

## Das Redoxpotential des Systems Pyritinol/5'-Thiopyridoxin

R. NAUMANN

Kontroll-Laboratorium der E. Merck AG, Darmstadt

(Z. Naturforsch. 23 a, 2106—2108 [1968]; eingegangen am 22. Mai 1968)

The potentials of the system pyritinol/5'-thiopyridoxine were found to agree with the equation

$$E_h = E_0 + \frac{R T}{F} \ln[H^+] - \frac{R T}{F} \ln \frac{[RSH]}{\sqrt{[RSSR]}},$$

$E_0$  was calculated to be 0.08 V.

Measurements were carried out at a mercury electrode (versus SCE). The reduced form, 5'-thiopyridoxine, had been generated first at the same electrode by cathodic reduction of a part of the pyritinol involved.

Systeme des Typs RSSR/RSH sind schon früh hinsichtlich ihres Redoxverhaltens untersucht worden. Obwohl es sich um reversible Redoxpaare handelt, ist die direkte Messung der Potentiale mit Schwierigkeiten verbunden. GHOSH und GANGULI<sup>1</sup> fanden erstmals für  $E_0$  (Cystin) den Wert 0,082 V, der später bestätigt wurde und im Einklang mit anderen thermodynamischen Daten steht<sup>2</sup>. Die Übereinstimmung der Redoxpotentiale verschiedener RSSR/RSH-Systeme hatte sich schon aus kalorimetrischen Messungen durch FRUTON und CLARKE<sup>3</sup> herausgestellt. Neuere Berechnungen von ELDJARN und PIHL<sup>4</sup> zeigten, daß der maximale Unterschied zweier RSSR/RSH-Systeme (z. B.  $E_0$  Cystin —  $E_0$  Glutathion) 0,010 V beträgt. Dies steht in recht guter Übereinstimmung mit den älteren Meßwerten von GHOSH und GANGULI, die für  $E_0$  (Glutathion) 0,068 V fanden<sup>5</sup>.

Die Beziehung, der die Potentiale von Gemischen aus RSSR und RSH gehorchen, lautet:

$$E_h = E_0 + \frac{R T}{F} \ln[H^+] - \frac{R T}{F} \ln \frac{[RSH]}{\sqrt{[RSSR]}}.$$

Sie gilt nur dann, wenn das Potential an einer Quecksilberelektrode gemessen wird, die durch kathodische Reduktion von der anhaftenden Oxydschicht befreit worden ist. Das zeigten GHOSH und GANGULI, die das RSH ebenfalls durch Reduktion an der Quecksilberkathode im Meßgefäß selbst herstellten. Die Versuche dieser Autoren ergaben, daß  $E_0$  nicht unabhängig von [RSSR] ist, wie GREEN vermutet hatte<sup>6</sup>.

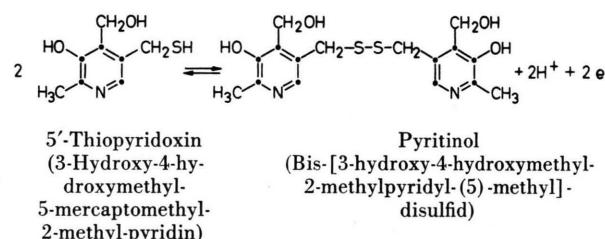
<sup>1</sup> I. CH. GHOSH u. S. CH. GANGULI, Biochem. J. **28**, 381 [1934].

<sup>2</sup> N. TANAKA, I. M. KOLTHOFF u. W. STRICKS, J. Am. Chem. Soc. **77**, 2004 [1955].

<sup>3</sup> J. S. FRUTON u. H. T. CLARKE, J. Biol. Chem. **106**, 667 [1934].

<sup>4</sup> L. ELDJARN u. A. PIHL, J. Am. Chem. Soc. **79**, 4589 [1957].

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, das Normalpotential der folgenden Reaktion zu messen:



Vorversuche hatten gezeigt, daß die potentiometrische Titration des 5'-Thiopyridoxins (PSH) mit Jod-Lösung an einer Pt/SCE-Meßkette einen  $E_0$ -Wert von ca. 0,34 V ergibt. Ähnlich wie bei Cystein<sup>7, 8</sup> wird hier das Potential hauptsächlich durch das Titrationsmittel bestimmt. Ebenso schlugen Versuche, das Pyritinol (PSSP) an einer Pt-Elektrode in sauerstofffreier Atmosphäre elektrolytisch zu reduzieren und anschließend das Potential zu messen, fehl. Offenbar spielt die Quecksilberoberfläche für die Potentialeinstellung eine wesentliche Rolle.

Wir haben daraufhin die Methode von GHOSH und GANGULI übernommen. Danach wurde das PSSP an einer Quecksilberelektrode teilweise zu PSH reduziert. Die sich einstellenden Potentiale wurden anschließend gemessen.

Eine zusätzliche Schwierigkeit ergab sich durch die schlechte Löslichkeit des PSSP im neutralen Bereich. Das zur Anwendung kommende Pyritinol-di-

<sup>5</sup> I. CH. GHOSH u. S. CH. GANGULI, Biochem. Z. **279**, 296 [1935].

<sup>6</sup> D. E. GREEN, Biochem. J. **27**, 678 [1933].

<sup>7</sup> J. W. WILLIAMS u. E. M. DRISSEN, J. Biol. Chem. **87**, 441 [1930].

<sup>8</sup> E. K. FISCHER, J. Biol. Chem. **89**, 753 [1930].



hydrochlorid-monohydrat ist zwar in Wasser (mit saurer Reaktion) löslich; jedoch in Pufferlösungen vom  $p_{\text{H}} > \sim 3 < \sim 10$  fällt sofort die freie Base aus. Deshalb wurde den wässrigen Boratpufferlösungen Pyridin als Lösungsvermittler zugesetzt. Im Gemisch Puffer/Pyridin wurde Elektrolyse und Messung vorgenommen. Der  $p_{\text{H}}$ -Wert wurde im Anschluß an die Potentialmessung bestimmt. Hierzu konnte die Wasserstoffelektrode leider nicht eingesetzt werden. Die Platinoberfläche erlitt durch die Schwefelverbindungen sofort irreversible Veränderungen. Da die Chinhydronelektrode in Gegenwart von Pyridin nicht arbeitet, konnte nur eine Glaselektrode verwendet werden.

### Praktische Durchführung

Als Elektrolysegefäß diente ein doppelwandiger Standkolben von 50 ml Inhalt mit einem seitlich eingeschmolzenen Platindraht, der den Kontakt des am

Boden des Kolbens befindlichen Quecksilbers nach außen herstellte. In den Kolben tauchte ein Stickstoffeinleitungsrohr, das durch einen Hahn wahlweise Durchleiten oder Überleiten des Stickstoffs erlaubte, ferner eine gesättigte Kalomelektrode (SCE) und eine KCl/Agarbrücke, die mit dem anderen Schenkel in den getrennten Anodenraum, d. h. ein Becherglas, gefüllt mit der jeweiligen Pufferlösung, tauchte. Als Anode diente eine Platinnetzelektrode. Der eingeleitete Stickstoff war Reinststickstoff, der zur Entfernung der letzten Spuren Sauerstoff durch ein Glasrohr (5 × 60 cm), gefüllt mit BTS-Katalysator, geleitet worden war. Der BTS-Katalysator war zuvor durch Überleiten von Wasserstoff bei 100–120 °C aktiviert (siehe M. SCHÜTZE: Feinreinigung von Gasen mit einem hochaktiven Kupferkatalysator<sup>9</sup>). Nach Passage des Elektrolyten wurde der Stickstoff durch eine Waschflasche nach außen abgeleitet (s. Abb. 1).

In das Elektrolysegefäß wurden nun 40 ml Boratpufferlösung eingefüllt. Unter ständigem Durchleiten von Stickstoff wurde dann ca. 60 min bei einer Spannung von 2–3 Volt und einer Stromstärke von 10–15 mA vorelektrolytiert. Danach wurde das PSSP·2 HCl

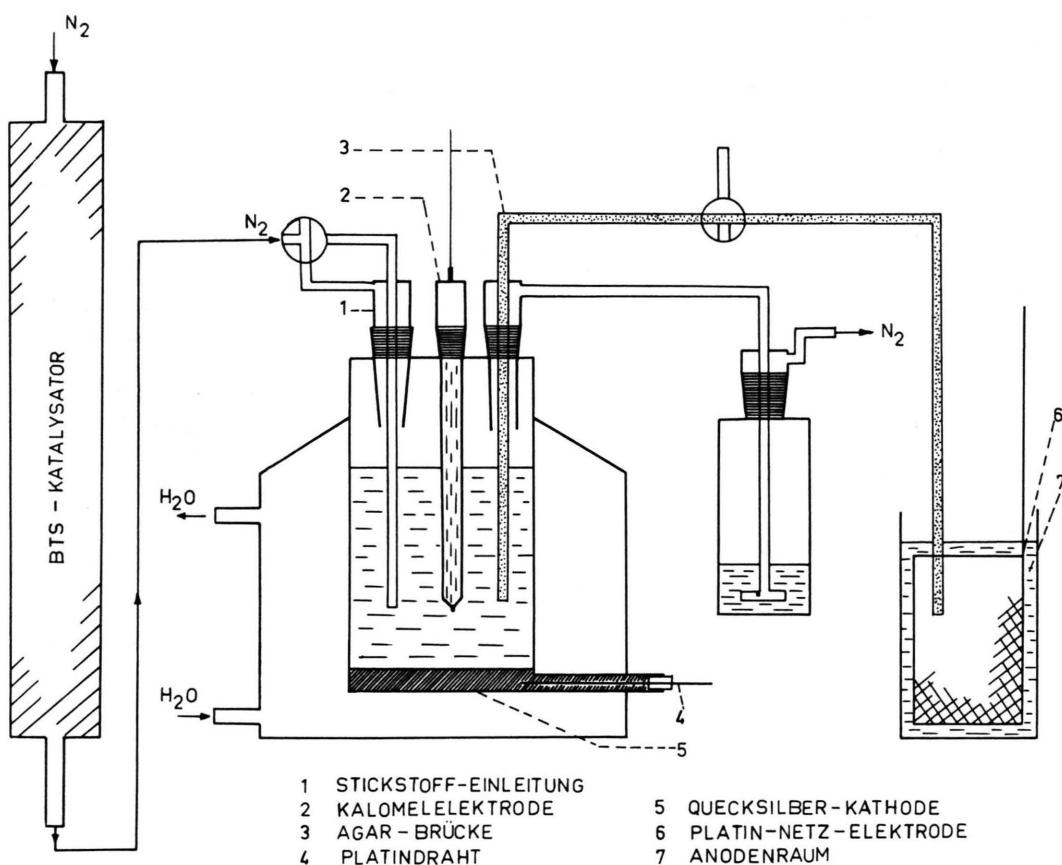


Abb. 1. Versuchsanordnung.

<sup>9</sup> M. SCHÜTZE, Angew. Chem. **70**, 697 [1958].

Versuch Nr.	[PSH] · 10 <sup>3</sup>	[PSSP] · 10 <sup>3</sup>	lg $\frac{[\text{PSH}]}{\sqrt{[\text{PSSP}]}}$	$E_m$ [V]	$E_h$ [V]	$p_{\text{H}}$	$E_0$ [V]	$E_0'$ [V]
1	1,76	2,42	— 1,45	— 0,510	— 0,269	7,49	+ 0,088	— 0,326
2	1,66	2,94	— 1,52	— 0,549	— 0,308	8,02	+ 0,077	— 0,337
3	1,20	3,17	— 1,67	— 0,513	— 0,272	7,48	+ 0,072	— 0,342
4	1,00	3,18	— 1,75	— 0,515	— 0,274	7,50	+ 0,066	— 0,348
5	1,25	3,05	— 1,65	— 0,639	— 0,398	9,88	+ 0,089	— 0,325
6	2,19	2,50	— 1,36	— 0,518	— 0,277	7,54	+ 0,089	— 0,325
7	1,96	2,62	— 1,42	— 0,554	— 0,313	8,06	+ 0,079	— 0,335
Mittelwert							+ 0,080	— 0,334

Tab. 1.

$\cdot \text{H}_2\text{O}$ , gelöst in 10 ml Pyridin, zugesetzt und bei gleicher Spannung weitere 60–90 min elektrolysiert. Nach Beendigung der Elektrolyse wurde der Stickstoffstrom auf Überleiten gestellt und das Potential der Quecksilberelektrode gegen die SCE gemessen. Die Potential-Einstellung dauerte 60–90 min; wenn sich danach das Potential während 30 min nicht mehr als  $\pm 1$  mV änderte, wurde der Wert notiert. Als Meßinstrument diente ein Millivoltmeter Typ 35 (Präzisions-pH-Meter) der Firma Knick mit 0,5 mV Ablesegenauigkeit und einem Eingangswiderstand von  $>5 \times 10^{11} \Omega$ . Nach Abschluß der Potentialmessung wurde das Gefäß geöffnet und aus einem aliquoten Teil der Lösung die Menge des gebildeten PSH durch jodometrische Titration bestimmt. Aus dem gemessenen Potential  $E_m$  (gegen SCE), umgerechnet auf  $E_h$  (gegen NHE), dem  $p_{\text{H}}$ -Wert und den Konzentrationen [PSH] und [PSSP] wurde das  $E_0$  (für  $p_{\text{H}}=0$ ) nach:

$$E_0 = E_h + 0,0591 \left( p_{\text{H}} + \log \frac{[\text{PSH}]}{\sqrt{[\text{PSSP}]}} \right)$$

und das  $E_0'$  (für  $p_{\text{H}}=7$ ) nach:

$$E_0' = E_h + 0,0591 \left( p_{\text{H}} - 7 + \log \frac{[\text{PSH}]}{\sqrt{[\text{PSSP}]}} \right)$$

berechnet.

Die Ergebnisse sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

### Diskussion

Diesen Ergebnissen ist zu entnehmen, daß die Potentiale von PSH/PSSP-Gemischen im  $p_{\text{H}}$ -Bereich von  $\sim 7$  bis  $\sim 9$  von der Gleichung

$$E_h = E_0 - 0,0591 \left( p_{\text{H}} + \log \frac{[\text{PSH}]}{\sqrt{[\text{PSSP}]}} \right)$$

beherrscht werden, wobei  $E_0 = 0,08$  V ist. Da die Potentialmessungen wegen der schlechten Löslichkeit der Substanz nicht bei  $p_{\text{H}}$ -Werten  $< 7 > 2$  durchgeführt werden konnten und andererseits im stark sauren Gebiet keine Potentialeinstellung beobachtet wurde, ist es ratsam, als Resultat der Untersuchungen den Wert

$$E_0' = -0,33 \text{ V}$$

zu betrachten (das Normalpotential, gemessen gegen NHE bei  $p_{\text{H}}=7$  und  $T=25^\circ\text{C}$ ). Als Vergleichsstanz diente Cystin, das – in unserer Apparatur in wässriger Pufferlösung gemessen –  $E_0' = -0,33$  V ergab.

Die relativ große Streuung der Meßwerte (Standardabweichung  $\pm 0,007$  V) führen wir auf die Unsicherheit der  $p_{\text{H}}$ -Messung zurück, die wiederum einerseits durch die schlechte Pufferung der Pyridin/Boratpuffergemische und zum anderen durch die fehlerhafte Anzeige der Glaselektrode bedingt ist. Die Potentialmessung ist wesentlich zuverlässiger, die Abweichungen betragen nicht mehr als  $\pm 0,001$  V. Die Potentiale stellten sich stets sehr stabil ein, ein Zeichen für die Reversibilität des Systems.

Herrn H. HÖLZEL sei für die sorgfältige Ausführung der Messungen gedankt.