration stark von der Art des Puffers ab. Während Phosphat- und Imidazol-Puffer ein ähnliches Verhalten zeigen, ist in TRIS- und Pyrophosphat-Puffer bei gleichbleibender total-Cu-Konzentration eine starke Verzögerung der Oxydation festzustellen. Auf Grund der Parameter der in Fig. 2 dargestellten Konzentrations-Wirkungskurven sind zur Erzielung desselben Effektes in den 4 verglichenen Systemen folgende relative Kupferkonzentrationen erforder-

derlich: Phosphat: Imidazol: TRIS: Pyrophosphat = 1:1:6:60. Diese Unterschiede, die auf ungleiche Komplexbindung der Puffer-Ionen zurückzuführen sind, haben uns veranlasst die Autoxydation von Methylhydrazin I durchwegs in mehreren Puffersystemen gleichzeitig zu untersuchen.

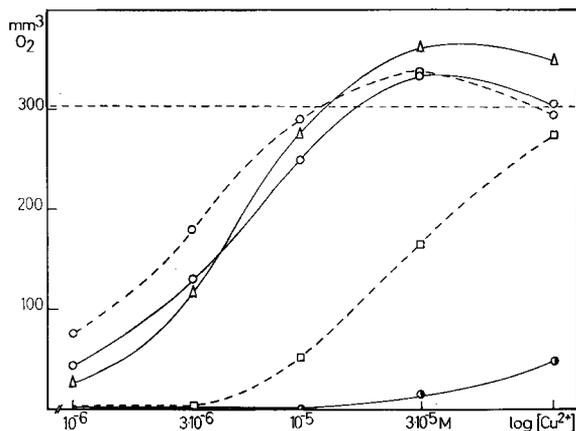


Fig. 2. Einfluss des Puffersystems auf die Cu^{2+} -katalysierte Oxydation von Methylhydrazin I
 Ordinate: O_2 -Verbrauch in $\text{mm}^3/\text{Ansatz}/\text{Stunde}$. Abszisse: Konzentration von CuSO_4 bzw. $[\text{Cu}^{2+}]$
 —●— Pyrophosphat, pH 7,0 | —○— Phosphat, pH 7,0
 —□— TRIS-Puffer, pH 7,5 | —△— Imidazol, pH 7,0
 —○— Phosphat, pH 7,5 | (alle Puffer 0,04 M)
 Alle Ansätze enthalten 27,0 μMol Methylhydrazin I

Die Katalyse mit Fe-EDTA zeigt auch in dieser Hinsicht ein gegensätzliches Verhalten, indem die Oxydation von Methylhydrazin I in Gegenwart von 10^{-3}M $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ und 10^{-4}M EDTA in TRIS-, Phosphat- und Imidazol-Puffer (je $0,05\text{M}$; pH = 7,5) mit praktisch gleicher Geschwindigkeit verläuft. In Pyrophosphatpuffer, der die Kupfer-katalysierte Autoxydation stark hemmt, ist im Falle von (Fe-EDTA) lediglich eine Herabsetzung der Oxydationsrate um ca. 20% zu beobachten. Die katalytische Wirkung weiterer Schwermetalle, wie sie sich in verschiedenen Puffersystemen ergibt, lässt sich aus Tabelle 3 ersehen. Aus diesen Daten geht hervor, dass auch für die Wirkung der Puffer-Ionen keine allgemeingültige Regel gegeben werden kann. Es verhält sich z. B. die Katalyse durch Kobalt(II)-Ionen im Vergleich zu derjenigen durch Kupfer(II)-Ionen gerade entgegengesetzt: Während 10^{-4}M Co^{2+} in TRIS einen sehr wirksamen Katalysator der Oxydation von Methylhydrazin I darstellt, ist derselbe Zusatz in Phosphatpuffer ohne jeden Effekt. Ein weiteres Beispiel: Während Pyrophosphatpuffer die Katalyse durch Cu^{II} -Salze stark hemmt, hat ein Zusatz von 10^{-4}M Vanadium(III)-chlorid gerade in diesem Puffer den grössten Effekt.

5. Kupfer- und Eisen-Katalyse bei verschiedenen Methylhydrazinderivaten. – Das Ergebnis eines an 8 Derivaten durchgeführten Vergleiches zwischen der Wirkung von Cu^{2+} und von Fe^{III} -EDTA ist in Tabelle 4 zusammengestellt. Auf Grund der oben mitgeteilten Beobachtungen ist dabei durchwegs mit phosphatgepufferten Ansätzen gearbeitet worden. Es geht aus diesem Vergleich hervor, dass sich – mit einer Ausnahme – alle untersuchten Derivate gegenüber beiden Katalysatoren grundsätzlich ähnlich verhalten. Einzig im Falle von Methylhydrazin IV, welches als Oxalat vorlag, besteht eine Diskrepanz zwischen Fe-EDTA- und Cu-Katalyse. Diese dürfte darauf zurückzuführen sein, dass die Aktivität des Komplexes Fe-EDTA durch Oxalat-Ionen kaum beeinträchtigt wird, wogegen es im zweiten System zu einer Bindung der katalytisch aktiven Cu^{II} -Ionen an das Oxalat kommt. Diejenigen Verbindungen, die 2 Methylhydrazingruppen in der Molekel enthalten, weisen unter sonst gleichbleibenden Versuchsbedingungen einen doppelt so hohen O_2 -Verbrauch auf wie die entsprechenden einfach substituierten Methylhydrazinderivate. Man vergleiche in Tabelle 4 die Daten für die Substanzen I–V mit denen für VI und VII. Auch innerhalb der beiden Gruppen bestehen Unterschiede, und zwar sowohl bezüglich Anfangs-

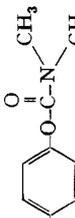
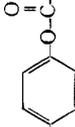
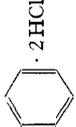
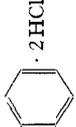
Tabelle 3. *Wirkung von Kobalt-, Vanadium- und Kupfer-Salzen auf die Autoxydation von Methylhydrazin I in verschiedenen Puffergemischen*

Die angegebenen Werte bedeuten mm³ O₂-Verbrauch/Ansatz je Stunde resp. 3 Std.

Versuchsbedingungen: Methylhydrazin: 27,0 μMol/Ansatz entspr. 0,01 m Endkonzentration; TRIS-Puffer pH 7,5, 0,05 m; Phosphat-Puffer pH 7,0, 0,05 m; Pyrophosphat-Puffer, pH 7,0, 0,05 m

Katalysator	Kobalt(II) (CoCl ₂)				Vanadium(III) (VCl ₃)				Kupfer(II) (CuSO ₄)							
	TRIS	Phosphat	Phosphat	TRIS	TRIS	Phosphat	Phosphat	Pyrophosphat	TRIS	TRIS	Phosphat	Phosphat	Pyrophosphat			
Versuchsdauer	1 h	3 h	1 h	3 h	1 h	3 h	1 h	3 h	1 h	3 h	1 h	3 h	1 h	3 h		
Kontrolle	<1	6	<1	2	1	5	<1	4	—	—	<1	1	1	5	24	
10 ⁻⁵ M	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	49	145	275	348	4	17
3 · 10 ⁻⁵ M	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	165	304	318	329	13	47
10 ⁻⁴ M	104	200	<1	3	1	2	20	47	63	183	274	337	301	306	53	148
3 · 10 ⁻⁴ M	196	316	1	6	13	74	64	111	148	307	—	—	299	301	—	—
10 ⁻³ M	239	327	1	10	16	182	275	344	298	358	—	—	—	—	—	—

Tabelle 4. Übersicht über Formel, biologische Eigenschaften und Verhalten einiger Methylhydrazinderivate gegenüber Kupfer- und Eisen-Katalyse
 Die Zahlenangaben bedeuten: gesamtter O₂-Verbrauch in mm³/Ansatz nach 30, 60 und 120 min
 Pufferung der Ansätze durch Phosphat, pH 7,0, 0,03 2M Endkonzentration; CuSO₄ 10⁻⁵M; NH₄Fe(SO₄)₂ 10⁻³M; EDTA 10⁻⁴M; alle Methylhydrazinderivate 0,01M (= 27,0 μMol/Ansatz)

Bezeichnung (Mol.-Gew.)	Strukturformel	Cytostatische Wirksamkeit	Cu ²⁺			Fe-EDTA		
			30 min	60 min	120 min	30 min	60 min	120 min
I Ro 4-6467/1 (257,76)	 CH ₃ -NH-NH-CH ₂ -  -CO-NH-CH(CH ₃) ₂ · HCl	++	189	252	288	54	104	169
II Ro 4-3828/3 (234,20)	 CH ₃ -NH-NH-CH ₂ -  -CH ₂ -CH ₂ -NH-NH-CH ₃ · H ₃ PO ₄	++	226	299	341	57	111	182
III Ro 4-6648 (316,26)	 CH ₃ -CH ₂ -NH-NH-CH ₂ -  -CH ₂ -CH ₂ -NH-NH-CH(CH ₃) ₂ · HBr	0	253	316	331	42	80	135
IV Ro 4-9043 (313,3)	 CH ₃ -NH-NH-CH ₂ -  -CH ₂ -CH ₂ -NH-NH-CH ₃ · Oxalat	(+)	18	31	58	43	83	141
V Ro 4-5970 (217,7)	 CH ₃ -NH-NH-CH ₂ -  -CH ₂ -CH ₂ -NH-NH-CH ₃ · HCl	(+)	157	223	256	27	57	102
VI Ro 4-5189 (267,2)	 CH ₃ -NH-NH-CH ₂ -  -CH ₂ -CH ₂ -NH-NH-CH ₃ · 2HCl	++	288	437	524	108	178	272
VII Ro 4-5260 (267,2)	 CH ₃ -NH-NH-CH ₂ -  -CH ₂ -CH ₂ -NH-NH-CH ₃ · 2HCl	++	347	483	568	—	—	—
VIII N ¹ N ² - Dimethyl- hydrazin (133,0)	CH ₃ -NH-NH-CH ₃ · 2HCl	0	211	236	245	15	35	60

geschwindigkeit ($\sim O_2$ -Verbrauch nach 30 min) als auch der asymptotisch erreichten Endwerte (\sim Gesamt- O_2 -Verbrauch nach 2 Std.). Die katalytische Wirksamkeit von Cu^{2+} - bzw. (Fe-EDTA) auf die Dehydrierung des Methylhydrazinrestes ist in allen vergleichbaren Fällen von ähnlicher Grössenordnung. Es scheint jedoch das Verhältnis zwischen Peroxidbildung (bestimmt durch die Dehydrierungsgeschwindigkeit des Methylhydrazinrestes) und Peroxidspaltung (bestimmt durch die «Katalase»-Wirkung des Katalysators) je nach Substanz verschieden zu sein. Für die Interpretation dieser Modellversuche ist schliesslich der Befund von Interesse, dass sich die biologisch aktive Substanz I (methylsubstituiert!) und die völlig unwirksame Substanz III (äthylsubstituiert!) in bezug auf beide der oben erwähnten Kriterien etwas verschieden verhalten.

6. Reversibilität der Katalysatorwirkung von Cu^{2+} und Fe-EDTA auf die Oxydation von Methylhydrazinen. – Durch entsprechende Versuchsanordnung lässt sich die Reversibilität der oben beschriebenen Effekte demonstrieren. Bei Verwendung zweiarziger WARBURG-Gefässe kann die auf übliche Weise durch Zukippen der Methylhydrazinlösung bei $t = 0$ ausgelöste Reaktion zu einem beliebigen Zeitpunkt z.B. durch Zukippen von EDTA-Lösung unterbrochen werden. Wird andererseits die Katalysatorlösung erst später zugegeben und die Reaktion dadurch ausgelöst, kann die Vorinkubierung ohne Katalysator gleichsam als Kontrollversuch betrachtet werden. Beide Arten des Vorgehens erlauben eine orientierende Beantwortung der Frage, wie rasch es unter den gewählten Versuchsbedingungen zu einer Neueinstellung der Gleichgewichte im Ansatz kommt, und inwiefern die Reihenfolge der Zusätze für die Geschwindigkeit der Autoxydation von Belang ist.

Wie aus Fig. 3 ersichtlich ist, kann die durch $10^{-5}M$ Cu^{2+} katalysierte Oxydation von Methylhydrazin mittels Zugabe eines EDTA-Überschusses ($10^{-3}M$ EDTA Endkonzentration) vollständig gehemmt werden (= Kurve 3). Ferner geht aus dem Vergleich zwischen den Kurven 2 und 4 in

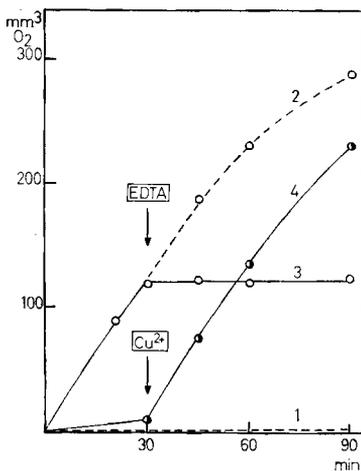


Fig. 3

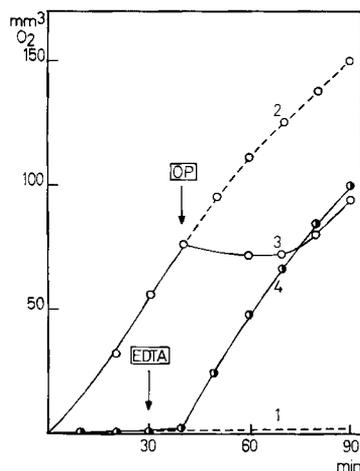


Fig. 4

Fig. 3. *Reversibilität der Cu^{2+} -katalysierten Oxydation von Methylhydrazin I*
Ordinate: O_2 -Verbrauch in mm^3 /Ansatz enthaltend $27,0 \mu\text{Mol}$ Methylhydrazin I. Abszisse: Zeit in Minuten. Pufferung der Ansätze durch $0,05M$ Phosphat, pH 7,0
1 = Ansatz ohne Cu^{2+} ; 2 = Ansatz mit $10^{-5}M$ Cu^{2+} ; 3 = wie 2, jedoch nach 30 min Zugabe von EDTA ($10^{-3}M$ Endkonz.); 4 = wie 1, jedoch nach 30 min Zugabe von $CuSO_4$ ($10^{-5}M$ Endkonz.)

Fig. 4. *Reversibilität der Fe-EDTA-katalysierten Oxydation von Methylhydrazin I*
Ordinate: O_2 -Verbrauch in mm^3 /Ansatz enthaltend $27,0 \mu\text{Mol}$ Methylhydrazin I. Abszisse: Zeit in Minuten. Pufferung der Ansätze mit $0,04M$ TRIS-Puffer, pH 7,5
1 = Ansatz mit $10^{-3}M$ $NH_4Fe(SO_4)_2$ allein; 2 = Ansatz mit $10^{-4}M$ EDTA und $10^{-3}M$ $NH_4Fe(SO_4)_2$; 3 = wie 2, jedoch nach 40 min Zugabe von $3 \cdot 10^{-3}M$ *o*-Phenanthrolin; 4 = wie 1, jedoch nach 30 min Zugabe von $10^{-4}M$ EDTA

Fig. 3 hervor, dass der Zeitpunkt der Cu^{2+} -Zugabe auf das Ausmass der Wirkung ohne Einfluss ist. Das System Fe-EDTA (vgl. Fig. 4) zeigt ein anderes Verhalten: Durch Zugabe einer geeigneten chelatbildenden Verbindung, wie z. B. *o*-Phenanthrolin, gelingt es zwar, die Autoxydation vorübergehend zu unterbrechen; nach kurzer Zeit (~ 30 min) setzt jedoch eine O_2 -Aufnahme wieder ein. In Ansätzen, enthaltend Eisen(II)- oder Eisen(III)-Salze, Methylhydrazin und Puffer, lässt sich die Autoxydation durch EDTA-Zusatz auslösen (vgl. Kurve 4 in Fig. 4). Ein O_2 -Verbrauch, entsprechend demjenigen des – von Anfang an – vollständigen Ansatzes (Kurve 2 in Fig. 4) ist indessen erst ca. 10 min nach erfolgter Zugabe zu beobachten. Diese Latenzzeit weist darauf hin, dass die Neueinstellung der Gleichgewichte zwischen den um das Metall konkurrierenden Chelaten relativ langsam zu erfolgen scheint. Dafür spricht auch der Befund, dass die Anfangsgeschwindigkeit der Methylhydrazinoxidation im System Fe-EDTA von der Reihenfolge der gemachten Zusätze abhängt. So ist z. B. Eisen(III)-sulfat wirksamer, wenn dieses zuerst mit EDTA gemischt und dann zur Pufferlösung (TRIS- oder Phosphat-Puffer) zugesetzt wird, als wenn dieses zuerst mit dem Puffer vereinigt und erst am Schluss mit EDTA versetzt wird. Auf den Befund, dass sich mit Eisen(II)- und Eisen(III)-Salzen ähnliche Effekte erzielen lassen, wird zurückzukommen sein, wenn die Frage nach der Wirkungsweise dieser Fe-Komplexe diskutiert wird.

7. Wirkung von Metallo-Proteiden auf die Autoxydation von Methylhydrazinen. – Im Rahmen dieser Untersuchungen über die mögliche biologische Rolle der Schwermetallkatalyse sind auch einige Kupfer- und Eisen-haltige Proteide auf ihre Aktivität geprüft worden. Vom Coeruloplasmin (der Cu-haltigen Globulinfraktion des Serums) ist bekannt, dass ihm verschiedene Katalysatoreigenschaften zukommen, so z. B. bei der O_2 -Übertragung auf *p*-Phenylendiamin oder Ascorbat [19]. Die Wirkung dieses Kupferproteids ist hier mit derjenigen von Kupfer(II)-Ionen in freier Form und gebunden an unspezifische Proteinträger verglichen worden. In Tabelle 5 ist das Ergebnis eines derartigen Vergleichs wiedergegeben. Diese Daten zeigen, dass auch Coeruloplasmin die Oxydation von Methylhydrazin katalysiert. Wird der Kupfergehalt als Vergleichsbasis genommen, ergibt sich auf Grund dieser Werte ein Aktivitätsverhältnis von (Cu^{2+}): Coeruloplasmin-Cu $\sim 100:1$. Ferner geht aus Tabelle 5 hervor, dass sich die rund hundertmal geringere Aktivität des Coeruloplasmin-gebundenen Kupfers durch inerte Proteine, wie Serumalbumin – sofern im Überschuss zugesetzt – weitgehend unterdrücken lässt.

Tabelle 5. Vergleich der Katalysatorwirkung von Coeruloplasmin und Cu^{2+}

Zusammensetzung der Ansätze: 0,01M Methylhydrazin I (= 27,0 $\mu\text{Mol/Ansatz}$); Phosphatpuffer 0,05M, pH = 7,5. Die Konzentrationsangaben beim Coeruloplasmin beziehen sich auf das darin enthaltene Kupfer (Cu-Gehalt = 0,32%; Mol.-Gew. 159000; 8 Cu/Mol)

Zusätze		O_2 -Verbrauch in $\text{mm}^3/\text{Ansatz}$ nach:		
		60 min	120 min	180 min
Coeruloplasmin	10^{-5}M	<1	<1	<1
	10^{-4}M	3	17	37
	10^{-3}M	112	208	272
Coeruloplasmin	$2 \cdot 10^{-4}\text{M}$	40	94	–
desgl. + 2% Albumin		<1	2	–
CuSO_4	10^{-6}M	8	24	37
	10^{-5}M	125	246	314
	10^{-4}M	326	331	333

Von der grossen Zahl eisenhaltiger Proteide, die im Säuger-Organismus vorkommen, sind die in Tabelle 6 angeführten Verbindungen geprüft worden. Während sich z. B. Ferritin als praktisch unwirksam erwiesen hat, ist Myoglobin als Katalysator für die Oxydation von Methylhydrazinen von bemerkenswerter Aktivität. Dass es sich dabei nicht einfach um eine unspezifische Häminkatalyse handelt, geht aus der ungleichen Wirkung von Myoglobin und Hämoglobin hervor. Der Befund, dass auch Transferrin (= Siderophilin), das Eisen(III)-bindende Protein des Blutplasmas, im Gegensatz zu Ferritin wirksam ist, spricht im selben Sinne.

Tabelle 6. *Katalytische Wirkung verschiedener Eisenverbindungen auf die Autoxydation von Methylhydrizin I*

Ansätze enthaltend 0,01 M Methylhydrizin I (= 27,0 μ Mol/Ansatz); Pufferung durch 0,05 M Phosphat, pH 7,0. Die Zahlenangaben bedeuten O_2 -Verbrauch in $mm^3 O_2$ /Ansatz nach 30 bzw. 120 min Versuchsdauer

	Endkonzentration bezüglich Eisen														
	10 ⁻³ M			3 · 10 ⁻⁴ M			10 ⁻⁴ M			3 · 10 ⁻⁵ M			10 ⁻⁵ M		
	30 min	120 min	30 min	120 min	30 min	120 min	30 min	120 min	30 min	120 min	30 min	120 min	30 min	120 min	
Ferritin	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	
Ferritin + EDTA 10 ⁻⁴ M	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	
Transferrin + NH ₄ Fe(SO ₄) ₂	58	252	38	177	10	72	4	27	4	27	4	27	4	27	
Hämoglobin			14	38	12	25	5	15	5	15	5	15	5	15	
Myoglobin			124	215	94	198	59	151	59	151	28	78	28	78	
Cytochrom c			<1	15	<1	8	1	6	1	6	<1	<1	<1	2	
Meerrettich-Peroxidase			14	25	4	7	<1	2	<1	2	<1	<1	<1	2	
Katalase			<1	<1	<1	23	<1	28	<1	28	<1	<1	<1	20	
(Fe-EDTA)	242	377	139	298	66	178	26	84	26	84	11	42	11	42	

Von anderen Schwermetallverbindungen von biologischem Interesse ist einzig noch Cyanocobalamin (Vitamin B₁₂) geprüft worden, welches 4,3% Co enthält. Vergleicht man (in TRIS-Puffer) die Wirkung von freiem Co²⁺ mit derjenigen von Cyanocobalamin (z. B. 10⁻⁴M oder 3 · 10⁻⁴M Co), zeigt letzteres – im Gegensatz zu den freien Kobalt(II)-Ionen – keine messbare Aktivität.

8. Wirkung von Serumalbumin und Desoxyribonucleinsäure auf die Cu- und Fe-Katalyse. – Da Proteine und Nucleinsäuren gegenüber vielen Metall-Ionen ein ausgeprägtes Komplexbindungsvermögen aufweisen, ist deren Einfluss auf die katalytische Oxydation von Methylhydrazin geprüft worden. Aus Versuchen mit variierten Zusätzen von reinem Serumalbumin geht hervor, dass es im System Methylhydrazin I + Cu²⁺ bereits bei einer Konzentration von 1,0⁰/₁₀₀ die Oxydationsgeschwindigkeit auf den halben Betrag herabsetzt. In Fig. 5 ist das Ergebnis eines derartigen Versuches mit konstanter Kupfer(II)-Konzentration ([Cu²⁺]_t = 10⁻⁴M) und

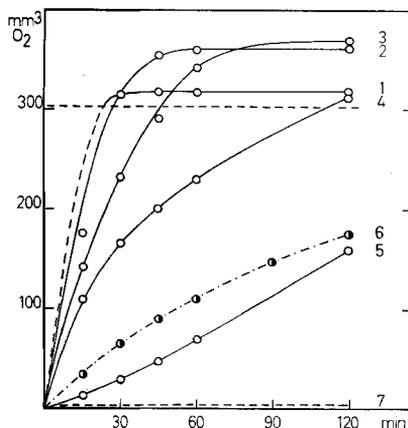


Fig. 5. Einfluss von Serumalbumin auf die Cu²⁺- bzw. Fe-EDTA-katalysierte Oxydation von Methylhydrazin I

Ansätze 1–5 enthaltend 27,0 μ Mol Methylhydrazin I/Ansatz, 10⁻⁴M CuSO₄ und 0,05M Phosphatpuffer, pH 7,5

1 = Kontrolle (kompletter Ansatz ohne Albumin) bzw. mit Zusatz von 0,06 mg/ml Serumalbumin. 2 = desgl. mit 0,2 mg/ml. 3 = desgl. mit 0,6 mg/ml. 4 = desgl. mit 2,0 mg/ml. 5 = desgl. mit 6,0 mg/ml. 6 = Ansätze enthaltend 10⁻⁴M EDTA und 10⁻⁴M NH₄Fe(SO₄)₂ als Katalysator; bei Variation des Albuminzusatzes zwischen 0 und 60 mg/ml resultiert derselbe Kurvenverlauf.

7 = Kontrollen ohne Cu²⁺ bzw. mit Fe³⁺ allein

einem Albuminzusatz von 0,2 bis 6 mg/ml dargestellt. Durch graduelle Erhöhung der Proteinkonzentration kann die Kupfer-katalysierte Autoxydation von Methylhydrazin I nach Belieben gebremst werden. Bei einer Konzentration von 2% Albumin ist die Hemmung praktisch vollständig. Von Interesse ist ferner der Befund, dass die asymptotisch erreichten Werte für den Total-O₂-Verbrauch in Gegenwart geringer Albuminmengen (0,2–0,6 mg/ml) um 10–15% höher liegen als beim Fehlen eines Proteinzusatzes. Das Vorhandensein von Serumalbumin beeinflusst somit nicht nur die Anfangsgeschwindigkeit der durch Cu²⁺ katalysierten Autoxydation von Methylhydrazin I, sondern offenbar auch das Gleichgewicht, das sich im Verlauf der Inkubierung zwischen H₂O₂-Bildung und H₂O₂-Spaltung einstellt. Die Hemmwirkung von Serumalbumin im System Cu²⁺ + Methylhydrazin I lässt sich übrigens auch in Konkurrenzversuchen mit Coeruloplasmin und Albumin (vgl. Tabelle 5) demonstrieren. Im Gegensatz dazu wird die Katalyse mit Fe-EDTA selbst durch höchste Albuminkonzentrationen (bis 100 mg/ml) nicht messbar beeinflusst.

Die Wirkung von Desoxyribonucleinsäure (isoliert aus Kalbsthymus) auf die Cu²⁺-katalysierte Oxydation von Methylhydrazin I ist in Fig. 6 wiedergegeben. Es geht aus dieser Versuchsreihe hervor, dass es bereits bei einer DNS-Endkonzentration von ca. 0,016⁰/₁₀₀ zu einer Verzögerung der Reaktionsgeschwindigkeit auf die Hälfte kommt. Das Komplexbindungsvermögen von

DNS gegenüber Cu^{2+} ist demnach rund 30mal grösser als dasjenige von Serumalbumin. Im Gegensatz zu den Experimenten mit Albumin ist bei höheren DNS-Konzentrationen eine anfängliche Verzögerung («lag») zu beobachten. Vergleicht man die Kurven in Fig. 6 mit denen in Fig. 1, lässt sich trotz der unterschiedlichen Kurvengestalt ersehen, dass $3 \cdot 10^{-5} \text{ M CuSO}_4 + 0,5\text{‰ DNS}$ ungefähr gleich wirksam sind wie 10^{-6} M CuSO_4 bzw. Cu^{2+} . Die durch Eisen-EDTA katalysierte Oxydation von Methylhydrazin wird auch in diesem Falle durch DNS-Zusatz (bis 2‰) kaum beeinflusst. Es kommt zwar bei hoher DNS-Konzentration (4‰) zu einer mässigen Verringerung der Anfangsgeschwindigkeit (ca. 20%). Dieser Hemmeffekt könnte als Konkurrenz zwischen DNS und EDTA um das im Ansatz vorhandene Eisen(III) gedeutet werden; er ist aber möglicherweise auch auf die beträchtliche Viscosität der Ansätze zurückzuführen.

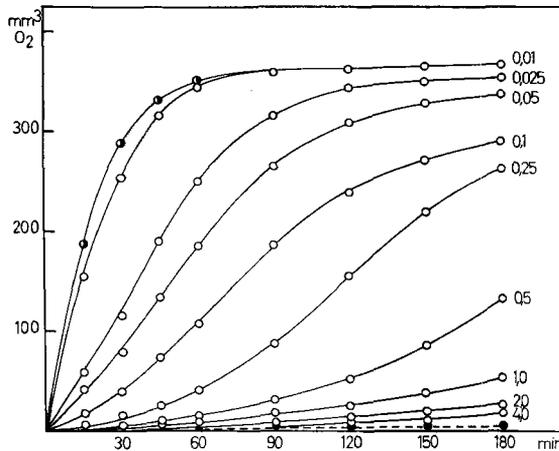


Fig. 6

Wirkung von Desoxyribonucleinsäure auf die Cu^{2+} -katalysierte Oxydation von Methylhydrazin I

Ansätze enthaltend 0,01 M Methylhydrazin I (= $27,0 \mu\text{Mol}/\text{Ansatz}$),
 $3 \cdot 10^{-5} \text{ M CuSO}_4$ und 0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,5

—●— Kompletter Ansatz ohne DNS.
 - - ● - - Kontrollansätze ohne Cu^{2+} bzw. mit 10^{-3} M EDTA .

Die Zahlenangaben 0,01–4,0 geben die DNS Konzentration (mg/ml) im betreffenden Ansatz an.

Der starke Hemmeffekt geringer DNS-Konzentrationen auf die Kupferkatalyse ist bei allen hier untersuchten Methylhydrazinderivaten zu beobachten, allerdings in unterschiedlichem Ausmass (vgl. Fig. 7). Sehr ungleich verhalten sich z. B. die mit 2 Methylhydrazingruppen substituierten Derivate VI und VII. Die Autoxydation von VII (Gruppen in *ortho*-Stellung) wird z. B. im Gegensatz zu derjenigen von VI (Gruppen in *para*-Stellung) durch einen Zusatz von $0,1\text{‰}$ DNS praktisch nicht gehemmt. Dieser Unterschied dürfte darauf zurückzuführen sein, dass die Struktur von VII viel bessere Voraussetzungen für die Bildung eines stabilen Cu^{II} -Komplexes bietet, als dies bei VI sowie auch bei allen einfach substituierten Derivaten der Fall ist. Dies ist ein Hinweis, dass die Geschwindigkeit der Autoxydation nicht zuletzt auch vom Komplexbildungsvermögen der betreffenden Methylhydrazinverbindung für Cu^{2+} abhängt.

Neben diesen definierten Präparaten von Naturstoffen ist schliesslich auch der Einfluss von Rattenleber-Totalhomogenat in variiertter Konzentration auf Kupfer- und Eisen-Katalyse untersucht worden. Wie Tabelle 7 zeigt, ist in beiden Systemen bereits bei sehr kleiner Homogenatkonzentration eine deutliche Verzögerung der Oxydation von Methylhydrazin I festzustellen. Der Hemmeffekt auf die Kupferkatalyse ist auch hier wesentlich stärker, indem bereits bei ca. $0,02\%$ Homogenat die Oxydationsgeschwindigkeit auf den halben Betrag sinkt, was im Falle von Fe-EDTA erst bei einer Homogenatkonzentration von ca. $0,1\%$ der Fall ist.

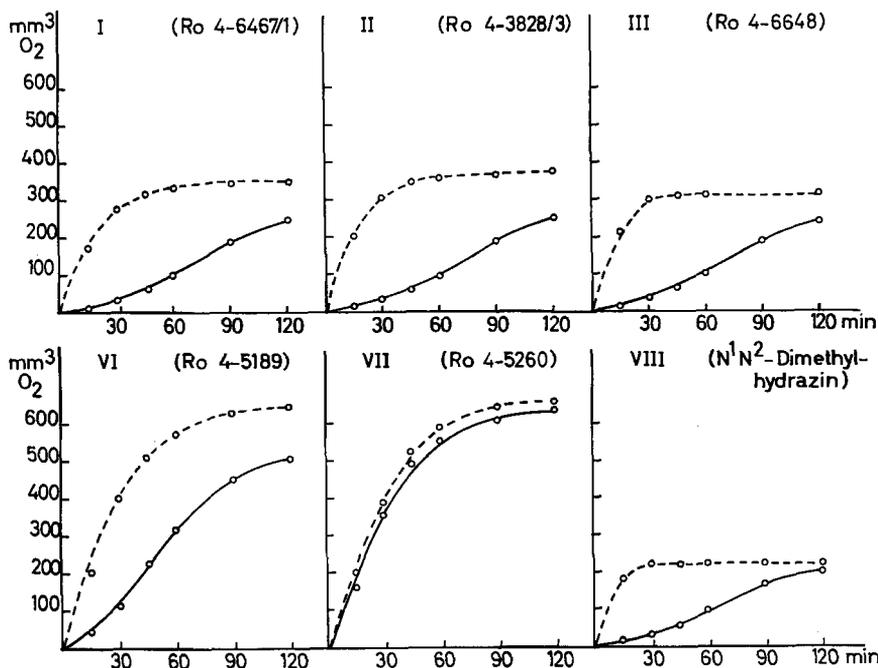


Fig. 7. Wirkung eines Zusatzes von $0,1\text{‰}$ Desoxyribonucleinsäure auf die Geschwindigkeit der Cu^{2+} -katalysierten Autoxydation verschiedener Methylhydrazinderivate. Die Bezeichnungen I-III, VI-VIII beziehen sich auf die in Tabelle 4 aufgeführten Verbindungen

Ordinate: O_2 -Verbrauch in $\text{mm}^3/\text{Ansatz}$; Abszisse: Zeit in Minuten

— = Ansatz mit $0,1\text{‰}$ DNS

- - - = entsprechender Kontrollansatz ohne DNS

Pufferung der Ansätze mit $0,05\text{M}$ Phosphat ($\text{pH } 7,0$); $\text{CuSO}_4 \cdot 3 \cdot 10^{-5}\text{M}$; Methylhydrazinkonzentration 10^{-2}M

Tabelle 7. Wirkung eines Totalhomogenates von Rattenleber auf die Cu- und die Fe-katalysierter Oxydation von Methylhydrazin I

Ansätze enthaltend $0,01\text{M}$ Methylhydrazin I (= $27 \mu\text{Mol}/\text{Ansatz}$), gepuffert mit $0,05\text{M}$ Phosphat, $\text{pH } 7,0$. Zusätze: $3 \cdot 10^{-5}\text{M}$ CuSO_4 bzw. 10^{-4}M EDTA und 10^{-3}M $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$

Zusätze	[Cu^{2+}]			[Fe-EDTA]		
	O_2 -Verbrauch in $\text{mm}^3 \text{O}_2/\text{Ansatz}$ nach					
	30 min	60 min	120 min	30 min	60 min	120 min
Kontrolle ohne Homogenat	224	314	333	55	104	168
+ $0,025\%$ Homogenat	73	176	306	48	95	158
+ $0,1\%$ Homogenat	8	25	47	28	67	130
+ $0,4\%$ Homogenat	4	6	7	18	47	102
+ $1,0\%$ Homogenat	3	2	2	13	31	68

Diskussion

Die Geschwindigkeit, mit welcher ein Methylhydrazinderivat zur entsprechenden Azoverbindung oxydiert wird, hängt von folgenden Faktoren ab: 1. Art und Menge des im System vorhandenen Katalysators; 2. Konzentrationsverhältnis, welches

zwischen den verschiedenen Zusätzen mit chelatbildenden Eigenschaften besteht; 3. Versuchsbedingungen, speziell pH, Temperatur und Konzentration der Reaktionspartner. Die katalytische Wirkung eines bestimmten Schwermetall-Zusatzes stellt demnach eine Resultante dar. Diese ist gegeben durch das Gleichgewicht, das sich zwischen den verschiedenen Liganden, die um das Metall konkurrieren, einstellt, sowie durch die Aktivität der verschiedenen im System vorhandenen Metall-Chelate.

Bei der Kupferkatalyse konkurrieren folgende Verbindungen um die im Unterschuss zugesetzten Kupfer(II)-Ionen: 1. Puffer-Ionen, 2. Chelatbildende Zusätze (EDTA, Penicillamin, Albumin, DNS), und 3. das Substrat – Methylhydrazin – selbst. Da in formaler Hinsicht ein Parallelismus zu den Beobachtungen von WÜTHRICH & FALLAB [4] [20] am System *o*-Phenylendiamin + Cu²⁺ + O₂ besteht, scheint die Annahme berechtigt, dass ein analoger Reaktionsmechanismus auch der Cu²⁺-katalysierten Oxydation von Methylhydrazinen zugrunde liegt. Danach kommt es zunächst zur Bildung eines ternären Komplexes, bestehend aus 2 Substratmolekeln, 1 Cu²⁺ und O₂. Die Bildung dieses O₂-Adduktes, die den Gesamtumsatz begrenzt, wird gefolgt vom eigentlichen Oxydationsvorgang, wobei als Zwischenprodukt Substrat-Radikale nachgewiesen werden konnten [4]. Die Annahme eines derartigen Reaktionsmechanismus für die Methylhydrazinoxidation in Gegenwart von Cu²⁺ würde jedenfalls die beobachteten Hemmeffekte von Puffern und anderen Zusätzen mit Chelateigenschaften zwanglos erklären. Dazu passt auch der Befund, dass Methylhydrazine, die zur Bildung eines 1:2 Cu^{II}-Komplexes besonders günstige Voraussetzungen bieten (z. B. Methylhydrazin VII), am raschesten oxydiert werden und die Geschwindigkeit dieses Vorganges durch Zusätze mit chelatbildenden Eigenschaften (DNS!) nur relativ wenig beeinflusst werden kann.

Der sich bei der Katalyse durch Eisen(II)- und Eisen(III)-Verbindungen abspielende Reaktionsmechanismus ist kürzlich von BERNEIS *et al.* [21] diskutiert worden. Wenn auch ein direkter Nachweis der postulierten Radikale noch nicht gelungen ist, darf der Ablauf der Redox-Reaktionen zwischen Radikalen bzw. Peroxiden und Eisen(II)- bzw. Eisen(III)-Ionen im Sinne einer FENTON-Reaktionskette als sehr wahrscheinlich angesehen werden. Dazu passt der Befund, dass im System Methylhydrazin-Fe-EDTA Zusätze von Eisen(II)- und Eisen(III)-Salzen gleich wirksam sind, offenbar weil es in Gegenwart von O₂ und Methylhydrazin rasch zur Einstellung eines stationären Zustandes zwischen Fe^{II} und Fe^{III} kommt. Die mit verschiedenen Fe-Verbindungen ausgeführten Versuche haben gezeigt, dass nicht nur der Komplex Fe-EDTA katalytisch wirksam ist, sondern dass dies z. B. auch für Myoglobin und Transferrin zutrifft.

Diese Modellversuche sind in erster Linie ausgeführt worden, um die chemische Stabilität der Methylhydrazine in einem «biologischen Milieu» zu untersuchen und um die Frage einer eventuellen Beteiligung katalytischer Oxydationsvorgänge bei der Umsetzung von Methylhydrazinen *in vivo* abzuklären. Zwischen der Situation *in vitro* und derjenigen im Organismus bestehen insofern vergleichbare Verhältnisse, als es in beiden Fällen zuerst durch Dehydrierung des betr. Methylhydrazins zur Bildung des entsprechenden Azoderivates kommt. Ein derartiger Vergleich muss ohnehin auf diesen ersten Schritt beschränkt werden, weil die weitere Umsetzung *in vivo* und *in vitro* verschieden ist (vgl. [12] [22] [23] [24]) und weil sich nur die Bildung der Azoverbindung, nicht aber die darauffolgende Umlagerung und Hydrolyse, direkt manometrisch ver-

folgen lässt. Eine Vergleichbarkeit besteht streng genommen nur dann, wenn das Ausmass der H_2O_2 -Bildung mitberücksichtigt wird (vgl. [10]).

Ob und inwieweit in einem bestimmten Organ Methylhydrazine nicht-enzymatisch, d.h. katalytisch zur entsprechenden Azoverbindung umgesetzt werden, hängt nach den im ersten Abschnitt der Diskussion gemachten Feststellungen vom Gehalt des betreffenden Organs an Spurelementen («Oligoelement-Muster») und an Chelatbildnern («Chelatmuster») ab. Während über die Gesamtkonzentration von Spurelementen in Serum, Leber und Muskulatur einige Angaben vorliegen, lassen sich über die Bindungsverhältnisse derselben nur wenige Aussagen machen. Aus Tab. 8 geht immerhin hervor, dass mehrere Spurelemente im Organismus in einer Konzentration vorkommen, wie sie bei der Autoxydation von Methylhydrazinen im Modellversuch als wirksam befunden worden sind. Eine Übertragung der *in vitro* gemessenen Oxydationsgeschwindigkeit auf die Situation beim Lebenden ist nicht möglich, weil über die Natur der zugehörigen Liganden bzw. die katalytische Aktivität der resultierenden Metallkomplexe nur vereinzelte Informationen vorliegen. Von praktischer Bedeutung dürfte vor allem die katalytische Aktivität von Myoglobin sein, weil dieses Hämoprotein in praktisch allen Zellen, hauptsächlich aber in der quergestreiften Muskulatur zu finden ist. BIÖRCK [26] ermittelte bei der Extremitätenmuskulatur des Menschen einen Myoglobingehalt von 6 mg/g Frischgewebe, entsprechend einer Konzentration von $18 \mu\text{g Fe/g}$ Muskel. AKESON *et al.* [27] fanden bei der Ratte niedrigere Werte (0,7–1,2 mg/g Frischgewebe), was auf das Bestehen beträchtlicher Speziesunterschiede hinweist. Auf Eisen bezogen entspricht dieser letztere Wert einer Konzentration von $4-8 \cdot 10^{-5}\text{M}$. Im *in-vitro*-Experiment bewirkt ein derartiger Myoglobin-Zusatz einen O_2 -Verbrauch von 80–120 $\text{mm}^3 O_2/\text{Ansatz}$ à 2,7 ml/Stunde, was einer Oxydationsrate von 3–4 $\mu\text{Mol Methylhydrazin/ml Lösung/Stunde}$ (bei einer Versuchstemperatur von 30°) entspricht. Das für diesen Vergleich benützte Myoglobinpräparat stammt vom Wal [18]. Bezüglich katalytischer Aktivität muss indessen auch hier mit Speziesunterschieden gerechnet werden.

Die Versuche, die bisher über den Stoffwechsel von Methylhydrazinen beim Säuger ausgeführt worden sind, stimmen darin überein, dass die Dehydrierung von Methylhydrazin I zur Azoverbindung mit relativ hoher Geschwindigkeit abläuft. Auf Grund der von RAAFLAUB & SCHWARTZ [12] publizierten Angaben über die Halbwertszeit von ^{14}C -Natulan (= Methylhydrazin I) im Blut nach einmaliger Belastung, lassen sich Umsatzraten von ca. 0,1 $\mu\text{Mol/g Gewebe/Std. (Mensch)}$ bzw. ca. 1 $\mu\text{Mol/g Gewebe/Std. (Ratte)}$ errechnen; dies unter der Annahme, dass die Geschwindigkeit der Konzentrationsabnahme im Blut weniger durch Einstellung eines Verteilungsgleichgewichtes zwischen Blut und Geweben, als vielmehr durch die Dehydrierung des Substrates im Zellinnern bestimmt wird. Diese Annahme wird durch die Beobachtung gestützt, dass Methylhydrazin I von inkubierten Gewebsschnitten nur wenig akkumuliert wird [28] und dass die Konzentration des entsprechenden Azoderivates im Blut mit etwa gleicher Geschwindigkeit ansteigt [12]. Es darf als feststehend angesehen werden, dass die Demethylierung von $[1-^{14}\text{C}]$ -Natulan zum überwiegenden Teil in der Leber erfolgt [24]. Hingegen ist unbekannt, in welchem Ausmass die einzelnen Organe an der Dehydrierung von Methylhydrazinen beteiligt sind. Die vorliegenden Modellversuche mit Myoglobin haben ergeben, dass die *in vitro* gemessenen Oxydationsraten etwa von derselben Grössenordnung sind, wie die *in vivo* beobachteten Um-

Tabelle 8. *Vorkommen einiger Oligo-Elemente in Serum, Leber und Muskulatur des Menschen*
 Zusammenstellung nach Angaben in der Literatur [25]

Element	Gesamter Körperbestand	Gesamtkonzentration in $\mu\text{g/ml}$ resp. g Frischgewicht (in Klammern = molare Konzentration)	
		Serum	Leber Muskulatur
Eisen	4-5 g	1,0-1,5 (= $1,8-2,7 \cdot 10^{-5} \text{M}$) als Transferrin	ca. 200 (= $3,6 \cdot 10^{-3} \text{M}$) meist als Ferritin davon als Myoglobin: 18 (= $3,6 \cdot 10^{-4} \text{M}$)
Zink	2 g	0,8-1,0 (= $1,2-1,5 \cdot 10^{-5} \text{M}$)	40-80 (= $0,6-1,2 \cdot 10^{-3} \text{M}$)
Kupfer	300 mg	0,8-1,2 (= $1,2-1,8 \cdot 10^{-5} \text{M}$) ca. 95% als Coeruloplasmin	5-8 (= $0,8-1,2 \cdot 10^{-4} \text{M}$)
Mangan	70 mg	0,1-0,5 (= $0,2-1,0 \cdot 10^{-5} \text{M}$)	1-4 (= $1,6-6,3 \cdot 10^{-5} \text{M}$)
Kobalt	20 mg	$1-5 \cdot 10^{-4}$ (= $0,2-0,8 \cdot 10^{-6} \text{M}$) ca. 10% als Vitamin B ₁₂	ca. 0,5 (= 10^{-5}M) 0,05-0,1 (= $0,8-1,6 \cdot 10^{-6} \text{M}$) ca. 50% als Vitamin B ₁₂

sätze. Sie stützen die zunächst unbewiesene Vermutung, dass die Dehydrierung von Methylhydrazinen im Säugerorganismus nicht ausschliesslich enzymatischer Natur zu sein braucht, sondern dass es sich wenigstens teilweise um eine Schwermetall-Katalyse handeln könnte.

Ausgeführt mit Unterstützung durch den SCHWEIZ. NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG (Projekt Nr. 2879).

SUMMARY

1. Autoxidation of natulan and other methylhydrazine derivatives has been investigated by WARBURG's direct manometric method. These compounds are relatively stable in a heavy-metal-free environment at pH 7.0, but are rapidly oxidised if a suitable catalyst is added.

2. Catalytic activity of Cu^{2+} has been found highest, Co^{2+} , V^{3+} , and Mn^{2+} being far less efficient catalysts. Fe complexes or compounds such as Fe-EDTA, siderophilin and myoglobin also stimulate oxidation of methylhydrazines in contrast to free Fe^{2+} , Fe^{3+} , haemoglobin and other haemoproteins.

3. Compounds with chelating activity, such as albumine, deoxyribonucleic acid EDTA and certain buffer ions (*e.g.* pyrophosphate, TRIS) compete for the metal ions and, therefore, strongly inhibit Cu^{2+} -catalysed autoxidation of methylhydrazine compounds.

Medizinisch-chemisches Institut
der Universität Bern

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] L. F. ANDRIETH & P. H. MOHR, *Ind. Engn. Chemistry* **43**, 1774 (1951).
- [2] H. H. STROH & L. EBERT, *Chem. Ber.* **97**, 2335 (1964).
- [3] L. E. EBERSON & K. PERSSON, *J. med. pharmac. Chemistry* **5**, 738 (1962).
- [4] K. WÜTHRICH & S. FALLAB, *Helv.* **47**, 1440, 1609 (1964).
- [5] H. ERLIENMEYER, R. ZELL, H. BRINTZINGER & B. PRIJS, *Helv.* **47**, 792, 876 (1964).
- [6] K. BERNEIS, persönliche Mitteilung vom 26. 5. 64.
- [7] H. BRINTZINGER, R. ZELL & H. ERLIENMEYER, *Helv.* **47**, 1642 (1964).
- [8] K. BERNEIS, M. KOFLER, W. BOLLAG, A. KAISER & A. LANGEMANN, *Experientia* **19**, 129 (1963); K. BERNEIS, M. KOFLER & W. BOLLAG, *ibid.* **20**, 73 (1964); K. BERNEIS, M. KOFLER, W. BOLLAG, P. ZELLER, A. KAISER & A. LANGEMANN, *Helv.* **46**, 2157 (1963).
- [9] W. MANCHOT & J. HERZOG, *Liebigs Ann. Chem.* **376**, 331 (1901).
- [10] H. AEBI, BEATRICE DEWALD & HEDI SUTER, in Vorbereitung.
- [11] J. PÜTTER, *Z. physiol. Chem.* **332**, 1 (1963).
- [12] J. RAAFLAUB & D. E. SCHWARTZ, *Experientia* **21**, 44 (1965).
- [13] S. UDENFRIEND, C. T. CLARK, J. AXELROD & B. B. BRODIE, *J. biol. Chemistry* **208**, 731 (1954).
- [14] C. FLESCH, W. SCHULER & R. MEIER, *Helv.* **43**, 2014 (1960).
- [15] P. ZELLER, H. GUTMANN, B. HEGEDÜS, A. KAISER, A. LANGEMANN & M. MÜLLER, *Experientia* **19**, 129 (1963); W. BOLLAG & E. GRUNBERG, *ibid.* **19**, 129 (1963); A. D'ALESSANDRI, H. J. KEEL, W. BOLLAG & G. MARTZ, *Schweiz. med. Wschr.* **93**, 1018 (1963).
- [16] R. SIGNER & H. SCHWANDER, *Helv.* **33**, 1521 (1950).
- [17] E. R. M. KAY, M. S. SIMMONS & A. L. DOUNCE, *J. Amer. chem. Soc.* **74**, 1724 (1952).
- [18] K. SCHMID, *Helv.* **32**, 105, 1198 (1949).
- [19] R. RICHTERICH, A. TEMPERLI & H. AEBI, *Biochim. biophysica Acta* **56**, 240 (1962).
- [20] S. FALLAB, *Z. naturwiss.-med. Grundlagenforsch.* **7**, 333 (1963).
- [21] K. BERNEIS, M. KOFLER & W. BOLLAG, *Helv.* **47**, 1903 (1964); *Experientia* **20**, 73 (1964).
- [22] V. T. OLIVIERIO & M. G. KELLY, *Symposium on Chemotherapy of Cancer*, Elsevier, Amsterdam 1964.

- [23] G. WEITZEL, F. SCHNEIDER, A. M. FRETZDORFF, K. SEYNSCHE & H. FINGER, *Z. physiol. Chem.* **336**, 271 (1964).
- [24] M. BAGGIOLINI, M. H. BICKEL & F. S. MESSIHA, *Experientia*, im Druck (1965).
- [25] H. AEBI, *Z. f. Präventivmedizin* **1**, 137 (1956); K. B. OLSON, G. HEGGEN, C. F. EDWARDS & L. W. GORHAM, *Science (New York)* **119**, 772 (1954); R. M. PARR & D. M. TAYLOR, *Biochem. J.* **97**, 424 (1964); TH. BERSIN, *Biochemie der Mineral- und Spurenelemente*, Akadem. Verlagsges., Frankfurt 1963.
- [26] G. BRÖCK, *Acta med. scand./Suppl.* **1949**, 226.
- [27] A. ÅKESON, G. V. EHRENSTEIN, G. HEVESY & H. THEORELL, *Arch. Biochem. Biophysics* **91**, 310 (1960).
- [28] F. S. MESSIHA, M. H. BICKEL & M. BAGGIOLINI, in Vorbereitung.

74. Das massenspektrometrische Verhalten quartärer Stickstoffverbindungen

I. Mitteilung

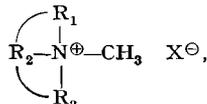
von M. Hesse, W. Vetter und H. Schmid

(8. III. 65)

Zur Aufnahme von Massenspektren organischer Verbindungen ist es notwendig, die Molekeln in der Gasphase einem Elektronenbeschuss auszusetzen. Im Falle von Substanzen, die in einem Molekelgitter kristallisieren, können die Molekeln als solche durch Zufuhr thermischer Energie an den Kristall in die Gasphase übergeführt werden, wobei vorausgesetzt wird, dass die zur Spaltung der Bindungen in einer Molekel erforderliche Energie weit über der zur Herauslösung aus dem Kristall nötigen Energie liegt. Bei solchen Verbindungen kann daher das Molekulargewicht massenspektrometrisch bestimmt werden.

Im Falle von Salzen, die im Kristallzustand ein Ionengitter bilden, ist eine Verdampfung von einzelnen Teilchen erst nach thermischer Umwandlung der Ionen in Neutralpartikel möglich. Hydrohalogenide organischer Basen zum Beispiel werden durch eine Protonenwanderung in die freie Base und Halogenwasserstoff zerlegt. Unabhängig voneinander gehen beide Teile in die Gasphase und geben die ihnen zukommenden Massenspektren, die sich natürlich überlagern. Das «Molekulargewicht» des Salzes, wenn man von einem solchen sprechen will, erhält man durch Addition der Massen der gefundenen Molekel-Ionen unter Berücksichtigung der Stöchiometrie.

Bei Quartärsalzen der Teilstruktur



die auch in vielen natürlichen quartären Alkaloiden enthalten ist, können verdampfbare Molekeln nicht auf diese einfache Weise erhalten werden. In solchen Fällen ist eine tiefer greifende Veränderung des Molekelskeletts nötig, die zu einem tertiären Amin unter gleichzeitiger Neutralisierung des Anions führen muss. Dies bedeutet jedoch, dass es unmöglich ist, das Massenspektrum einer quartären Stickstoffverbindung zu erhalten. Was im günstigsten Falle zu erwarten ist, sind die Massenspektren definierter thermischer Umwandlungsprodukte.