

## SUMMARY

The isolation of ergosine und ergosinine as well as agroclavine from seeds of *Ipomoea argyrophylla* VATKE is described. This is the first case where ergot alkaloids of the peptide type have been found in higher plants.

Pharmazeutisch-chemische Forschungslaboratorien  
SANDOZ A.G., Basel

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 63. Mitteilung: D. STAUFFACHER & H. TSCHERTER, *Helv. 47*, 2186 (1964).  
 [2] A. HOFMANN & H. TSCHERTER, *Experientia 16*, 414 (1960); A. HOFMANN, *Planta medica 9*, 354 (1961); A. HOFMANN & A. CERLETTI, *Deutsche Med. Wochenschrift 86*, 885 (1961).  
 [3] Vgl. A. HOFMANN, «Die Mutterkornalkaloide», Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1964.  
 [4] W. A. TABER & R. A. HEACOCK, *Canadian J. Microbiol. 8*, 137 (1962); W. A. TABER, L. C. VINING & R. A. HEACOCK, *Phytochemistry 2*, 65 (1963); W. A. TABER, R. A. HEACOCK & M. E. MAHON, *Phytochemistry 2*, 99 (1963); D. GRÖGER, *Flora 153*, 373 (1963); H. C. BEYERMAN, A. VAN DE LINDE & G. J. HENNING, *Chemisch Weekblad 59*, 508 (1963); A. H. MARDEROSIAN, R. L. HAUKE & H. W. YOUNGKEN JR., *Economic Botany 18*, 67 (1964); J. W. HYLIN & D. P. WATSON, *Science 148*, 499 (1965).

## 150. Peroxidbildung bei der Autoxydation N<sup>2</sup>-substituierter Methylhydrazine

von H. Aebi, Beatrice Dewald und Hedi Suter

(25. VI. 65)

In Gegenwart eines geeigneten Katalysators werden Methylhydrazin-Verbindungen bei neutraler Reaktion rasch zum entsprechenden Azoderivat oxydiert, wobei gleichzeitig H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. peroxid-äquivalente Produkte (Radikale) entstehen [1]. In einer vorangehenden Arbeit ist die Oxydation verschiedener N<sup>2</sup>-substituierter Methylhydrazine, speziell solcher mit cytotatischer Wirkung, unter verschiedenen Versuchsbedingungen manometrisch verfolgt worden [1a]. Dabei hat sich am Beispiel von 1-Methyl-2-*[p*-(isopropyl-carbamoyl)-benzyl]-hydrazin-HCl (= Methylhydrazin I)<sup>1)</sup> gezeigt, dass neben verschiedenen Schwermetall-Ionen (z.B. Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, V<sup>3+</sup>, Mn<sup>2+</sup>) auch komplexe Eisenverbindungen (z.B. Fe-EDTA, Ferritin, Myoglobin) recht wirksame Katalysatoren dieses Oxydationsvorganges sind. Da sich unter diesen mehrere befinden, die im Organismus ubiquitär vorkommen, besteht die Möglichkeit, dass auch die *in vivo* auftretende Dehydrogenierung der Methylhydrazine (RAAF-LAUB & SCHWARTZ [2]) wenigstens teilweise auf einer Schwermetall-Katalyse beruht.

Von den bisher untersuchten Katalysatoren der Methylhydrazin-Oxydation weisen die meisten auch eine mehr oder weniger ausgeprägte Katalase- bzw. Peroxidase-Aktivität auf. Zahlreiche Schwermetallverbindungen bewirken – besonders wenn an einen geeigneten Träger adsorbiert – bereits in geringer Konzentration (ca. 10<sup>-7</sup>M) eine starke Beschleunigung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Spaltung («Katalase-Modelle» von KRAUSE [3]).

<sup>1)</sup> Markenname NATULAN («Roche»).

Dazu kommt, dass die Aktivität dieser Schwermetall-Ionen bezüglich  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Spaltung auch durch Ligand-Effekte beeinflusst wird [4]. Die praktische Ausnützung der pseudoperoxidatischen Aktivität von Hämverbindungen, z. B. zum Nachweis von Blutspuren, ist allgemein bekannt. Diese Pseudoperoxidasewirkung ist allerdings im Vergleich zur Aktivität der «echten» Peroxidase um einen Faktor  $10^3$ – $10^4$  geringer (vgl. AEBI *et al.* [5]). Die Katalysatoren der Methylhydrazin-Oxydation unterscheiden sich somit nicht nur durch das Ausmass ihrer oxydationsbeschleunigenden Wirkung, sondern auch durch ihr Verhalten gegenüber dem gebildeten Peroxid. Es bestehen die folgenden 3 Möglichkeiten:

1. Der Katalysator beschleunigt die Oxydation von Methylhydrazin zum entsprechenden Azoderivat. Auf Grund seiner hohen «Katalase»-Aktivität bewirkt er, dass gleichzeitig entstehende Peroxide bzw. Radikale sogleich quantitativ weiter umgesetzt werden. Es lässt sich in Gegenwart eines derartigen Katalysators weder mit chemischen noch mit enzymatischen Methoden  $\text{H}_2\text{O}_2$  nachweisen. In diesem Falle wird bei der Oxydation von Methylhydrazinen, z. B. von Natulan, zum entsprechenden Azoderivat pro Mol  $\frac{1}{2}$  Mol  $\text{O}_2$  verbraucht. Beispiele: Fe-EDTA, Myoglobin.

2. Der Katalysator bewirkt zwar eine Beschleunigung der Methylhydrazin-Oxydation, hat jedoch keine  $\text{H}_2\text{O}_2$ -spaltende Wirkung. Es kommt daher zu einer Anhäufung des gebildeten  $\text{H}_2\text{O}_2$  in äquivalenter Menge. Dieser Fall scheint bei der von ERLÉNMEYER *et al.* [6] bzw. BRINTZINGER *et al.* [7] beschriebenen Katalyse durch  $\text{Mn}^{2+}$ -Ionen bzw.  $\text{Mn}^{\text{II}}$ -Komplexe vorzuliegen. Es werden hier pro Mol oxydiertes Methylhydrazin 1 Mol  $\text{O}_2$  verbraucht und 1 Mol  $\text{H}_2\text{O}_2$  gebildet.

3. Die Wirkung des Katalysators auf die Methylhydrazin-Oxydation und die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Spaltung ist von ähnlicher Grössenordnung. Je nach Konzentration des Katalysatorzusatzes kommt es in der Folge zu einer  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Anhäufung von variablem Ausmass. Es sind somit zwischen den Extremfällen 1 und 2 alle Übergänge möglich. Beispiel:  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -Ionen.

In früheren Arbeiten ist entweder der  $\text{O}_2$ -Verbrauch (AEBI *et al.* [1a]) oder die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Anhäufung (BERNEIS *et al.* [1], ERLÉNMEYER *et al.* [6]) als Mass der Methylhydrazin-Oxydation benutzt worden. Sofern Fall 1 vorliegt, ist das Ersthier, bzw. sofern Fall 2 zutrifft, das zweiterwähnte Vorgehen durchaus statthaft. Handelt es sich jedoch um ein System entsprechend Fall 3, lassen sich nur auf Grund einer gleichzeitigen Bestimmung von  $\text{O}_2$ -Verbrauch und  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung verbindliche Aussagen über die effektive Geschwindigkeit von Methylhydrazin-Oxydation und Peroxidbildung machen. Zur Erfassung des  $\text{H}_2\text{O}_2$  und anderer peroxidartiger Reaktionsprodukte sind hier *drei* Versuchsanordnungen benützt worden:

1. Messung des bei Versuchsende in den WARBURG-Ansätzen vorhandenen Wasserstoffperoxids mit der Titansulfat-Methode oder manometrisch durch Zukippen eines Katalase-Überschusses. Beide Methoden erfassen lediglich das am Schluss der Inkubierung noch vorhandene  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

2. Abfangen der während der Inkubierung gebildeten Peroxide bzw. peroxidartig wirkenden Reaktionsprodukte mit Hilfe von  $^{14}\text{C}$ -signiertem Formiat und Katalase. Es handelt sich hier um das Indikator-System, das früher zur Erfassung von strahlengebildetem  $\text{H}_2\text{O}_2$  und oxydierenden Radikalen verwendet worden ist (AEBI *et al.* [8]).

3. Verwendung katalasefreier Erythrocyten als biologisches Testobjekt. Verdünnte Suspensionen derartiger Blutzellen vom Menschen (Träger des Enzymdefektes «Akatalasie») oder von der Ente sind ein empfindliches Reagens auf  $\text{H}_2\text{O}_2$  und andere Oxydationsmittel, indem das darin enthaltene Hämoglobin praktisch stöchiometrisch zu Methämoglobin (= Hämiglobin) umgesetzt wird. Das annähernd vollständige Fehlen der Katalase hat zur Folge, dass akatalatische Zellen im Vergleich zu normalen (katalasehaltigen) Zellen gegenüber  $\text{H}_2\text{O}_2$  rund hundertmal empfindlicher sind (vgl. HEINIGER & AEBI [9]).

Die gleichzeitige Verwendung der drei Versuchsanordnungen zur Erfassung peroxidartiger Reaktionsprodukte gestattet, Aussagen über die chemische Natur

dieser Peroxide zu machen. Es steht zur Diskussion, ob bei der Oxydation von Methylhydrazin-Verbindungen primär  $H_2O_2$  oder Radikale gebildet werden. Nach BERNEIS, KOFLER & BOLLAG [10] ist es wahrscheinlich, dass zwar primär  $H_2O_2$  gebildet, dieses jedoch durch reduktive Aktivierung sekundär in OH-Radikale übergeführt wird (z. B. im Zusammenwirken mit einer FENTON-Reaktionskette). Als Beitrag zur Klärung dieser Frage ist die Peroxidbildung bei der Oxydation von Methylhydrazin-Derivaten mit derjenigen bei der enzymatischen Oxydation von Glucose durch Glucoseoxydase verglichen worden. Sowohl gegenüber dem System Katalase +  $[^{14}C]$ -Formiat als auch in bezug auf die Methämoglobinbildung in katalasefreien Erythrocyten bestehen zwischen diesen beiden Peroxid produzierenden Systemen quantitative und qualitative Unterschiede. Dabei verhält sich enzymatisch gebildetes Peroxid wie Reagens- $H_2O_2$  (vgl. FREI & AEBI [11], AEBI *et al.* [9]), wogegen das bei der Autoxydation von Methylhydrazinen entstehende Peroxid anscheinend wesentlich reaktionsfähiger ist.

### Experimenteller Teil

**1. Methodisches.** – a) *Manometrische Bestimmung des  $O_2$ -Verbrauches.* Die Zusammensetzung der Ansätze und die Inkubierungsbedingungen entsprachen den in der vorangehenden Arbeit gemachten Angaben [1a]. Für die manometrische Bestimmung des nach variiertem Inkubierungsdauer im Ansatz vorhandenen  $H_2O_2$  dienten zweiarmlige WARBURG-Gefäße. Es wurde zu diesem Zweck 0,1 ml Katalaselösung, 0,1 mg Reinzym aus Rinderleber enthaltend, aus dem zweiten Seitenarm in den Hauptraum zugekippt.

b) *Chemische  $H_2O_2$ -Bestimmung.* Die Titansulfat-Methode nach EGERTON *et al.* [12] wurde in der früher beschriebenen Modifikation [8] benützt. Diese beruht auf einer photometrischen Erfassung ( $E_{405}$ ) derjenigen Menge gelber  $(TiO_2, aq.)^{2+}$ -Ionen, welche bei der Einwirkung von  $H_2O_2$  auf Titan(III)-sulfat in schwefelsaurer Lösung gebildet werden. Zu diesem Zweck wurde die Reaktion, im Falle der  $Cu^{2+}$ -Katalyse, durch Zugabe von EDTA ( $10^{-3}M$ ) unterbrochen. Bei den Ansätzen, die Fe-EDTA oder  $Mn^{2+}$  als Katalysator enthielten, wurde auf einen besonderen Zusatz verzichtet, dafür dem Zeitbedarf von der Entnahme der Probe bis zur Photometer-Ablese (5–10 min) Rechnung getragen. Die Eigenfarbe von Reagens und Ansätzen wurde durch getrennte Bestimmung des Reagentien- und Analysen-Leerwertes ( $E_{405}$ ) korrigiert. Die mit Reagens- $H_2O_2$  erstellte Eichkurve erstreckte sich über einen Bereich von 0,05–2,5  $\mu Mol/ml$ .

c) *Versuche mit  $[^{14}C]$ -Formiat und Katalase.* Zum Nachweis bzw. zum fortlaufenden Abfangen peroxidartiger Reaktionsprodukte ist das früher für Bestrahlungsexperimente benützte Indikatorsystem (Katalase +  $[^{14}C]$ -Formiat) übernommen worden. Das Prinzip besteht darin, dass  $[^{14}C]$ -Formiat als H-Donor in Gegenwart von  $H_2O_2$  und Katalase peroxidatisch umgesetzt wird, wobei  $^{14}CO_2$  entsteht (vgl. [11]). Die Zusammensetzung der WARBURG-Ansätze war folgende: Pufferung durch 0,04 M Phosphat (pH 7,0); 0,01 oder 0,04 M  $[^{14}C]$ -Formiat (spezifische Aktivität ca. 2000 Imp.  $min^{-1} \cdot \mu Mol^{-1}$ );  $5 \cdot 10^{-4} M NaHCO_3$  als Träger, ferner ein Katalysatorzusatz und 0,1 mg krist. Katalase; Gesamtlösungsvolumen 2,1 ml. Der Seitenarm enthielt 25,0  $\mu Mol$  Methylhydrazin I in 0,4 ml Lösung. Es resultierte somit nach Zukippen bei Versuchsbeginn eine Endkonzentration an Methylhydrazin I von 0,01 M. Im zentralen Einsatz befand sich 0,2 ml 20-proz. Natronlauge zur Absorption des in die Gasphase übergehenden  $^{14}CO_2$ . Die übrigen Versuchsbedingungen wurden unverändert von der früher beschriebenen Methode [1a] übernommen. Das Vorgehen für die Überführung des in der Lauge absorbierten  $^{14}CO_2$  in messfertige  $Ba^{14}CO_3$ -Plättchen sowie die Messung der Radioaktivität im fensterlosen Durchflusssäher (FH 407/516) ist beschrieben worden [8].

d) *Inkubierung von Suspensionen katalasefreier Erythrocyten.* Die Gewinnung der Blutproben und Herstellung der Erythrocytensuspension wurde bereits beschrieben [9]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde vorwiegend mit Entenblut gearbeitet (Katalase-Aktivität  $\sim 3$  Perborat-Einheiten pro g Hämoglobin). Die zweimal gewaschenen Erythrocyten wurden in isotonischer, phosphatpufferter Kochsalzlösung ( $6,7 \cdot 10^{-3} M$  Phosphat; pH = 7,0) suspendiert. Die Ansätze (meist 30 ml) wurden auf eine Konzentration entsprechend ca. 1,5 mg Hämoglobin/ml eingestellt. Sie wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn mit Eisen-EDTA-Lösung (meist  $10^{-5} M$  Endkonzentra-

tion) und Methylhydrazin I ( $10^{-8}$  M Endkonzentration) versetzt und dann während einer bestimmten Zeit (15–120 min) in einem Inkubator bei  $20^\circ$  rotierend bewegt. Zur Bestimmung von Hämoglobin und Methämoglobin nach FLEISCH [13] wurde eine aliquote Probe (2 ml) entnommen. Die Zellen wurden vom suspendierenden Medium durch scharfes Abzentrifugieren getrennt und das Zellsediment mit 4,0 ml Carbonat-Hydrogencarbonat-Puffer (0,01 M; pH = 9,8) hämolysiert. Nach Abzentrifugieren der Stroma-Anteile wurde das überstehende Hämolysat direkt zur Analyse verwendet. Zur Bestimmung des reduzierten Glutathions wurde eine aliquote Probe (10 ml) des Ansatzes entnommen. Nach Zentrifugieren wurde das Zellsediment mittels 0,5 ml dest. Wasser hämolysiert, die Proteine durch Zugabe von 0,5 ml Metaphosphorsäure (5%) ausgefällt und der Ansatz nach gutem Mischen mit 1,0 ml 0,07 M sek. Na-Phosphat neutralisiert. Nach nochmaliger Zentrifugation wurde 1,0 ml des Überstandes mit 2,0 ml Phosphatpuffer (0,07 M; pH 7,2) versetzt. Die resultierende Lösung diente zur Bestimmung des reduzierten Glutathions nach ELLMANN [14], indem die Extinktion bei 412 nm 5–10 min nach Zugabe von 0,02 ml einer 0,1 M Lösung von DTNB (= 5,5-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure)) gemessen wurde.

e) *Chemikalien und Reagentien.* – *Methylhydrazin-Derivate:* Bezeichnung der Substanzen gemäss dem in der vorangehenden Arbeit gegebenen Schlüssel (Tab. 4 in [1a]). Die meisten Versuche wurden mit 1-Methyl-2-[*p*-(isopropyl-carbamoyl)]-benzyl-hydrazin-HCl (= Methylhydrazin I<sup>1</sup>) ausgeführt. Pufferlösung: Phosphatpuffer nach SÖRENSEN 0,067 M (pH = 7,0). – *Titan(III)-sulfat-Lösung:* Reagens auf Peroxide nach RICHARDSON, enthaltend ca. 19%  $Ti_2(SO_4)_3$  = Stammlösung. Herstellung der Gebrauchslösung: 2 ml Stammlösung, 20 ml  $H_2SO_4$  (95–97%) und ad 100 ml dest. Wasser. – [ $^{14}C$ ]-*Formiat* und [ $^{14}C$ ]-*Acetat*, bezogen vom RADIOCHEMICAL CENTRE AMERSHAM, verdünnt mit inerte Substanz auf eine spezifische Aktivität von  $2100 \text{ Imp. min}^{-1} \mu\text{Mol}^{-1}$ . – *Katalase:* krist. Enzym aus Rinderleber («BOEHRINGER»), ca. 27 000 Einh./mg. – *Katalysatoren:*  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ;  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ;  $NH_4Fe(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$  (alle «MERCK» *pro analysi*). – *Chelatbildner:* EDTA- $Na_2$  (Komplexon III) «SIEGFRIED».

**2. Vergleich zwischen  $O_2$ -Verbrauch und  $H_2O_2$ -Bildung bei der  $Cu^{2+}$ -,  $Fe$ -EDTA- und  $Mn^{2+}$ -katalysierten Oxydation von Methylhydrazin I.** – *Katalyse durch Kupfer(II)-Ionen.* In Gegenwart hoher Katalysatorkonzentrationen ( $[Cu^{2+}] > 10^{-4}$  M) kommt es zu einer raschen, der Theorie entsprechenden  $O_2$ -Aufnahme ( $-11,2 \text{ mm}^3 O_2$  pro  $\mu\text{Mol}$  oxydiertes Methyl-

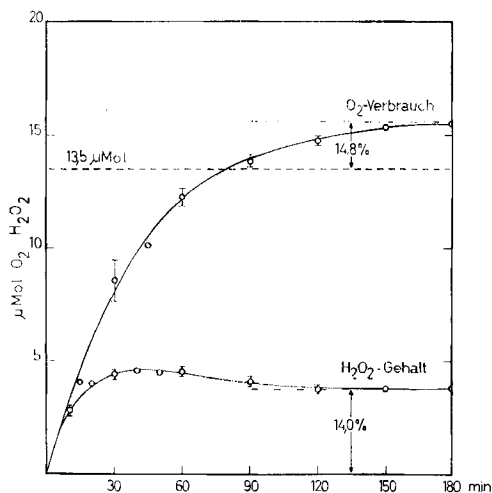


Fig. 1. Oxydation von Methylhydrazin I in Gegenwart von  $10^{-5}$  M  $Cu^{2+}$   
Ordinate:  $O_2$ -Verbrauch bzw.  $H_2O_2$ -Gehalt in  $\mu\text{Mol}/\text{Ansatz}$  à 2,7 ml

$\bar{O}$  = Mittelwert und Standardabweichung aus 5 Experimenten

----- = theoretischer  $O_2$ -Verbrauch, der zur Oxydation von 27,0  $\mu\text{Mol}$  Methylhydrazin I benötigt wird

Abszisse: Zeit in Minuten

hydrazin I). In Ansätzen mit niedrigerer  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration ( $10^{-5} - 3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ) ist demgegenüber ein  $\text{O}_2$ -Verbrauch zu beobachten, der diesen Richtwert wesentlich übersteigt [1a]. In Fig. 1 ist der Verlauf der Zeit-Umsatz-Kurve für den  $\text{O}_2$ -Verbrauch und die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung bei  $[\text{Cu}^{2+}] = 10^{-5} \text{ M}$  wiedergegeben. Es ist daraus ersichtlich, dass es nach Reaktionsbeginn (Zukippen der Methylhydrazinlösung) vorerst zu einer  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Anreicherung von annähernd stöchiometrischem Ausmass kommt. Nach Erreichen eines Höchstwertes von ca.  $1,7 \cdot 10^{-3} \text{ M H}_2\text{O}_2$  nimmt die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration mit fortschreitender Versuchsdauer wieder ab. Der unter diesen Versuchsbedingungen resultierende Mehrverbrauch an  $\text{O}_2$  ( $15,5 - 13,5 = 2,0 \mu\text{Mol}$ ) entspricht dem zu diesem Zeitpunkt im Ansatz noch vorhandenen  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $3,8 \mu\text{Mol}$ ).

Die gleichzeitige Bestimmung von  $\text{O}_2$ -Verbrauch und  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung erlaubt eine Berechnung derjenigen Menge an Methylhydrazin I, welche effektiv zum Azoderivat oxydiert wird. Dieser Wert gibt gleichzeitig an, wieviel  $\text{H}_2\text{O}_2$  theoretisch insgesamt produziert worden ist. Eine derartige Berechnung ist auf Grund der in Tab. I gegebenen Daten für 4  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentrationen durchgeführt worden. Es lässt sich aus den errechneten Prozentzahlen entnehmen, dass das Verhältnis zwischen

Tabelle I. Vergleich zwischen  $\text{O}_2$ -Verbrauch und  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Anhäufung bei der  $\text{Cu}^{2+}$ -katalysierten Oxydation von Methylhydrazin I. – Pufferung der Ansätze durch  $0,05 \text{ M}$  Phosphat, pH 7,0; Methylhydrazin I  $0,01 \text{ M}$  ( $= 27,0 \mu\text{Mol/Ansatz}$ )

Kupferkonzentration	$10^{-4} \text{ M}$			$10^{-5} \text{ M}$				
Versuchsdauer (min)	60	120	180	60	120	180		
$\text{O}_2$ -Verbrauch ( $\mu\text{Mol/Ansatz}$ )	13,4	13,6	13,6	12,3	14,8	15,5		
Angehäuftes $\text{H}_2\text{O}_2$ ( $\mu\text{Mol/Ansatz}$ )	<1	<1	<1	4,5	3,8	3,8		
Berechnete Menge an oxydiertem Methylhydrazin I ( $\mu\text{Mol/Ansatz}$ )	26,8	27,2	27,2	20,0	25,7	27,2		
Angehäuftes $\text{H}_2\text{O}_2$ in % des oxydierten Methylhydrazins I	<1	<1	<1	22,7	14,8	14,0		
Kupferkonzentration	$3 \cdot 10^{-6} \text{ M}$				$10^{-6} \text{ M}$			
Versuchsdauer (min)	60	120	180	300	60	120	180	300
$\text{O}_2$ -Verbrauch ( $\mu\text{Mol/Ansatz}$ )	5,7	9,0	10,6	12,2	2,1	3,8	4,9	6,7
Angehäuftes $\text{H}_2\text{O}_2$ ( $\mu\text{Mol/Ansatz}$ )	4,5	5,5	5,9	6,0	2,3	3,5	4,1	4,9
Berechnete Menge an oxydiertem Methylhydrazin I ( $\mu\text{Mol/Ansatz}$ )	7,0	12,4	15,2	18,3	1,8	4,1	5,7	8,4
Angehäuftes $\text{H}_2\text{O}_2$ in % des oxydierten Methylhydrazins I	63,4	44,4	38,6	33,0	>100	84,0	71,7	58,5

der theoretischen und der bestimmten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Menge mit steigender Katalysatorkonzentration und mit fortschreitender Versuchsdauer graduell abnimmt. Während  $\text{H}_2\text{O}_2$ , z. B. nach einer Versuchsdauer von 60–120 min, in Gegenwart von  $10^{-6} \text{ M Cu}^{2+}$  in annähernd stöchiometrischer Ausbeute zu finden ist, kann dieses in Ansätzen mit  $10^{-4} \text{ M Cu}^{2+}$  gar nicht nachgewiesen werden. Ermittelt man das zu einem bestimmten Zeitpunkt im Ansatz vorhandene  $\text{H}_2\text{O}_2$  manometrisch durch Zukippen eines Katalasefüßchens, erhält man übereinstimmende Resultate. Dies ist jedenfalls dann der Fall, wenn die Enzymzugabe erst gegen Ende der Umsetzung erfolgt. Wird z. B. in einem Experiment, entsprechend Fig. 1 in [1a], nach 180 min Inkubierung allen Ansätzen Katalase zugesetzt, resultiert folgender Befund: Bei denjenigen Ansätzen, die zu diesem Zeitpunkt den theoretischen Endwert bezüglich  $\text{O}_2$ -Verbrauch bereits erreicht haben (z. B. wenn  $[\text{Cu}^{2+}] = 10^{-4} \text{ M}$ ), ist auf die Katalasezugabe hin keine Druckänderung zu beobachten. Demgegenüber bewirkt derselbe Zusatz in den WARBURG-Gefäßen mit einem scheinbar über dem theoretischen Wert liegenden  $\text{O}_2$ -Verbrauch (z. B. wenn  $[\text{Cu}^{2+}] = 10^{-5} \text{ M}$ ) einen sofortigen Druckanstieg im Manometer. Dasselbe ist übrigens bei allen Ansätzen mit unvollständigem Reaktionsablauf zu sehen (z. B. wenn  $[\text{Cu}^{2+}] =$

$10^{-6}M$ ). In diesem letzteren Fall kommt es nach erfolgtem Druckanstieg zu einer starken Verzögerung des weiteren Oxydationsvorganges, vermutlich bedingt durch Bindung der katalytisch aktiven Kupfer(II)-Ionen an das Enzymprotein.

*Katalyse durch Eisenkomplexe (Fe-EDTA).* Ansätze, die  $27,0 \mu\text{Mol}$  Methylhydrazin I sowie Fe-EDTA als Katalysator enthalten, zeigen einen  $O_2$ -Verbrauch, der beträchtlich über den theoretisch zu erwartenden Wert von  $27 \cdot 11,2 = 302 \text{ mm}^3 O_2$  hinausgeht (vgl. Tab. 2 in [1a]). Dieser Wert wird z. B. in Gegenwart von  $10^{-3}M$  Fe-EDTA bereits nach ca. 60 min, bei  $3 \cdot 10^{-4}M$  nach ca. 120 min überschritten. Setzt man zu derartigen Ansätzen Katalase zu, ist keine Druckänderung zu beobachten (vgl. Fig. 2). Die chemische  $H_2O_2$ -Bestimmung nach Inkubierungszeiten von 30–180 min ergibt durchwegs Werte von  $0,3\text{--}0,7 \cdot 10^{-4}M$ , d. h. die an der Erfassbarkeitsgrenze der Methode liegen. Im Gegensatz zur  $Cu^{2+}$ -Katalyse ist hier der höhere  $O_2$ -Verbrauch (bis  $400 \text{ mm}^3 O_2/\text{Ansatz}/3 \text{ Std.}$ ) nicht auf eine  $H_2O_2$ -Anhäufung, sondern auf den Ablauf weiterer  $O_2$ -verbrauchender Reaktionen zurückzuführen. Nach Zufügen von Katalase kommt es auch hier (besonders bei relativ niedriger Fe-EDTA-Konzentration, z. B.  $10^{-4}M$ ) zu einer Verzögerung des weiteren Reaktionsablaufes. Analoge Versuche mit  $3 \cdot 10^{-5}M$  Myoglobin haben ergeben, dass es auch in Gegenwart dieses Katalysators zu keinem Zeitpunkt der Umsetzung möglich ist,  $H_2O_2$  chemisch oder manometrisch nachzuweisen.

*Katalyse durch Mangan(II)-Ionen.* Auch Mangan gehört zu denjenigen Metallen, welche die Oxydation von Methylhydrazin-Verbindungen katalysieren [1a]. Die Abhängigkeit von der Art der Puffer-Ionen ist jedoch eine ganz andere als z. B. im Falle der  $Cu^{2+}$ -Katalyse. Während mit  $Cu^{2+}$  in Phosphat- und TRIS-Puffer hohe Aktivitäten resultieren, wird die Wirkung von  $Cu^{2+}$  in Pyrophosphat stark gehemmt. Demgegenüber ist die Aktivität von Mangan(II)-Ionen in Phosphat- sowie auch in Pyrophosphat-Puffer wesentlich höher als in TRIS-Puffer (vgl. Tab. 2 sowie [1a]).

Tabelle 2. Oxydation von Methylhydrazin I in Gegenwart von Mangan(II)-Ionen als Katalysator: Vergleich der Oxydationsgeschwindigkeit von Methylhydrazin I ( $0,01M$ ) in Phosphat- und Pyrophosphat-Puffer ( $pH 7,0$ ); Hemmbarkeit durch EDTA

Phosphatpuffer ( $0,05M$ )						Pyrophosphatpuffer ( $0,04M$ )					
$Mn^{2+}$	EDTA	$O_2$ -Verbrauch in $mm^3$ nach n Minuten				$Mn^{2+}$	EDTA	$O_2$ -Verbrauch in $mm^3$ nach n Minuten			
		15	30	60	180			15	30	60	180
–	$10^{-3}M$	<1	<1	1	9	–	$10^{-3}M$	<1	<1	<1	7
$10^{-4}M$	$10^{-3}M$	39	84	139	286	$10^{-4}M$	$10^{-3}M$	32	70	129	289
$10^{-4}M$	–	164	330	454	520	$10^{-4}M$	–	86	182	344	529
$10^{-5}M$	–	14	40	85	254	$10^{-5}M$	–	12	25	51	153
$10^{-6}M$	–	<1	<1	3	16	$10^{-6}M$	–	<1	1	4	16

Wie aus Tab. 2 weiter hervorgeht, lässt sich die Wirkung von  $Mn^{2+}$  durch EDTA, selbst wenn im Überschuss zugesetzt, nur unvollständig unterdrücken. Bei der höchsten Katalysatorkonzentration von  $10^{-4}M$   $Mn^{2+}$  resultiert bereits nach 30 bzw. 60 min ein  $O_2$ -Verbrauch, der den theoretischen Wert von  $27 \cdot 11,2 = 302 \text{ mm}^3 O_2$  übertrifft; dieser erreicht bei Versuchsende (180 min) annähernd den doppelten Wert. Wird zu diesen Ansätzen Katalaselösung zugekippt, erfolgt ein rapider Druckanstieg, welcher der Hälfte des zuvor registrierten Druckabfalls bzw.  $O_2$ -Verbrauches entspricht.

Fig. 2 erlaubt einen direkten Vergleich zwischen der katalytischen Wirkung von  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  und Fe-EDTA auf die Oxydation von Methylhydrazin I und  $H_2O_2$ -Anreicherung. Auf Grund des Verlaufs der Zeit-Umsatz-Kurven lässt sich schätzen, dass in  $0,05M$  Phosphatpuffer ( $pH 7,0$ )  $10^{-5}M$   $Cu^{2+}$ ,  $10^{-4}M$   $Mn^{2+}$  und  $10^{-3}M$  Fe-EDTA eine Aktivität von etwa gleicher Größenordnung aufweisen. Die Wirkung der nach 180 min zugesetzten Katalase zeigt, dass Fe-EDTA dem eingangs beschriebenen Typ 1 (= keine messbare  $H_2O_2$ -Anhäufung),  $Mn^{2+}$  dem Typ 2 (=  $H_2O_2$ -Anhäufung in quantitativer Ausbeute) und  $Cu^{2+}$  dem Typ 3 (= partielle  $H_2O_2$ -Anhäufung) zugehören.

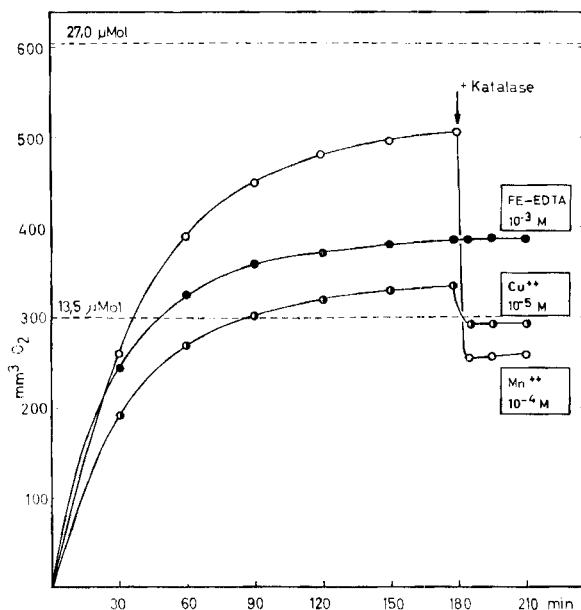


Fig. 2. Oxydation von Methylhydrazin I in Gegenwart von  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  und Fe-EDTA als Katalysator. Bei  $\downarrow$  wurde 0,1 mg Katalase aus dem Seitenarm zugekippt. - - - = Theoretischer  $\text{O}_2$ -Verbrauch (vgl. Fig. 1). Ordinate:  $\text{O}_2$ -Verbrauch in  $\text{mm}^3/\text{Ansatz}$ ; Abszisse: Zeit in Minuten.

Die Oxydation von Methylhydrazin I durch Mangan(II)-Ionen lässt sich ohne Rücksicht auf die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung manometrisch dann verfolgen, wenn den Ansätzen von Anfang an ein Katalase-überschuss zugefügt wird. Es bleibt in diesem Fall, wie aus Tab. 3 ersichtlich, eine  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Anreicherung vollständig aus. Die katalytische Aktivität der  $\text{Mn}^{2+}$ -Ionen wird durch das Enzymprotein (0,1 mg Katalase/Ansatz) nicht gehemmt. Der Katalasezusatz hat bei Proben mit  $10^{-5}\text{M}$  und

Tabelle 3

*Einfluss eines Katalase-Zusatzes auf die Mangan(II)-katalysierte Oxydation von Methylhydrazin I*  
Pufferung der Ansätze durch 0,05 M Phosphat (pH 7,0); Methylhydrazin I 0,01M (= 27,0  $\mu\text{Mol}/\text{Ansatz}$ ). Die mit \*) bezeichneten Werte wurden 5 min nach Zukippen von 0,1 mg Katalase bei  $t = 180$  min erhalten. Die Differenz zu den links daneben stehenden Werten ist ein Mass für die durch den Enzymzusatz gesplattene  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Menge.

$\text{Mn}^{2+}$	Katalase 0,1 mg/Ansatz	$\text{O}_2$ -Verbrauch in $\text{mm}^3$ nach n Minuten				
		30	60	120	180	185
-	-	<1	1	5	9	-
-	+	<1	<1	<1	<1	-
$10^{-5}\text{M}$	-	38	83	167	230	116*)
	+	70	120	191	234	236
$3 \cdot 10^{-5}\text{M}$	-	120	228	364	437	219*)
	+	130	206	260	261	261
$10^{-4}\text{M}$	-	266	400	491	517	257*)
	+	199	264	267	268	268

$3 \cdot 10^{-5} \text{ M Mn}^{2+}$  sogar eine gegenteilige Wirkung, indem die Ansätze mit Katalase – wenigstens anfänglich – einen höheren  $\text{O}_2$ -Verbrauch aufweisen als die entsprechenden Proben ohne Katalase-zusatz. Einzig bei der relativ hohen  $\text{Mn}^{2+}$ -Konzentration von  $10^{-4} \text{ M}$  ergibt sich beim Vergleich der Ansätze mit und ohne Katalase ein Verhältnis bezüglich  $\text{O}_2$ -Verbrauch von ca. 1:2, wie dies theoretisch zu erwarten ist. Fügt man den Ansätzen ohne Katalase nach 180 min Inkubierung 0,1 mg Katalase zu, resultiert in allen Fällen, unabhängig von der  $\text{Mn}^{2+}$ -Konzentration, ein Druckanstieg, der genau dem halben Betrag des zwischen 0 und 180 min registrierten  $\text{O}_2$ -Verbrauches entspricht.

Das verschiedene Verhalten von Ansätzen mit und ohne Katalase ist durch fortlaufende Bestimmung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion weiter zu klären versucht worden. In einer Reihe paralleler Proben,  $10^{-4} \text{ M Mn}^{2+}$  als Katalysator enthaltend, ist zu verschiedenen Zeiten die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Anhäufung chemisch und manometrisch bestimmt worden. Aus Fig. 3 geht hervor, dass sich während der ganzen Versuchsdauer  $\text{O}_2$ -Verbrauch und  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung genau entsprechen ( $-1 \mu\text{Mol O}_2 = +1 \mu\text{Mol H}_2\text{O}_2$ ). Durch Zukippen von Katalaselösung lässt sich zudem zeigen, dass die Oxydation von Methylhydrazin I in den Ansätzen mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Anreicherung offenbar verzögert abläuft. Je später die Katalase zugesetzt wird, desto grösser das Ausmass der Reaktionsverzögerung. Ob dies auf eine echte Aktivitätssteigerung des Katalysators durch den Enzymzusatz oder auf die fortlaufende Beseitigung des (hemmend wirkenden?)  $\text{H}_2\text{O}_2$  zurückzuführen ist, lässt sich zunächst nicht entscheiden.

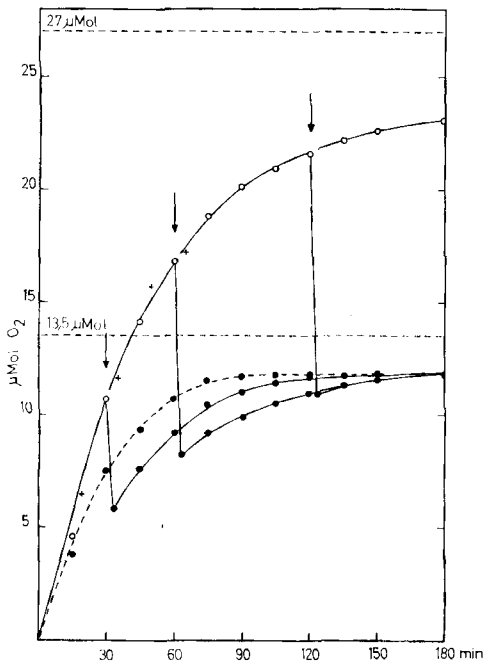


Fig. 3. Oxydation von Methylhydrazin I in Gegenwart von  $10^{-4} \text{ M Mn}^{2+}$

- = Ansätze ohne Katalase
- = Ansätze mit Katalase
- ↓ = Zukippen von 0,1 mg Katalase
- + = chemisch bestimmter  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Gehalt

Ordinate:  $\text{O}_2$ -Verbrauch bzw.  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Gehalt in  $\mu\text{Mol/Ansatz}$  à 2,7 ml. Abszisse: Zeit in Minuten.

Aus Fig. 3 ist schliesslich ersichtlich, dass bei der  $\text{Mn}^{2+}$ -katalysierten Oxydation von Methylhydrazin I ein theoretischer Endwert, entsprechend  $\frac{1}{2} \mu\text{Mol O}_2$  pro  $\mu\text{Mol}$  oxydiertes Methylhydrazin I, selbst bei hoher Katalysatorkonzentration ( $10^{-4} \text{ M Mn}^{2+}$ ) nicht erreicht wird. Auch der zwischen  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ - und Fe-EDTA angestellte Vergleich (Fig. 2) zeigt, dass der nach 3 Std. asymptotisch erreichte Gesamt- $\text{O}_2$ -Verbrauch je nach Art des Katalysators verschieden ist. Während der in Gegenwart von  $10^{-4} \text{ M Cu}^{2+}$  gemessene  $\text{O}_2$ -Verbrauch der Oxydation zum Azoderivat genau entspricht ( $-11,2 \text{ mm}^3 \text{ O}_2/\mu\text{Mol}$  Methylhydrazin I), ist der nach 3 Std. mit  $10^{-4} \text{ M Mn}^{2+}$  erzielte Umsatz ca. 15% kleiner. Mit Fe-EDTA ( $10^{-3} \text{ M}$ ) wird dieser theoretische Wert bei 3stdg. Inkubierung dagegen um ca. 30% überschritten.



**3. Versuche mit  $^{14}\text{C}$ -Formiat und Katalase.** –  $^{14}\text{C}$ -Formiat in verdünnter wässriger Lösung wird durch stark oxydierend wirkende Partikel, wie z. B. OH-Radikale, in  $^{14}\text{CO}_2$  übergeführt, ohne dass Enzyme dazu nötig wären. Eine Oxydation von Formiat durch das weniger reaktionsfähige Wasserstoffperoxid kann dagegen nur erfolgen, wenn Katalase zugegen ist. Beide Reaktionen spielen sich z. B. bei der Einwirkung ionisierender Strahlen auf wässrige Lösungen von Formiat ab [8]. Wie die folgenden Versuche zeigen, reagieren auch die bei der Oxydation von Methylhydrazin gebildeten Oxydationsprodukte – je nach Art des Katalysators – mit  $^{14}\text{C}$ -Formiat teils direkt, teils nur in Gegenwart von Katalase.

Inkubiert man  $^{14}\text{C}$ -Formiat zusammen mit Methylhydrazin I und Kupfer(II)-sulfat in einem phosphatgepufferten Milieu, wird im Ansatz  $^{14}\text{CO}_2$  freigesetzt. Wie aus Tab. 4 hervorgeht, ist dazu im Falle der Cu-Katalyse kein Enzymzusatz erforderlich. Die Bildungsrate für  $^{14}\text{CO}_2$  ist im Gegenteil rund 3mal höher, wenn Katalase im Ansatz fehlt. Der verschiedene  $\text{O}_2$ -Verbrauch in Proben mit und ohne Katalase ist – auf Grund der oben (Seite 1384) gemachten Feststellungen – teils auf  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Anhäufung, teils auf Bindung von  $\text{Cu}^{2+}$  an das Enzymprotein zurückzuführen. Die entsprechende Differenz bei der  $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung ist indessen wesentlich grösser als der unterschiedliche  $\text{O}_2$ -Verbrauch erwarten lässt. Weiter ist zu berücksichtigen, dass Katalase als Häm-inverbindung an sich eine geringfügige Wirkung auf die Methylhydrazin-Oxydation ausübt (vgl. zweitletzte Zeile, Tab. 4).

Auf Grund der in Tab. 4 (letzte Zeile) gegebenen Werte für  $\text{O}_2$ -Verbrauch und  $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung kann der Prozentsatz an Peroxid berechnet werden, der effektiv zur Formiatoxydation gebraucht

Tabelle 4

*Gekoppelte Oxydation von  $^{14}\text{C}$ -Formiat zu  $^{14}\text{CO}_2$  in Gegenwart von  $\text{Cu}^{2+}$  und Methylhydrazin I*  
Versuchsbedingungen: Methylhydrazin I und  $^{14}\text{C}$ -Formiat je  $25,0 \mu\text{Mol}/\text{Ansatz}$ ;  $\text{NaHCO}_3$  (Träger)  $0,001\text{M}$ ;  $\text{CuSO}_4$  als Katalysator  $10^{-5}\text{M}$ ; Katalase  $0,1 \text{ mg}/\text{Ansatz}$ ; Pufferung durch Phosphat  $0,024\text{M}$  (pH 7,0). Versuchsdauer 2 Std.

$^{14}\text{C}$ -Formiat $0,01\text{M}$	Katalase $0,1 \text{ mg}/$ Ansatz	$[\text{Cu}^{2+}]$ $10^{-5}\text{M}$	Methyl- hydrazin I $0,01\text{M}$	$\text{O}_2$ -Verbrauch $\text{mm}^3/\text{Ansatz}/$ 2 Std.	$^{14}\text{CO}_2$ -Bildung $10^{-3} \mu\text{Mol}/$ Ansatz/2 Std.
+	–	+	–	1	1
+	–	–	+	2	13,5
+	–	+	+	312	1418
+	+	–	–	3	11
+	+	–	+	5	71
+	+	+	+	226	491

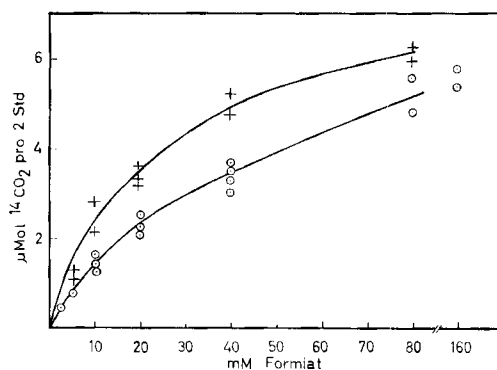


Fig. 4. Bildung von  $^{14}\text{CO}_2$  aus  $^{14}\text{C}$ -Formiat in Gegenwart von  $0,01\text{M}$  Methylhydrazin I ( $\circ$ ) bzw.  $0,02\text{M}$  Ascorbat (+) und  $10^{-5}\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  als Katalysator

Ordinate:  $^{14}\text{CO}_2$  in  $\mu\text{Mol}/2$  Std. pro Ansatz. Abszisse: Formiatkonzentration (mM).

worden ist. Theoretisch entspricht ein O<sub>2</sub>-Verbrauch von 226 mm<sup>3</sup> der Oxydation von 226 : 11,2 = 20,2 μMol Methylhydrazin I bzw. der Bildung von 20,2 μMol Peroxid bzw. der Oxydation von 20,2 μMol [<sup>14</sup>C]-Formiat. Da aber im betreffenden Ansatz 0,49 μMol <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> gebildet worden ist, ergibt sich eine Ausbeute von 0,49 : 20,2 = 2,4%. Für den Ansatz ohne Katalase resultiert nach Korrektur des O<sub>2</sub>-Verbrauches für die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Anhäufung (vgl. Tab. 1) eine Ausbeute von 5,8%. Die Höhe der Ausbeute hängt indessen stark von den Versuchsbedingungen, speziell von der Formiatkonzentration ab. Die Beziehung zwischen <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Bildung und Formiatkonzentration ist in Fig. 4 dargestellt. Es besteht im Bereich von 2,5–80 mM [<sup>14</sup>C]-Formiat eine Konzentrationsabhängigkeit. Die Ausbeute beträgt selbst bei 160 mM Formiat lediglich 15–20%. Im Gegensatz dazu ergibt sich bei der Formiatoxydation mittels enzymatisch produziertem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, unter sonst vergleichbaren Bedingungen, eine Ausbeute von 70–90% der Theorie [11] [15].

Ein Vergleich der katalytischen Wirkung von Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> und Fe-EDTA auf die <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Bildung aus [<sup>14</sup>C]-Formiat führt zu dem in Tab. 5 wiedergegebenen Resultat. In diesem Experiment ist eine relativ hohe Formiatkonzentration von 0,04 M gewählt worden. Dies erklärt die gegenüber Tab. 4 höheren Werte für die <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Bildung. Bei den gewählten Katalysatorzusätzen wird Methylhydrazin I (25,0 μMol = 280 mm<sup>3</sup> O<sub>2</sub>) innert 120 min vollständig zum Azoderivat oxydiert. Das Ausmass der <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Bildung aus [<sup>14</sup>C]-Formiat hängt hingegen stark von der Art des zugesetzten Katalysators ab. Die höchsten Werte zeigen die Ansätze mit Fe-EDTA, in denen ca. 8 μMol Formiat (bei einem theoretischen Maximum von 25 μMol) oxydiert werden. Dabei ist es belanglos, ob Katalase im Überschuss zugegen ist oder nicht. Während die hemmende Wirkung eines Katalasezusatzes auf die Cu<sup>2+</sup>-Katalyse unter diesen Versuchsbedingungen noch stärker in Erscheinung tritt (<sup>14</sup>CO<sub>2</sub> ohne Katalase : <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> mit Katalase ~5:1), ist bei Verwendung von Mn<sup>2+</sup> als Katalysator gerade das Gegenteil der Fall: Ohne Enzym wird nur wenig <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> aus [<sup>14</sup>C]-Formiat gebildet; mit Enzym resultiert ein rund zehnmal grösserer Umsatz.

Tabelle 5. Vergleich der <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Bildung in Ansätzen mit Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> oder Fe-EDTA als Katalysator für die Oxydation von Methylhydrazin I

Ansätze enthaltend: Phosphatpuffer 0,033 M (pH 7,0); 0,01 M Methylhydrazin I (= 25,0 μMol/Ansatz); 0,04 M [<sup>14</sup>C]-Formiat (= 100 μMol/Ansatz); NaHCO<sub>3</sub> als Träger 0,0005 M; Katalase 0,1 mg/Ansatz.

Katalysator	O <sub>2</sub> -Verbrauch mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> /Ansatz nach 2 Std.		<sup>14</sup> CO <sub>2</sub> -Bildung 10 <sup>-3</sup> μMol/Ansatz nach 2 Std.	
	ohne Katalase	mit Katalase	ohne Katalase	mit Katalase
Cu <sup>2+</sup> 10 <sup>-4</sup> M	327	255	4600	> 857
Mn <sup>2+</sup> 10 <sup>-4</sup> M	369	275	343	< 3678
Fe-EDTA 10 <sup>-3</sup> M	381	348	7885	~ 8000

Die Radikalnatur der Reaktionsprodukte, welche bei der Cu<sup>2+</sup>-Katalyse entstehen, lässt sich nicht nur auf Grund der Entbehrlichkeit eines Katalasezusatzes bei der gekoppelten Oxydation von [<sup>14</sup>C]-Formiat beurteilen. Dazu dienen auch Versuche mit oxydablen Substraten, welche nicht in den Spezifitätsbereich der Katalase fallen. So wird z. B. [1-<sup>14</sup>C]-Acetat im Modellversuch mit Katalase, Glucoseoxydase und Glucose praktisch nicht umgesetzt.

In Gegenwart von Cu<sup>2+</sup> und Methylhydrazin I wird dagegen auch [1-<sup>14</sup>C]-Acetat, in allerdings geringerem Umfang als Formiat, zu <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> oxydiert. In Ansätzen mit 0,016 M [1-<sup>14</sup>C]-Acetat, 0,01 M Methylhydrazin I und 10<sup>-5</sup> M Cu<sup>2+</sup> wird in 120 min ca. 0,1 μMol, im Kontrollansatz ohne Methylhydrazin I ca. 0,005 μMol <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>/Ansatz gebildet.

Zu Vergleichszwecken wurde auch untersucht, wie sich die Reaktionsprodukte, die bei der Oxydation von Ascorbat entstehen, gegenüber [<sup>14</sup>C]-Formiat verhalten. Wie aus Tab. 6 ersichtlich, ist das System Ascorbat, Cu<sup>2+</sup>, [<sup>14</sup>C]-Formiat dem System Methylhydrazin I, Cu<sup>2+</sup>, [<sup>14</sup>C]-Formiat in jeder Hinsicht sehr ähnlich. Ein Zusatz von Katalase ist auch hier entbehrlich und wirkt eher hemmend. Die in Fig. 4 vergleichshalber eingezeichnete Abhängigkeit der <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Bildung von der Formiatkonzentration zeigt denselben Verlauf wie er mit Methylhydrazin I und Cu<sup>2+</sup> zu beobachten ist.

Tabelle 6. *Gekoppelte Oxydation von  $^{14}\text{C}$ -Formiat zu  $^{14}\text{CO}_2$  in Gegenwart von  $\text{Cu}^{2+}$  und Ascorbat*  
 Versuchsbedingungen: Ascorbat 0,02 M;  $^{14}\text{C}$ -Formiat 0,01 M;  $\text{NaHCO}_3$  (Träger) 0,001 M;  $\text{CuSO}_4$  als Katalysator  $10^{-5}$  M; Katalase 0,05 mg/Ansatz. Pufferung durch Phosphat 0,026 M (pH 6,5);  
 Versuchsdauer 2 Std.

$^{14}\text{C}$ -Formiat 0,01 M	Katalase 0,05 mg	$[\text{Cu}^{2+}]$ $10^{-5}$ M	Ascorbat 0,02 M	$\text{O}_2$ -Verbrauch $\text{mm}^3/\text{Ansatz}/$ 2 Std.	$^{14}\text{CO}_2$ -Bildung $10^{-3} \mu\text{Mol}/$ Ansatz/2 Std.
+	-	+	-	6	2
+	-	-	+	12	93
+	-	+	+	800	2550
+	+	+	-	<1	4
+	+	-	+	8	268
+	+	+	+	680	1250

Theoretisch bestünde die Möglichkeit, auch das Indikatorsystem Meerrettich-Peroxidase + *o*-Dianisidin, das früher in Bestrahlungsversuchen benützt worden ist [5], dafür zu verwenden. Versuche mit dieser Zielsetzung haben indessen zu keinem verwertbaren Resultat geführt. Dies ist u. a. darauf zurückzuführen, dass Methylhydrazin I bzw. die Reaktionsprodukte, welche bei der Inkubierung mit Hämverbindungen entstehen, die Aktivität dieses Enzyms stark hemmen. Es beträgt der  $I_{50}$ -Wert für Meerrettich-Peroxidase  $5 \cdot 10^{-5}$  M, derjenige für Myeloperoxidase  $1,5 \cdot 10^{-4}$  M. Demgegenüber wird die Aktivität von krist. Leberkatalase bezüglich  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Spaltung selbst durch 0,01 M Methylhydrazin I überhaupt nicht beeinflusst.

**4. Erythrocyten als Indikator für die Peroxidbildung.** – Werden Erythrocyten in einem Medium suspendiert, welches u. a. Methylhydrazin I und einen geeigneten Katalysator enthält, kommt es in den Erythrocyten zu folgenden, phasenweise ablaufenden Veränderungen. Vorerst nimmt der Gehalt an reduziertem Glutathion ab. Hat dieser einen bestimmten Mindestwert unterschritten, setzt Oxydation des Hämoglobins zu Methämoglobin (= Hämiglobin) ein. Die Geschwindigkeit, mit der diese Vorgänge ablaufen, hängt vor allem von der Geschwindigkeit der

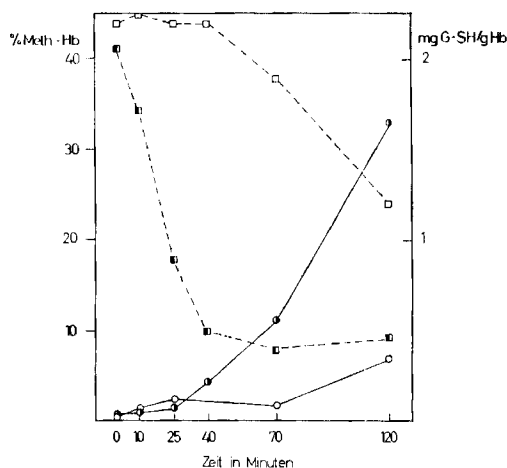


Fig. 5. *Oxydation von Hämoglobin und reduziertem Glutathion in Erythrocyten vom Menschen, inkubiert in einem Medium, enthaltend  $10^{-3}$  M Methylhydrazin I und  $10^{-4}$  M Fe-EDTA*

○ □ = normale Zellen, ● ◐ = akatalatische Zellen. Ordinate: links: Methämoglobinbildung in Prozent (—); rechts: Gehalt an reduziertem Glutathion in mg/g Hämoglobin (---). Abszisse: Zeit in Minuten.

Methylhydrazin-Oxydation bzw. von der Katalysatorkonzentration ab. Für diesen Zweck sind im Prinzip alle Katalysatoren verwendbar. Fe-EDTA ist insofern zu bevorzugen, als dieser Eisen-Komplex hinsichtlich Aktivität durch Protein-Bindungseffekte kaum beeinflusst wird. Bei normalen Menscherythrocyten sind die erwähnten Effekte nur bei relativ hoher Peroxid-Bildungsrate bzw. hoher Katalysatorkonzentration zu beobachten. Bei praktisch katalasefreien Zellen ist dies jedoch bereits bei wesentlich kleinerer Peroxidbildungsrate der Fall. Fig. 5 gibt die Verhältnisse wieder, wie sie sich bei Zusatz von  $10^{-4}$ M Fe-EDTA als Katalysator ergeben. In Kontroll-

Tabelle 7. *Peroxidbildung, Hämoglobin- und Glutathion-Oxydation in akatalatischen Erythrocyten (Ente) bei Inkubierung in einem Medium, enthaltend  $1,0 \cdot 10^{-3}$ M Methylhydrazin I und Fe-EDTA als Katalysator*

Pufferung durch 0,01M Phosphat (pH 7,0). Konzentration der Suspension entsprechend 1,5 mg Hämoglobin/ml (= Anteil der intrazellulären Phase ca. 0,5%).

	Endkonzentration an Fe-EDTA		
	$10^{-5}$ M	$3 \cdot 10^{-5}$ M	$10^{-4}$ M
O <sub>2</sub> -Verbrauch (Mol O <sub>2</sub> · ml <sup>-1</sup> · Std. <sup>-1</sup> )	$0,40 \cdot 10^{-6}$	$0,70 \cdot 10^{-6}$	$1,6 \cdot 10^{-6}$
Theoretische Peroxidbildung (Mol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> · ml <sup>-1</sup> · Std. <sup>-1</sup> )	$0,80 \cdot 10^{-6}$	$1,4 \cdot 10^{-6}$	$3,2 \cdot 10^{-6}$
Methämoglobinbildung (Mol · ml <sup>-1</sup> · Std. <sup>-1</sup> )	$7,5 \cdot 10^{-9}$	$1,0 \cdot 10^{-8}$	$1,3 \cdot 10^{-8}$
Zur Oxydation benötigte Mindestmenge an Peroxid (ber. als Mol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> · ml <sup>-1</sup> · Std. <sup>-1</sup> )	$1,5 \cdot 10^{-8}$	$2,0 \cdot 10^{-8}$	$2,6 \cdot 10^{-8}$
Desgleichen, bezogen auf die theoretisch gebildete Menge Peroxid	1,85%	1,44%	0,81%
Abnahme an reduziertem Glutathion (Mol · ml <sup>-1</sup> · Std. <sup>-1</sup> )	$1,57 \cdot 10^{-8}$	$3,82 \cdot 10^{-8}$	$6,85 \cdot 10^{-8}$
Äquivalente, zur Oxydation von G-SH benötigte Menge Peroxid	$7,8 \cdot 10^{-9}$	$1,91 \cdot 10^{-8}$	$3,42 \cdot 10^{-8}$
Desgleichen, bezogen auf die theoretisch gebildete Menge Peroxid	1,0%	1,36%	1,07%

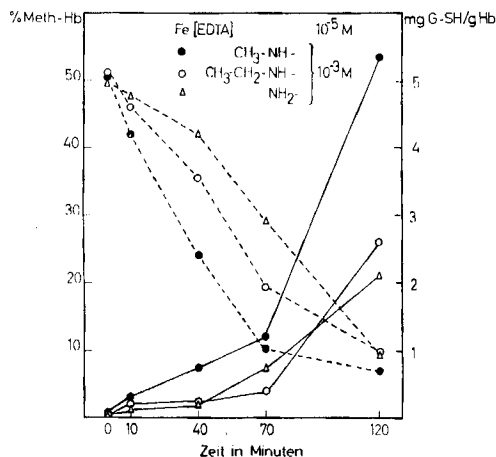


Fig. 6. *Oxydation von Hämoglobin und reduziertem Glutathion in Enten-Erythrocyten, inkubiert in einem Medium, enthaltend  $10^{-5}$ M Fe-EDTA und verschiedene Hydrazinderivate*

● = Methylhydrazin I; ○ = Äthylderivat; Δ = Desmethylderivat; je  $10^{-3}$ M.

Weitere Angaben siehe Legende zu Fig. 5.

ansätzen ohne Fe-EDTA ist in beiden Fällen weder eine Methämoglobinbildung, noch eine Konzentrationsabnahme an reduziertem Glutathion zu beobachten.

Durch fortlaufende Messung des  $O_2$ -Verbrauches lässt sich die Oxydationsgeschwindigkeit der zugesetzten Methylhydrazin-Verbindung berechnen. Dabei darf der  $O_2$ -Verbrauch der Erythrocyten unter den gegebenen Versuchsbedingungen (1,5 mg Hb/ml Blut  $\sim$ 1:100 verdünnt), gestützt auf Kontrollexperimente mit und ohne Zellen, vernachlässigt werden. Die Auswertung einer Reihe mit Entenerythrocyten ausgeführter Versuche ergibt, dass die in den Zellen beobachtete Oxydation des Hämoglobins zu Methämoglobin und diejenige des reduzierten Glutathions nur 1–2% der insgesamt gebildeten peroxidartigen Reaktionsprodukte ausmachen (vgl. Tab. 7).

Die Geschwindigkeit, mit welcher unter gegebenen Versuchsbedingungen Peroxid produziert wird, hängt auch von der Art der Substituenten am  $N^1$  und  $N^2$  ab [1a] [16]. Im Hinblick auf die Frage, ob zwischen Peroxidbildung und biologischer Wirkung ein Zusammenhang besteht, interessiert vor allem der Einfluss der Substituenten am  $N^1$ . Ein derartiger Vergleich zwischen Methylhydrazin I und dem entsprechenden Äthyl- und Desmethyl-Derivat, welche beide biologisch inaktiv sind, ist in Fig. 6 wiedergegeben. Daraus geht hervor, dass sich alle 3 Verbindungen grundsätzlich gleich verhalten, dass aber quantitative Unterschiede bestehen. So wird z. B. das homologe äthylsubstituierte Derivat etwas langsamer oxydiert (vgl. Tab. 4 in [1a]); Methämoglobin- und Glutathion-Gehalt der Erythrocyten werden dementsprechend in geringerem Ausmass verändert, als dies bei Zusatz von Methylhydrazin I der Fall ist.

### Diskussion

Die qualitativen Unterschiede, die bei der Methylhydrazin-Oxydation in Gegenwart von Fe-EDTA,  $Cu^{2+}$  und  $Mn^{2+}$  auftreten, gestatten die Aufstellung verschiedener Katalysator-Typen. Es ist jedoch zu betonen, dass es sich bei den gewählten Unterscheidungskriterien (vgl. Tab. 8) zunächst um rein empirische Gesichtspunkte handelt. Auf die Frage, inwieweit man berechtigt ist, die in Gegenwart von Fe-EDTA auftretenden Reaktionsprodukte mit der Wirkung ionisierender Strahlen in Parallele zu setzen, wird an anderer Stelle eingegangen [17]. Zur Gegenüberstellung von Eisen- und Mangan-Katalyse ist ferner zu bemerken, dass zwischen beiden Typen Übergänge bestehen (z. B.  $Cu^{2+}$ -Katalyse). Es fragt sich überhaupt, ob hier streng genommen von Extremfällen gesprochen werden darf. Einerseits ist auch in Gegenwart von  $Mn^{2+}$  ein kleiner Anteil der Formiatoxydation nichtenzymatischer Natur, was auf das Vorhandensein geringer Mengen oxydierender Radikale schliessen lässt. Andererseits

Tabelle 8  
Vergleich zwischen Fe-EDTA- und  $Mn^{2+}$ -katalysierter Methylhydrazin-Oxydation

	Typ: Fe-EDTA	Typ: $Mn^{2+}$
Verhalten des gebildeten «Peroxids»	(im kurzfristigen Versuch) nicht als $H_2O_2$ fassbar	$H_2O_2$ wird quantitativ angereichert
Reaktionsfähigkeit des «Peroxids» z. B.	gross	relativ gering
Oxydation von [ $^{14}C$ ]-Formiat	Katalase nicht erforderlich (Oxydation nicht enzymatisch)	Vorwiegend peroxidatische Umsetzung mit Katalase
Analogie bezüglich Reaktionsfähigkeit	Radikale: $\dot{O}H$ , $H\dot{O}_2$ , $H$ usw. (z. B. Wirkung ionisierender Strahlen auf $H_2O$ )	Reagens- $H_2O_2$ (z. B. Wirkung von enzymatisch produziertem $H_2O_2$ )

ist möglich, dass auch bei der Fe-EDTA-Katalyse  $\text{H}_2\text{O}_2$  in geringer Menge anfällt. UDENFRIED *et al.* [18] ist es indessen auch nicht gelungen bei der Fe-EDTA-katalysierten Oxydation von Ascorbat  $\text{H}_2\text{O}_2$  als solches nachzuweisen. Die hier am Methylhydrazin I erhobenen Befunde passen durchaus in den Rahmen der bei vergleichbaren Systemen gemachten Beobachtungen. So sind heute mehrere «Peroxidase-Modelle» bekannt, in denen Fe-EDTA oder andere Eisenkomplexe als Katalysator dienen [19]. Demgegenüber ist  $\text{Mn}^{2+}$ , zusammen mit einem geeigneten oxydablen Substrat, bereits mehrfach als  $\text{H}_2\text{O}_2$ -produzierendes System für peroxidatische Umsetzungen benützt worden (Seite 141 in [19]).

Der Reaktionsmechanismus, welcher der Autoxydation von Methylhydrazinen zugrundeliegt, ist von BERNEIS *et al.* [1] [10] für die Fe-EDTA-Katalyse und von BRINTZINGER *et al.* [4] für die  $\text{Mn}^{2+}$ -Katalyse diskutiert worden. In beiden Fällen ist ein Radikal-Kettenmechanismus anzunehmen, wobei es zu einem Valenzwechsel des Katalysators ( $\text{Fe}^{2+} \rightleftharpoons \text{Fe}^{3+}$ , bzw.  $\text{Mn}^{2+} \rightleftharpoons \text{Mn}^{3+}$ ) und zur Bildung von Hydrazylnradikalen (R-NH-N-R') als intermediärem Oxydationsprodukt kommt. Nach FALLAB [20] sind indessen zur Erklärung der Wirkungsweise derartiger Modellsysteme verschiedene Deutungen möglich. Das Gleichgewicht, das sich im stationären Zustand zwischen radikal- und peroxid-umsetzenden Reaktionen einstellt, hängt nun sehr von der Art des verwendeten Katalysators ab. Im Falle der Fe-EDTA-Katalyse wird intermediär bei der Autoxydation gebildetes  $\text{H}_2\text{O}_2$  fortlaufend durch  $\text{Fe}^{2+}$  zu  $\dot{\text{O}}\text{H}$  reduziert, wobei sich die  $\dot{\text{O}}\text{H}$  im Sinne einer FENTON-Reaktionskette mit weiteren Molekeln des oxydablen Substrates umsetzen. Im Falle der  $\text{Mn}^{2+}$ -Katalyse bleibt dagegen eine weitere Umsetzung des gebildeten  $\text{H}_2\text{O}_2$  praktisch völlig aus.

Da die Stabilität des  $\text{H}_2\text{O}_2$  wesentlich grösser ist als diejenige der OH-Radikale, ergibt sich bei der «Peroxid»-Bildung in Form von  $\text{H}_2\text{O}_2$  eine ungleich höhere Lebensdauer bzw. grössere Reichweite der oxydierenden Partikel. Dies erklärt die frühere Beobachtung an Suspensionen akatalatischer Erythrocyten, wonach sich enzymatisch gebildetes  $\text{H}_2\text{O}_2$  stöchiometrisch mit Hämoglobin unter Methämoglobinbildung umsetzt [9]. Es diffundiert somit das im suspendierenden Medium gebildete  $\text{H}_2\text{O}_2$  quantitativ in die Erythrocyten hinein und wird dort restlos für die Oxydation von Hämoglobin verbraucht. Im Falle der Fe-EDTA-katalysierten Autoxydation von Methylhydrazin I setzen sich dagegen lediglich 1–2% der theoretisch möglichen Peroxid-Menge in dieser Weise um, vermutlich weil das ausserhalb der Zellen gebildete  $\text{H}_2\text{O}_2$  vom Radikal-Kettenmechanismus praktisch vollständig abgefangen wird.

Das oben skizzierte Verhalten trifft zunächst nur für die Fe-EDTA-katalysierte Oxydation der Methylhydrazine *in vitro* zu. Im Hinblick auf die mögliche biologische Bedeutung dieser Modellversuche sei erwähnt, dass sowohl die Bildungsgeschwindigkeit der peroxidartigen Reaktionsprodukte, als auch die Lage des Gleichgewichtes  $2 \dot{\text{O}}\text{H} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O}_2$ , und damit die Beständigkeit bzw. Reichweite der bei der Methylhydrazin-Oxydation gebildeten Peroxide wesentlich vom Oligoelement- und Chelat-Muster des betreffenden Gewebes abhängen dürften.

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

## SUMMARY

1. Formation of peroxide as produced in autoxidation of N<sup>2</sup>-substituted methylhydrazine derivatives has been studied with the WARBURG technique. The following methods for its detection have been used: (a) chemical and enzymatic estimation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (b) coupled formate oxidation (H<sup>14</sup>COONa → <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>), (c) methemoglobin formation in suspensions of acatalatic red cells as a «biological indicator».

2. Whereas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulates quantitatively when Mn<sup>2+</sup> is used as a catalyst, no accumulation at all can be observed in presence of Fe-EDTA. In copper catalysis the degree of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-accumulation depends on the concentration of the catalyst.

3. The different reactivity of peroxide in either case favours the assumption that in Fe-EDTA-catalysis mainly OH-radicals are formed, whereas in Mn<sup>2+</sup>-catalysis the equilibrium  $2 \cdot \dot{\text{O}}\text{H} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O}_2$  is completely shifted to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Medizinisch-chemisches Institut  
der Universität Bern

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] K. BERNEIS, M. KOFLER, W. BOLLAG, A. KAISER & A. LANGEMANN, *Experientia* **19**, 132 (1963); K. BERNEIS, M. KOFLER, W. BOLLAG, P. ZELLER, A. KAISER & A. LANGEMANN, *Helv.* **46**, 2157 (1963).
- [1a] H. AEBI, BEATRICE DEWALD & HEDI SUTER, *Helv.* **48**, 656 (1965).
- [2] J. RAAFLAUB & D. E. SCHWARTZ, *Experientia* **21**, 44 (1965).
- [3] A. KRAUSE, *Z. anorg. allg. Chem.* **307**, 294 (1959); **307**, 229 (1961); **379**, 12 (1962); A. KRAUSE & I. PLURA, *Naturwiss.* **48**, 693 (1961); **50**, 41 (1963); A. KRAUSE, F. DOMKA, E. KUKIELKA & I. PLURA, *Mh. Chem.* **94**, 466 (1963).
- [4] H. BRINTZINGER & H. ERLLENMEYER, *Helv.* **48**, 826 (1965).
- [5] H. AEBI, A. TEMPERLI, R. GRESSLY, R. OESTREICHER & A. ZUPPINGER, *Helv.* **43**, 1714 (1960); H. AEBI, *Radiation Research Suppl.* **3**, 130 (1963).
- [6] H. ERLLENMEYER, R. ZELL, H. BRINTZINGER & B. PRJIS, *Helv.* **47**, 876 (1964).
- [7] H. BRINTZINGER, R. ZELL & H. ERLLENMEYER, *Helv.* **47**, 1642 (1964).
- [8] H. AEBI, R. GRESSLY, R. OESTREICHER & A. ZUPPINGER, *Helv.* **42**, 2531 (1959); H. AEBI, *Radiation Research Suppl.* **3**, 130 (1963).
- [9] J. P. HEINIGER & H. AEBI, *Helv.* **46**, 255 (1963); H. AEBI, J. P. HEINIGER & E. LAUBER, *Helv.* **47**, 1428 (1964).
- [10] K. BERNEIS, M. KOFLER & W. BOLLAG, *Helv.* **47**, 1903 (1964).
- [11] E. FREI & H. AEBI, *Helv.* **47**, 241 (1958); R. OESTREICHER, *Diss. Med. Fak. Univ. Bern* 1960.
- [12] A. C. EGERTON, A. J. EVERETT, G. J. MINKOFF, S. RUDRAKANCHANA & K. C. SALOOJA, *Analyt. chim. Acta* **10**, 422 (1954).
- [13] H. FLEISCH, *Helv. physiol. Acta* **77**, 318 (1959).
- [14] G. E. ELLMAN, *Arch. Biochem. Biophysics* **82**, 70 (1959).
- [15] H. AEBI, F. STOCKER & MONIKA EBERHARDT, *Biochem. Z.* **336**, 526 (1963).
- [16] H. AEBI & H. SUTER, *Helv. physiol. pharmacol. Acta* **23**, C1 (1965).
- [17] H. AEBI & H. SUTER, in *Vorbereitung*.
- [18] S. UDENFRIEND, C. T. CLARK, J. AXELROD & B. B. BRODIE, *J. biol. Chemistry* **208**, 731 (1954).
- [19] B. C. SAUNDERS, A. G. HOLMES-SIEDLE & B. P. STARK, «*Peroxidase*», Butterworth, London 1964.
- [20] S. FALLAB, *Chimia* **16**, 189 (1962); *Z. nat.-wiss.-med. Grundlagenforschung* **7**, 333 (1963).