Zum Mechanismus der Hydroxylierungen mit molekularem Sauerstoff und Zinn(II)-Komplexen *

VOLKER ULLRICH und HANSJÜRGEN STAUDINGER

Physiologisch-chemisches Institut der Justus Liebig-Universität Gießen

(Z. Naturforschg. **24 b**, 583—588 [1969]; eingegangen am 25. Oktober 1968)

Reduction of molecular oxygen by a stannous phosphate complex in aqueous solution leads to a new species of active oxygen capable of hydroxylating aliphatic and aromatic compounds. The hydroxylation reactions are shown to require two electrons per oxygen molecule reduced. The oxygen atom of the hydroxyl group is completely derived from molecular oxygen. This new mechanism has been proposed as a model for mixed function oxygenases.

Mischfunktionelle Oxygenierungen verlaufen nach der zuerst von MASON¹ aufgestellten Gleichung:

RH = organisches Substrat, DH₂ = Wasserstoffdonator.

Über den entscheidenden Schritt dieser komplexen Reaktion, die Aktivierung des Sauerstoffs, ist bisher nur wenig bekannt.

Auch geeignete Modellsysteme fehlen, da in den bisher beschriebenen Hydroxylierungs-Systemen mit molekularem Sauerstoff und reduzierten Schwermetallionen mindestens zwei chemisch verschiedene Mechanismen nebeneinander ablaufen²⁻⁴. Zum überwiegenden Teil erfolgt die Hydroxylierung in diesen Systemen durch OH-Radikale, die bei der Einelektronen-Reduktion von intermediär gebildetem Wasserstoffperoxid entstehen. Daneben konnten wir noch einen zweiten Hydroxylierungs-Mechanismus nachweisen, der sich von den Hydroxylierungen durch OH-Radikale in charakteristischer Weise unterscheidet. Die Hydroxylierung von Aromaten und Substanzen mit Doppelbindungen erfolgt nach diesem zweiten Mechanismus nicht wie durch OH-Radikale elektrophil, sondern statistisch gleich an allen CH-Bindungen^{3, 5}. Außerdem werden, ebenfalls im Gegensatz zu den Reaktionen der OH-Radikale, aliphatische Verbindungen glatt hydroxyliert⁵. Wegen sei-

ner großen Ähnlichkeit mit den Carben-Reaktionen wurde dieser neue Mechanismus von uns als „Oxen“- oder „Oxenoid-Hydroxylierung“ bezeichnet^{6, 7}.

OH-Radikale können als der „aktive Sauerstoff“ bei enzymatischen Hydroxylierungen aus verschiedenen Gründen ausgeschlossen werden^{7, 8}. Dagegen zeigt der Oxenoid-Mechanismus weitgehende Analogien zu dem Hydroxylierungs-Mechanismus der Monooxygenasen^{4, 7}.

Es blieb noch zu beweisen, daß bei dem Modellmechanismus genau wie bei den enzymatischen Reaktionen zwei Elektronen zur Aktivierung des Sauerstoffs verwendet werden, und daß das eingeführte Sauerstoffatom aus dem molekularen Sauerstoff stammt.

Diese und einige weitere Versuche zur Aufklärung des Oxen-Mechanismus wurden mit dem System Zinn(II)/Phosphat/Sauerstoff durchgeführt, in dem nach unseren früheren Befunden ausschließlich der Oxen-Mechanismus auftritt⁶.

Material und Methoden

Dodecadeuterocyclohexan (Uvasol[®], min. 99-proz.), Cyclohexan (Uvasol[®]), und Folin's Reagenz zur Phenolbestimmung wurden von der Firma E. Merck AG, Darmstadt, bezogen. Das bei den Isotopenexperimenten eingesetzte Wasser mit 5% H₂¹⁸O stammte von der Firma Buchler & Co, Braunschweig. Alle übrigen Reagenzien wurden p.a. verwendet.

* Auszugsweise vorgetragen auf dem Internationalen Symposium über „Microsomes and Drug Oxidations“ in Bethesda, Md., USA, 1968.

¹ H. S. MASON, *Advances in Enzymol.* **19**, 79 [1957].

² HJ. STAUDINGER u. V. ULLRICH, *Z. Naturforschg.* **19 b**, 409 [1964].

³ HJ. STAUDINGER u. V. ULLRICH, *Z. Naturforschg.* **19 b**, 877 [1964].

⁴ V. ULLRICH, D. HEY, HJ. STAUDINGER, H. BÜCH u. W. RUMMEL, *Biochem. Pharmacol.* **16**, 2237 [1967].

⁵ V. ULLRICH, J. WOLF, E. AMADORI u. HJ. STAUDINGER, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **349**, 85 [1968].

⁶ V. ULLRICH, E. AMADORI u. HJ. STAUDINGER, *Z. Naturforschg.* **22 b**, 226 [1967].

⁷ V. ULLRICH u. HJ. STAUDINGER, in: *Biological and chemical aspects of oxygenases*, K. BLOCH and O. HAYAISHI, Eds., Maruzen Company, Tokio 1966.

⁸ V. ULLRICH and HJ. STAUDINGER, on: *International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations*, Bethesda, Md., 1968, im Druck.

Versuche mit $^{18}\text{O}_2$

$^{18}\text{O}_2$ -angereicherter Sauerstoff wurde durch Elektrolyse von 5-proz. H_2^{18}O hergestellt. Dazu diente eine modifizierte Apparatur nach SAMUEL⁹. Vor der Elektrolyse wurde das Wasser mit metallischem Natrium auf eine NaOH-Konzentration von 2-n. gebracht und anschließend mit 18 V bei 0,6 A elektrolysiert. Der entwickelte Sauerstoff wurde in einem Vorratsgefäß unter Quecksilber aufgefangen. Danach wurde die gesamte Apparatur mit dem 50 ml fassenden Reaktionsgefäß mit superreinem Stickstoff gespült und unter Durchleiten von Stickstoff die Acetanilid-Lösung mit der anaeroben Lösung des Zinn(II)-phosphat-Komplexes (zusammen 10,0 ml mit den in Tab. 1 angegebenen Konzentrationen) durch den seitlichen Ansatz eingefüllt. Nach zweimaligem Evakuieren und Spülen mit Stickstoff wurde die evakuierte Apparatur mit dem Sauerstoff unter geringem Überdruck gefüllt und damit die Reaktion unter Rühren gestartet. Während der Reaktion wurden aus dem Reaktionsraum zwei Gasproben über ein P_2O_5 -Trockenrohr entnommen. Nach zwei Std. war die Reaktion vollständig abgelaufen. Die Trennung der *N*-Acetylaminophenole aus fünf Ansätzen erfolgte durch zweimalige Dünnschichtchromatographie an Kieselgel in einem Laufmittel aus Benzol (90), Methanol (16) und Eisessig (8) (v/v/v). Die mit Methylenchlorid extrahierten Kieselgelzonen wurden vom Applikationslabor der Firma Bell & Howell, Friedberg (Hessen), massenspektrometrisch analysiert.

Bestimmung der Stöchiometrie

Die Messung der Sauerstoffaufnahme erfolgte manometrisch in der für die ^{18}O -Experimente verwendeten Apparatur, die durch ein graduiertes Vorratsgefäß ergänzt wurde. In den Reaktionskolben wurden 10 ml *n*-Hexanol gefüllt und durch den zeitlichen Ansatz eine genau abgewogene Menge Zinn(II)-chlorid-Dihydrat gegeben und sofort verschlossen. Im Niveaugefäß ließ

sich der Verbrauch des Sauerstoffs verfolgen. Am Ende der Reaktion wurde die Differenz bestimmt und das Normalvolumen des O_2 auf die iodometrisch bestimmten Reduktionsäquivalente des eingesetzten Zinnchlorids bezogen. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Hexanol mit 10 ml Wasser in dem die theoretisch zu fordernde Stöchiometrie von 4 Elektronen pro O_2 -Molekül gefunden wurde.

Belichtungsversuche

50 ml eines Ansatzes mit den in Tab. 1 angegebenen Konzentrationen wurden in einem 250-ml-Becherglas mit dem Magnetstab gerührt. Je ein Ansatz wurde dabei im Abstand von 30 cm mit einer 300 W Lampe (Osram „Concentra“) bestrahlt, während die Kontrolle völlig verdunkelt wurde. In Abständen von fünf Min. wurden beiden Ansätzen je 2,0 ml entnommen, mit 0,1 ml 5-n. NaOH gestoppt und die Gesamtmenge an gebildeten Phenolen mit dem Folin-Reagenz nach der Methode von KRISCH et al.¹⁰ bestimmt.

Bestimmung der *N*-Acetylaminophenole

Die Aufarbeitung der Ansätze sowie die dünnschichtchromatographische Bestimmung der *N*-Acetylaminophenole erfolgte wie früher von uns angegeben⁵.

Ergebnisse

In allen bisher beschriebenen Systemen zur Hydroxylierung mit molekularem O_2 und reduzierten Schwermetallkomplexen sind sowohl OH-Radikale als auch der Oxen-Mechanismus an der Hydroxylierung beteiligt. Besonders gut läßt sich das an Hand des *o*:*m*:*p*-Verhältnisses bei der Hydroxylierung aromatischer Verbindungen mit Substituenten erster Ordnung zeigen.

<i>t</i> [°C]	System 1 $\text{Fe}^{2+}/\text{EDTA}/\text{O}_2$			Ausbeute [μMol]	System 2 $\text{Fe}^{2+}/\text{EDTA}/\text{Asc}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{N}_2$			Ausbeute [μMol]	System 3 $\text{Sn}^{2+}/\text{HPO}_4^{2-}/\text{O}_2$			Ausbeute [μMol]
	0 [%]	<i>m</i> [%]	<i>p</i> [%]		<i>o</i> [%]	<i>m</i> [%]	<i>p</i> [%]		<i>o</i> [%]	<i>m</i> [%]	<i>p</i> [%]	
0	28	24	48	0,68	48	3	49	0,89	36	35	29	0,41
25	36	14	50	0,64	47	3	50	0,84	34	44	22	0,36
50	40	9	51	0,78	43	3	54	0,78	34	41	25	0,62
100	45	5	50	0,79	44	3	53	0,77	35	35	30	0,72

Tab. 1. Temperaturabhängigkeit der *o*:*m*:*p*-Relationen bei der Hydroxylierung von Acetanilid in Modellsystemen. System 1: 20 μMol $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 30 μMol EDTA, 40 μMol Acetanilid in 2,0 ml 0,1-*m*. Acetatpuffer pH 5,8. 40 Min. unter Schütteln inkubieren. System 2: 5 μMol $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 7,5 μMol EDTA, 30 μMol Ascorbinsäure, 40 μMol Acetanilid, 3 μMol H_2O_2 , in 2,0 ml 0,1-*m*. Acetatpuffer pH 5,8. Inkubationszeit nach H_2O_2 -Zugabe: 5 Min. unter Durchperlen von Stickstoff. System 3: 40 μMol $\text{SnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 200 μMol K_2HPO_4 , 40 μMol Acetanilid in 2,0 ml H_2O . Das Zinnchlorid wird in 0,1 ml 0,1-*n*. H_2SO_4 gelöst und Kaliumphosphat in 0,3 ml H_2O zugegeben. Danach werden 1,6 ml der 0,025-*m*. Acetanilid-Lösung zugefügt. Das pH wird auf 10,5 eingestellt. Es wird 40 Min. unter Schütteln an der Luft inkubiert.

⁹ D. SAMUEL, in: Oxygenases, Academic Press, New York-London 1962, S. 31.

¹⁰ K. KRISCH u. H.-J. STAUDINGER, Biochem. Z. **334**, 312 [1961].

OH-Radikale reagieren streng elektrophil^{11, 12} und bevorzugen daher die *ortho*- und *para*-Stellung, während der Oxen-Mechanismus zu einer mehr statistischen Verteilung der Phenole führt. In einem System, in dem beide Mechanismen vorkommen, ist der relative Anteil beider Mechanismen von der Temperatur abhängig^{3, 4}. Mit steigender Temperatur wird der Oxen-Mechanismus zugunsten der Hydroxylierung durch OH-Radikale zurückgedrängt.

Man beobachtet also eine Zunahme der Selektivität des Angriffs, während bei einem einheitlichen Mechanismus allenfalls eine Abnahme der Selektivität bei Temperaturerhöhung erwartet werden kann¹³.

In Tab. 1 ist die Temperaturabhängigkeit der isomeren *N*-Acetylaminophenole für das System Zinn(II)/Phosphat/O₂ im Vergleich zu den schon früher beschriebenen Systemen Eisen(II)/EDTA/O₂ und Eisen(II)/EDTA/Ascorbinsäure/N₂ (= OH-Radikale) aufgeführt.

Bei der Hydroxylierung von Acetanilid im Zinnsystem ist keine signifikante Verschiebung der *o*:*m*:*p*-Relationen bei Temperaturänderung festzustellen. Das läßt den Schluß zu, daß wie in dem modifizierten Fenton-System auch ein einheitlicher aber anderer Hydroxylierungs-Mechanismus auftritt.

Der Grund für die Sonderstellung des Zinnsystems läßt sich durch einen einfachen Versuch veranschaulichen (Tab. 2):

Durch einen Zusatz von Wasserstoffperoxid entstehen in dem System Fe²⁺/EDTA/O₂ durch Ein-Elektronen-Reduktion OH-Radikale, während der Zinn(II)-Komplex als Zweielektronendonator Wasserstoffperoxid sofort zu Wasser reduziert.

Aus der Kinetik des Zinnsystems geht hervor, daß die Hydroxylierung in einer Reaktion erster Ordnung in bezug auf O₂ und Substrat verläuft (Abb. 1).

Abb. 1. Kinetik der Acetanilid-Hydroxylierung im System Sn²⁺/HPO₄²⁻/O₂; Versuchsbedingungen: s. Tab. 1.

Dagegen ist die Abhängigkeit der Hydroxylierung von dem Zinn(II)-phosphat-Komplex nicht linear; sie besitzt ein Optimum, da sie durch hohe Zinn(II)-Konzentrationen gehemmt wird. Auch Zusätze anderer oxydierbarer Substanzen bewirken eine Hemmung der Hydroxylierung, da sie mit dem Substrat um den „aktiven O₂“ konkurrieren (Tab. 3).

Hemmstoff	Konzentration	Hemmung [%]
Natriumsulfit	2 · 10 ⁻² m.	74
Kaliumbromid	2 · 10 ⁻² m.	64
Cyclohexandicarbonsäure	2 · 10 ⁻² m.	55
Dimethylsulfoxid	2 · 10 ⁻² m.	62
Ammoniumsulfat	2 · 10 ⁻² m.	42
Natriumnitrit	2 · 10 ⁻² m.	88
Mangan(II)-sulfat	2 · 10 ⁻³ m.	92

Tab. 3. Hemmung der Acetanilid-Hydroxylierung im System Sn²⁺/HPO₄²⁻/O₂.

Versuchsbedingungen wie in Tab. 1 angegeben. Die Hemmung wurde kinetisch durch Messung der Gesamtphenole nach KRISCH et al.¹⁰ verfolgt.

	System: Fe ²⁺ /P ₂ O ₇ ⁴⁻ /O ₂				System: Sn ²⁺ /HPO ₄ ²⁻ /O ₂			
	Hydroxyacetanilide <i>o</i> [%]	<i>m</i> [%]	<i>p</i> [%]	rel. Ausbeuten [%]	Hydroxyacetanilide <i>o</i> [%]	<i>m</i> [%]	<i>p</i> [%]	rel. Ausbeuten [%]
Kontrolle	41	17	42	100	34	44	22	100
+ H ₂ O ₂	41	6	53	115	—	—	—	0

Tab. 2. Einfluß von Wasserstoffperoxid auf die Hydroxylierung von Acetanilid. 20 μMol FeSO₄ · 7 H₂O, 60 μMol Na₄P₂O₇ · 10 H₂O, 20 μMol H₂O₂ in 2,0 ml H₂O, pH 10,5. Inkubationszeit 40 Min. unter Schütteln an der Luft. System Sn²⁺/HPO₄²⁻/O₂ wie in Tab. 1 angegeben.

¹¹ R. O. C. NORMAN and G. K. RADDA, Proc. chem. Soc. [London] 1962, 138.

¹² L. M. DORFMAN, A. TAUB, and R. E. BÜCHLER, J. chem. Physics 36, 3051 [1962].

¹³ J. HINE, Reaktivität und Mechanismus, S. 353, Thieme, Stuttgart 1960.

Als besonders wirksame Hemmstoffe erweisen sich Nitrit- und Mangan(II)-ionen.

Es ist bekannt, daß die Autoxydation von Zinn(II)-Salzen durch Belichtung beschleunigt wird¹⁴. Dieser Effekt läßt sich bei dem Zinn(II)-phosphat-Komplex nachweisen und ist bei der Diskussion zum Mechanismus der O₂-Reduktion von Bedeutung (Abb. 2).

Abb. 2. Einfluß von Licht auf die Hydroxylierung von Acetanilid im System $\text{Sn}^{2+}/\text{HPO}_4^{2-}/\text{O}_2$; Konzentrationen wie in Tab. 1 angegeben. Versuchsbedingungen s. unter „Methoden“.

Ein weiterer Hinweis auf den Mechanismus des Systems war durch Messung des Isotopeneffektes bei der Hydroxylierung zu erwarten. Wir verwendeten dazu Cyclohexan und Brombenzol mit ihren entsprechenden vollständig deuterierten Derivaten als Substrate.

Substrat	k_H/k_D
Cyclohexan	
Dodekadeutero-cyclohexan	$1,28 \pm 0,04$
Brombenzol	
Hexadeutero-brombenzol	$1,01 \pm 0,02$

Tab. 4. Isotopeneffekte bei Hydroxylierungen im System $\text{Sn}^{2+}/\text{HPO}_4^{2-}/\text{O}_2$.

Das Ansatzvolumen beträgt 20 ml mit den in Tab. 1 angegebenen Konzentrationen. 0,2 ml des Substrates wurden als organische Phase zugegeben und die Mischung in verschlossenen Schliffgläsern horizontal geschüttelt. Cyclohexanol und Cyclohexanon wurden nach der Extraktion mit 5 ml Essigester auf 0,2 ml eingengt und gaschromatographisch auf einer 2 m Polyäthylenglykol-1500-Säule bei 120 °C getrennt. FID-Detektor, Gaschromatograph F 6, Perkin-Elmer. Die Bromphenole wurden aus dem sauren Ansatz mit 10 ml Äther extrahiert und in 1 ml 0,1-m. NaOH zurückgeschüttelt. Nach Zugabe von 1,0 ml Folin's Reagenz (1:4 verd.) und 1,0 ml 1-m. Na₂CO₃ wurde die blaue Farbe nach 30 Min. bei 578 nm im Photometer gegen den Leerwert bestimmt.

¹⁴ F. A. COTTON u. G. WILKINSON, Anorganische Chemie, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1967, S. 449.

Für Brombenzol läßt sich kein Isotopeneffekt nachweisen. Da eine Substitution von Aromaten jedoch sehr oft über eine Addition an das π -Elektronensystem erfolgt, die geschwindigkeitsbestimmend ist, sind die Versuche mit Cyclohexan aussagekräftiger. Der k_H/k_D -Wert von 1,28 schließt eine Spaltung der CH-Bindung als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt aus, deutet aber doch auf die Existenz eines sekundären Isotopeneffektes hin.

Abb. 3. Stöchiometrie von Elektronen: O₂ im System $\text{SnCl}_2/\text{n-Hexanol}$. Versuchsbedingungen: s. „Methoden“.

Im Hinblick auf die Bedeutung der Oxen-Hydroxylierung als Modellmechanismus für die enzymatischen mischfunktionellen Oxygenierungen war es von großem Interesse, ob das Sauerstoffatom der eingeführten Hydroxylgruppe aus dem molekularen O₂ stammt. Die Ergebnisse der Isotopenexperimente mit ¹⁸O₂ sind in Tab. 5 wiedergegeben:

	Hydroxyacetanilide		
	$\begin{smallmatrix} o \\ [\%] \end{smallmatrix}$	$\begin{smallmatrix} m \\ [\%] \end{smallmatrix}$	$\begin{smallmatrix} p \\ [\%] \end{smallmatrix}$
Einbau von ¹⁸ O	74	98	100

Tab. 5. Einbau von ¹⁸O aus der Gasphase bei der Hydroxylierung von Acetanilid im System $\text{Sn}^{2+}/\text{HPO}_4^{2-}/\text{O}_2$. Versuchsbedingungen: s. „Methoden“.

Die Hydroxylgruppe in *para*-Stellung und auch in der gerade für den Oxen-Mechanismus charakteristischen *meta*-Stellung ist vollständig markiert.

Wesentlich schwieriger läßt sich die Stöchiometrie der Hydroxylierungen bestimmen. Die Kinetik der Reaktion und auch die relativ geringen Ausbeuten an Hydroxylierungs-Produkten bezogen auf die Menge des eingesetzten Zinn(II)-Komplexes lassen erkennen, daß der „aktive O₂“ zu einem überwiegenden Teil zu Wasser reduziert wird. Einer weiteren Erhöhung der Konzentration von Acetanilid sind durch dessen geringe Wasserlöslichkeit Grenzen gesetzt.

Es wurde daher auf die Bestimmung des Produktes verzichtet und Alkohole in hoher Konzentration als Substrate angeboten. Bei diesen Versuchen ergab sich, daß Alkohole und Ketone gut als Komplexbildner für Zinn(II)-chlorid geeignet sind. Dadurch war es möglich, in fast wasserfreiem Medium zu hydroxylieren. Wie aus dem *o*:*m*:*p*-Verhältnis der *N*-Acetylaminophenole (Tab. 6) hervorgeht, ändert sich der Hydroxylierungs-Mechanismus dabei nicht.

System		Ausbeute	Hydroxyacetanilide		
		[μ Mol]	^o [%]	^m [%]	^p [%]
SnCl ₂	Methanol	0,76	54	32	14
	Äthanol	0,96	52	36	12
	n-Propanol	1,69	49	38	13
	n-Butanol	1,28	48	37	15
	n-Hexanol	0,87	48	38	14
	Dioxan	0,15	38	33	29
	Aceton	0,90	56	27	17
	Acetonitril	2,62	58	28	14

Tab. 6. Hydroxylierungen mit Zinn(II)-chlorid und O₂ in organischen Lösungsmitteln.

1 mMol SnCl₂ · 2 H₂O und 20 mMol Acetanilid in 20 ml organischer Phase. Inkubationszeit 3 h unter Schütteln an der Luft. Nach dem Einengen wird der alkalisch gemachte Ansatz dreimal ausgeäthert. Die *N*-Acetylaminophenole extrahiert man aus Ammoniumacetat-gepufferter Lösung in Äther. Die angegebenen Werte sind Mittel aus zwei Versuchen.

Der Zinn(II)-Hexanol-Komplex erwies sich wegen der etwas geringeren Autoxydations-Geschwindigkeit als am besten geeignet für die Stöchiometrieversuche. Als Hydroxylierungs-Produkte findet man die entsprechenden Hexandiole. Trotz der sehr hohen Substratkonzentration tritt auch in diesem System neben der Hydroxylierung noch eine Reduktion des aktiven O₂ zu Wasser ein. Die Stöchiometrie läßt sich jedoch ermitteln, wenn man das Verhältnis von eingesetztem Zinn(II)-Komplex zu O₂-Verbrauch in Abhängigkeit von der Zinnkonzentration untersucht.

Bei Extrapolation auf unendlich kleine Zinn-Konzentration erhält man eine Stöchiometrie von 2 Molen Elektronen pro Mol Sauerstoff.

Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen unsere früheren Vermutungen, daß die bei der Autoxydation von Zinn(II)-Komplexen zugesetzten Substrate nach einem neuen, einheitlichen Mechanismus hydroxyliert werden können. Obwohl bisher noch keine direkten Methoden zur Untersuchung des Me-

chanismus dieser O₂-Aktivierung gefunden wurden, lassen sich doch indirekt durch die Bestimmung der Hydroxylierungs-Produkte Hinweise auf den neuen Mechanismus erhalten.

Wasserstoffperoxid hemmt die Hydroxylierungen; es kann daher als Zwischenstufe bei der Entstehung des „aktiven O₂“ ausgeschlossen werden. Die Eigenschaft des zweiwertigen Zinns bei der Oxydation zwei Elektronen abzugeben, sowie die Versuche zur Stöchiometrie zusammen mit den ¹⁸O₂-Experimenten lassen nur die Deutung zu, daß der aktive O₂ die Oxydationsstufe eines „O₂-Atoms“ besitzt. Dafür sprechen außerdem die schnelle Reaktion des aktiven O₂ mit dem Zinn(II)-Komplex unter Wasserbildung und die hohe Reaktionsgeschwindigkeit gegenüber aliphatischen Verbindungen. Damit ist eine weitgehende Ähnlichkeit mit den Carben- oder Carbenoid-Reaktionen vorhanden, so daß der Begriff „Oxen“- oder „Oxenoid“-Mechanismus für diese Reaktionen zutrifft.

Die Gesamtreaktion läßt sich demnach durch die folgende Gleichung beschreiben:

Aus dem Fehlen eines primären Isotopeneffektes läßt sich schließen, daß die Spaltung der CH-Bindung nicht im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt verläuft. *k*₂ muß demnach größer sein als *k*₁. Diese Aussage wird gestützt durch die Beobachtung, daß Belichtung die Hydroxylierungs-Geschwindigkeit steigert. Die Strahlung muß daher den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt beschleunigen, wahrscheinlich durch eine Anregung des O₂-Moleküls. Mit Eisen(II)- und Kupfer(I)-Komplexen, bei den durch die besondere Elektronen-Konfiguration eine Spinumlagerung umgangen werden kann¹⁵, findet die Reaktion mit O₂ wesentlich schneller statt, und man beobachtet keinen Einfluß von Licht auf die Hydroxylierung¹⁶.

Über die elektronische Struktur des „aktiven O₂“ im System Sn²⁺/HPO₄²⁻/O₂ lassen sich noch keine Angaben machen.

Da der Oxen-Mechanismus in erster Linie als Modell für die mischfunktionellen Oxygenierungen untersucht wurde, bleibt noch seine Bedeutung für die enzymatischen Hydroxylierungen zu diskutieren. Als bisher einziger Mechanismus erfüllt die Hydroxy-

¹⁵ L. L. INGRAHAM, Biochemical mechanisms, S. 68, Wiley, New York-London 1962.

¹⁶ V. ULLRICH, unveröffentlicht.

lierung mit Zinn(II)-Komplexen und O₂ die Bedingungen der MASONschen Gleichung.

Dennoch ist der aktive O₂ mit Sicherheit nicht identisch mit der aktiven Species der Monooxygenasen, da die enzymatischen Hydroxylierungen elektrophil verlaufen^{8, 17} und sich dadurch von den völlig unselektiven Substitutionen der Oxen-Hydroxylierung unterscheiden. Dieses abweichende Verhalten kann in einer unterschiedlichen Reaktivität des hydroxylierenden Teilchens bestehen. Eine solche Zunahme der Selektivität könnte durch eine Komplexbildung und Stabilisierung des aktiven Sauerstoffs an dreiwertigem Eisen oder zweiwertigem Kupfer eintreten, die fast immer als essentielle Faktoren bei der enzymatischen O₂-Aktivierung beteiligt

sind¹⁸. Die Existenz einer solchen elektrophilen „Oxenoid“-Hydroxylierung mit Eisen-Komplexen konnten wir kürzlich nachweisen¹⁹.

Die Bedeutung des Oxen-Mechanismus für die enzymatischen Reaktionen liegt vor allem in der Tatsache, daß eine Metallionen-katalysierte Zweielektronen-Reduktion des O₂ nicht unmittelbar zu Wasserstoffperoxid führt, sondern über eine reaktionsfähige oxenoide Zwischenstufe verläuft, wie sie von GEORGE²⁰ schon aus thermodynamischen Berechnungen postuliert worden ist.

Wir danken Herrn Dr. M. SENN von der Firma Bell & Howell GmbH, Friedberg/Hessen, für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen.

¹⁷ T. H. ELLIOTT, R. C. C. TAO, and R. T. WILLIAMS, *Biochem. J.* **95**, 70 [1965].

¹⁸ S. FALLAB, *Angew. Chem.* **79**, 500 [1967].

¹⁹ V. ULLRICH, in Vorbereitung.

²⁰ P. GEORGE, in: *Oxidases and related redox system*, T. KING, H. S. MASON, and M. MORRISON, Eds., Wiley, New York-London 1965.

Zur Koordinations-Isomerie (a-b-Isomerie) der Co-Alkyl-corrinoide

Partialsynthese und einige Eigenschaften des Co-Methyl-cobalamins a

WILHELM FRIEDRICH und JOHANN PETER NORDMEYER

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Hamburg

(Z. Naturforschg. **24 b**, 588—596 [1969]; eingegangen am 28. Oktober 1968)

Chromatography and electrophoresis of the reaction products from B₁₂s and methyl iodide yield the known Co-methyl-cobalamin and a new light sensitive corrinoid compound. The latter is very probably Co-methyl-cobalamin **a** with the methyl group "down". The absorption spectrum of this yellow corrinoid differs only slightly from that of Co-methyl-cobalamin in acid media and does not depend on pH at wavelengths higher than 300 nm. The new corrinoid is thermolabile and on heating at 95 °C for several hours in O₂-free aqueous medium changes nearly quantitatively to Co-methyl-cobalamin. The last corrinoid, on the contrary, yields at 95 °C several per cents of Co-methyl-cobalamin **a**. The reaction of B₁₂s with dimethyl sulfate yields beyond the mentioned products Co-methyl-cobalamin Nm (yellow; the absorption spectrum does not depend on pH and is identical with that of Co-methyl-cobalamin in acid media) and B₁₂Nm (both corrinoids have a methyl group on N-3 of the 5,6-dimethylbenzimidazole moiety). The thermal isomerization of both Co-methyl-cobalamins is in accord with the observed formation of Co-¹⁴CH₃-cobinamide on heating of Co-¹⁴CH₃-cobalamin with Co-CH₃-cobinamide.

Aus diesem Laboratorium wurde über die a-b-Isomerie der Cyano-aquo-corrinoide berichtet¹⁻⁵. Die beiden Isomeren erwiesen sich auf Grund ihrer Eigenschaften als Diastereoisomere mit der CN-Gruppe „unten“ in der a-Form bzw. „oben“ in der

b-Form, weshalb hier von einer Koordinations-Isomerie gesprochen werden kann. Kinetische Versuche ergaben, daß die beiden Formen unter sehr milden Bedingungen ineinander umgewandelt werden, wobei stets ein spezifisches Gleichgewicht a-Form $\rightleftharpoons$ b-

¹ W. FRIEDRICH, *Biochem. Z.* **342**, 143 [1965].

² W. FRIEDRICH, *Z. Naturforschg.* **21 b**, 138 [1966].

³ W. FRIEDRICH, *Z. Naturforschg.* **21 b**, 595 [1966].

⁴ W. FRIEDRICH, H. OHLMS, W. SANDECK u. R. BIEGANOWSKI, *Z. Naturforschg.* **22 b**, 839 [1967].

⁵ W. FRIEDRICH u. M. MOSKOPHIDIS, *Z. Naturforschg.* **23 b**, 804 [1968].