

I ÉTUDE CINÉTIQUE DE L'OXYDATION DE L'ADRÉNALINE EN SOLUTION TAMPON-PHOSPHATE

par

PAULETTE CHAIX, JULES CHAUVET ET JACQUES JEZEQUEL

Laboratoire de Chimie Biologique, Institut de Chimie de l'Université, Lyon (France)

Le mécanisme physiologique de l'oxydation de l'adrénaline est encore inconnu. Des essais d'oxydation enzymatique, *in vitro*^{1, 2, 3} n'ont pas permis, jusqu'ici, de mettre en évidence un ferment spécifique. Le problème fondamental, apparemment beaucoup plus simple, de l'oxydation non-enzymatique de l'adrénaline a fait l'objet de nombreux travaux effectués dans des conditions disparates et dont le caractère insuffisamment quantitatif ne permet pas de donner une réponse aux questions suivantes:

- l'adrénaline est-elle une substance autoxydable?
- quels métaux catalysent préférentiellement son oxydation?
- quel rôle est dévolu à l'oxygène au cours de la réaction d'oxydation?
- quelle influence exercent sur cette réaction les variations de température et de p_H ?
- dans quelle mesure les phosphates et les autres ions présents dans le milieu participent-ils à la réaction d'oxydation de l'adrénaline?

Il nous a donc paru utile, en nous plaçant dans des conditions de travail bien définies, de reprendre l'étude cinétique de l'oxydation non-enzymatique de l'adrénaline.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

I. CONDITIONS GÉNÉRALES DES EXPÉRIENCES ET TECHNIQUES DES MESURES

1. Adrénaline

L'adrénaline utilisée est de l'adrénaline base, synthétique, provenant soit des Établissements RHÔNE-POULENC, soit de la Société U.C.L.A.F. Certains essais ont été réalisés avec de l'adrénaline racémique, la plupart des autres avec de l'adrénaline gauche, dont le pouvoir rotatoire a été contrôlé. Les résultats sont les mêmes, qu'il s'agisse d'adrénaline racémique ou de L-adrénaline.

L'adrénaline base est mise en solution soit dans de l'acide sulfurique, soit dans de l'acide chlorhydrique 0.5 N. La solution-mère d'adrénaline est amenée à un p_H voisin de 6 par addition de soude 0.05 N; sa concentration est généralement 100 fois supérieure à la concentration finale de l'adrénaline dans les essais. Au cours des essais manométriques, la solution-mère d'adrénaline est placée dans l'ampoule latérale des récipients et est renversée au temps zéro de l'expérience dans la solution-tampon (additionnée ou non de catalyseur métallique) se trouvant dans la capacité principale des récipients et au sein de laquelle aura lieu la réaction étudiée.

2. Conditions générales

Les substances chimiques utilisées sont des produits RHÔNE-POULENC R.P. Les solutions sont préparées avec de l'eau bidistillée; la verrerie, nettoyée avec du mélange sulfo-chromique, est rincée à plusieurs reprises d'une façon prolongée à l'eau bidistillée.

Sauf mention spéciale, le tampon-phosphate est obtenu en mélangeant de l'acide phosphorique pur et une solution de KOH 3 N, dans des proportions convenables pour obtenir le p_H désiré.

La concentration en phosphate du tampon est élevée: 0.2 M, pour se mettre à l'abri des variations de p_H résultant de la formation de produits acides dans le milieu notamment au début de la réaction.

3. Mesures manométriques de l'oxygène consommé

Elles sont effectuées à l'aide de la technique manométrique de Warburg. Les récipients, en forme

d'erlenmeyer, présentent une ampoule centrale, dans laquelle sont introduits 0.2 ml de potasse à 20% et une ampoule latérale, contenant la solution-mère d'adrénaline, sous un volume de 0.02 à 0.06 ml; la capacité principale de ces récipients contient la solution de tamponphosphate sous un volume de 2 ml et, éventuellement, la solution de sel métallique catalyseur, sous un volume de l'ordre de 0.02 à 0.1 ml.

La température des expériences, sauf mention spéciale, est de 37°; les récipients sont agités dans le bain-marie à une vitesse de 140 oscillations par minute. Tous les essais sont répétés au moins deux fois.

II. RÉSULTATS

1. Influence du cuivre sur l'oxydation de l'adrénaline

Si l'on mesure la consommation d'oxygène d'une solution d'adrénaline ($2.5 \cdot 10^{-3}$ m) dans du tampon-phosphate de potassium à $p_H = 7.0$, non additionnée de sels de métaux lourds, à 37°, *en présence d'air*, on constate que cette consommation reste nulle pendant près de 30 minutes et atteint une valeur de 0.05 molécule d'oxygène par molécule d'adrénaline, au bout de 50 minutes.

TABLEAU I

OXYDATION DE L'ADRÉNALINE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN IONS Cu^{++} ,
EN ATMOSPHÈRE D'AIR

Adrénaline $2.5 \cdot 10^{-3}$ m

Tampon-phosphate K 0.2 m — $p_H = 7.0$

a = mm³ d'oxygène consommés, mesurés expérimentalement

b = molécules d'oxygène consommées par molécule d'adrénaline

Temps en minutes	Concentrations en SO_4Cu											
	0		$2.5 \cdot 10^{-6}$		$2.5 \cdot 10^{-5}$		$2.5 \cdot 10^{-4}$		$2.5 \cdot 10^{-3}$		$1 \cdot 10^{-2}$	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
10'	0	0	1	0	1	0	2	0.01	20	0.19	17	0.15
20'	1	0	2	0.01	4	0.04	22	0.20	74	0.66	74	0.66
30'	2	0.01	3	0.03	8	0.07	48	0.43	132	1.18	127	1.13
50'	6	0.05	11	0.10	24	0.21	106	0.95	210	1.87	203	1.80

TABLEAU II

OXYDATION DE L'ADRÉNALINE EN PRÉSENCE DE QUANTITÉS ÉQUIMOLÉCULAIRES DE CHLORURE OU DE SULFATE CUIVRIQUE

Tampon-phosphate K 0.2 m — $p_H = 7.1$

Atmosphère d'air

a = mm³ d'oxygène consommés, mesurés expérimentalement

b = molécules d'oxygène consommées par molécule d'adrénaline

Temps en minutes	Sulfate d'adrénaline						Chlorhydrate d'adrénaline					
	$7.5 \cdot 10^{-3}$ m + $SO_4Cu = 0$		$7.5 \cdot 10^{-3}$ m + SO_4Cu 10^{-3} m		$2 \cdot 10^{-4}$ m + SO_4Cu $2 \cdot 10^{-4}$ m		$7.5 \cdot 10^{-3}$ m + $Cl_2Cu = 0$		$7.5 \cdot 10^{-3}$ m + Cl_2Cu 10^{-3} m		$2 \cdot 10^{-4}$ m + Cl_2Cu $2 \cdot 10^{-4}$ m	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
5'	0	0	55	0.165	8	0.9	0	0	48	0.144	6	0.670
15'	—	—	89	0.268	12	1.35	0	0	90	0.270	11	1.23
20'	—	—	137	0.410	18	2.016	—	—	138	0.415	16	1.80
25'	4	0.012	180	0.540	—	—	0	0	184	0.550	18	2.00
30'	—	—	222	0.665	22	2.46	2	0.006	230	0.690	21	2.36
40'	7	0.021	307	0.920	24	2.69	4	0.012	313	0.940	22	2.47

Comme le montre le Tableau I, l'addition de cuivre, sous forme de SO_4Cu , accélère cette réaction. Au fur et à mesure que la concentration du cuivre croît, la consommation d'oxygène augmente et la vitesse maxima de la réaction initiale est obtenue pour une concentration en SO_4Cu du même ordre de grandeur que celle de l'adrénaline. Dans ces conditions, au bout de 50 minutes d'expérience, la quantité d'oxygène consommée atteint 1.87 molécule d'oxygène par molécule d'adrénaline. Cette catalyse par le cuivre est quantitativement la même que le cuivre introduit sous forme de sulfate ou de chlorure (Tableau II).

Si la réaction a lieu en atmosphère d'oxygène pur, la vitesse maxima initiale d'oxydation de l'adrénaline est atteinte pour des concentrations moléculaires de cuivre et d'adrénaline qui sont dans un rapport voisin de $\frac{1}{2}$ à $p_H = 7.1$ et de $\frac{1}{10}$ à $p_H = 6.4$. La fixation d'oxygène s'arrête quand il y a 3 molécules d'oxygène consommées par molécule d'adrénaline (Tableau III).

TABLEAU III

OXYDATION DE L'ADRÉNALINE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN IONS Cu^{++} EN ATMOSPHÈRE D'OXYGÈNE PUR

Adrénaline 10^{-3} m

Tampon-phosphate K 0.2 m

a = mm³ d'oxygène consommés, mesurés expérimentalement

b = molécules d'oxygène consommées par molécule d'adrénaline

1. $p_H = 7.1$

Temps en minutes	Concentrations en Cl_2Cu											
	0		10^{-4}		$0.5 \cdot 10^{-3}$		10^{-3}		$2 \cdot 10^{-3}$		$3 \cdot 10^{-3}$	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
5'	0	0	7	0.15	12	0.26	15	0.33	17	0.37	16	0.35
10'	0	0	22	0.48	34	0.75	40	0.88	43	0.94	48	1.05
15'	0	0	40	0.88	62	1.36	68	1.50	71	1.56	73	1.62
20'	1	0.02	60	1.32	84	1.85	90	1.98	92	2.02	94	2.06
30'	4	0.08	90	1.98	105	2.31	108	2.38	109	2.40	109	2.40
55'	13	0.29	120	2.64	124	2.72	127	2.80	127	2.80	128	2.82
80'	19	0.42	133	2.93	132	2.90	139	3.06	133	2.93	136	2.99

2. $p_H = 6.4$

Temps en minutes	Concentration en Cl_2Cu									
	$0.5 \cdot 10^{-4}$		10^{-4}		$0.5 \cdot 10^{-3}$		10^{-3}		$2 \cdot 10^{-3}$	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
5'	1.8	0.04	3	0.07	4	0.09	4	0.09	4	0.09
10'	5.5	0.11	8	0.18	9	0.20	11	0.25	10	0.22
15'	10	0.22	16	0.36	17	0.38	18	0.40	18	0.40
20'	14	0.31	21	0.47	24	0.54	26	0.58	24	0.54
30'	24	0.53	35	0.78	41	0.92	44	0.98	40	0.90
55'	51	1.14	67	1.50	83	1.85	85	1.90	87	1.95
80'	—	—	—	—	113	2.50	113	2.50	117	2.60

2. Influence de la pression partielle d'oxygène

En atmosphère d'azote pur, en l'absence de cuivre, la solution de chlorhydrate d'adrénaline dans du tampon phosphate à $p_H = 7.3$ reste incolore et il n'y a aucune dénivellation manométrique. Dans les mêmes conditions, mais en présence de chlorure

cuvrique (concentration équimoléculaire de celle de l'adrénaline) la solution devient *jaune canari* et, là non plus, aucune dénivellation manométrique n'apparaît.

La coloration jaune témoigne de la formation d'un complexe équimoléculaire adrénaline-cuivre. La formation de ce complexe est instantanée et indépendante de la présence d'oxygène.

En *atmosphère d'air*, en présence de cuivre et de phosphate, la solution initialement incolore passe rapidement par une teinte jaune, puis devient successivement rose, rouge, puis brun madère. Ces changements de coloration s'accompagnent d'une fixation d'oxygène traduisant l'autoxydation du complexe adrénaline-cuivre. Il est remarquable que dans la phase initiale d'expériences mettant en jeu des concentrations différentes d'adrénaline-Cu, et réalisées en atmosphère d'air, la vitesse de fixation de l'oxygène rapportée à une molécule d'adrénaline ne soit pas constante (Tableau II et IV).

TABLEAU IV

DÉPENDANCE DE L'OXYGÈNE CONSOMMÉ, PAR MOLÉCULE D'ADRÉNALINE ET DE LA CONCENTRATION EN ADRÉNALINE UTILISÉE AU COURS D'ESSAIS, EFFECTUÉS EN ATMOSPHÈRE D'AIR

Tampon-phosphate K 0.2 m — pH = 7.2

SO₄Cu (concentrations équimoléculaires à l'adrénaline)

a = mm³ d'oxygène consommés, mesurés expérimentalement

b = molécules d'oxygène consommées, par molécule d'adrénaline

Temps en minutes	Sulfate d'adrénaline											
	7.5 · 10 ⁻³ m sans SO ₄ Cu		7.5 · 10 ⁻³ m		2 · 10 ⁻³ m		10 ⁻³ m		2 · 10 ⁻⁴ m		10 ⁻⁴ m	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
10'	0	0	72	0.216	47	0.517	34	0.75	8	0.89	6	1.34
20'	2	0	270	0.810	123	1.353	81	1.78	17	1.91	10	2.24
30'	3	0	—	—	169	1.86	101	2.22	21	2.35	12	2.69

TABLEAU V

INFLUENCE DE LA PRESSION PARTIELLE D'OXYGÈNE SUR LA RÉACTION D'OXYDATION DE L'ADRÉNALINE EN PRÉSENCE DE CUIVRE ET DE PHOSPHATES

Adrénaline et Cl₂Cu 10⁻³ m

Tampon-phosphate K 0.2 m — pH = 7.3

a = mm³ d'oxygène consommés, mesurés expérimentalement

b = molécules d'oxygène consommées par molécule d'adrénaline

Temps en minutes	Atmosphère											
	O ₂ Pur		75% O ₂		50% O ₂		21% O ₂ air		10% O ₂		5% O ₂	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
2'	7.5	0.165	8	0.176	5	0.110	2.5	0.055	1.5	0.033	1	0.022
7'	32	0.700	30	0.660	22	0.485	13	0.286	7.5	0.165	4.5	0.099
12'	62	1.360	60	1.32	45	0.99	26	0.570	18	0.396	10	0.220
17'	83	1.830	81	1.78	64	1.42	40	0.88	25	0.550	18	0.396
22'	96	2.120	96	2.12	82	1.80	54	1.19	44	0.97	25	0.550
32'	112	2.46	111	2.44	103	2.26	80	1.76	53	1.17	40	0.88
42'	118	2.60	118	2.60	113	2.48	97	2.14	70	1.54	54	1.19
52'	123	2.70	122	2.68	119	2.62	109	2.40	81	1.78	67	1.47
72'	128	2.82	127	2.80	126	2.77	117	2.58	101	2.22	88	1.94
92'	132	2.90	128	2.82	131	2.88	125	2.75	112	2.46	108	2.38
122'	135	2.97	131	2.90	133	2.93	127	2.80	117	2.58	120	2.64

Cette constatation a conduit à vérifier si les conditions optima de la réaction étaient bien remplies et à examiner notamment l'influence de la pression partielle d'oxygène sur la cinétique de la réaction. L'expérience rapportée dans le Tableau V montre qu'en présence des mélanges gazeux suivants:

95% N ₂ + 5% O ₂	50% N ₂ + 50% O ₂
90% N ₂ + 10% O ₂	75% N ₂ + 25% O ₂
79% N ₂ + 21% O ₂ (air)	O ₂ pur

dans les temps initiaux, l'oxygène fixé est *approximativement proportionnel aux pressions partielles d'oxygène*.

La vitesse maxima de fixation initiale d'oxygène est atteinte pour une pression partielle d'oxygène de 0.75 atmosphère.

Si l'expérience, effectuée en atmosphère d'air, rapportée dans le Tableau IV, est répétée en atmosphère d'oxygène pur, (Tableau VI) il apparaît que dans ce dernier cas le temps nécessaire au transport d'une ½ molécule d'oxygène sur une molécule d'adrénaline est sensiblement indépendant de la concentration initiale de l'adrénaline dans les essais.

TABLEAU VI

INDÉPENDANCE DE L'OXYGÈNE CONSOMMÉ PAR MOLÉCULE D'ADRÉNALINE ET DE LA CONCENTRATION INITIALE DE L'ADRÉNALINE DANS LES ESSAIS EFFECTUÉS EN ATMOSPHÈRE D'OXYGÈNE PUR

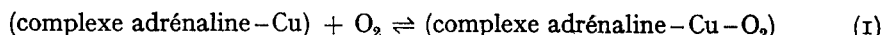
Tampon-phosphate K 0.2 m — pH = 7.0

a = mm³ d'oxygène consommés, mesurés expérimentalement

b = molécules d'oxygène consommées par molécule d'adrénaline

Concentration en adrénaline	2 · 10 ⁻³ m				10 ⁻³ m				10 ⁻⁴ m			
Concentration en Cl ₂ Cu	4 · 10 ⁻³ m		2 · 10 ⁻³ m		2 · 10 ⁻³ m		10 ⁻³ m		2 · 10 ⁻⁴ m		10 ⁻⁴ m	
Temps en minutes	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
5'	27	0.297	25	0.275	14	0.308	14	0.308	1	0.4	2	0.4
10'	71	0.780	69	0.760	39	0.86	40	0.880	6	1.3	4	0.9
15'	117	1.280	116	1.275	65	1.43	65	1.43	8	1.7	6	1.3
20'	155	1.700	157	1.730	85	1.87	86	1.89	9	2.0	9	2.0

En première approximation, les faits observés dans la phase initiale de la réaction semblent dépendre de l'équilibre:



homologue de la réaction décrite par SZENT-GYÖRGYI⁸ à propos de la catalyse d'oxydation du pyrocatechol par Fe⁺⁺.

Si l'on admet que, dans la phase initiale, l'oxygénation du complexe métallique exprimée par la relation (1) est dominante, autrement dit si l'on fait abstraction des réactions ultérieures, on peut essayer, d'après les consommations d'oxygène expé-

mentalement mesurées (Tableau V) en fonction de la pression partielle d'oxygène, après 7 minutes, de calculer la constante de dissociation K de la réaction (1), à p_H 7.3 et à 37°, d'après la formule:

$$K = (pO_2)^x \frac{(1-n)}{n} \quad (2)$$

où n = concentration en complexe (adrénaline-Cu-O₂), à un instant donné 7 minutes
 $(1-n)$ = concentration en complexe (adrénaline-Cu), au même instant,
 pO_2 = pression partielle d'oxygène en présence de laquelle a eu lieu la réaction,
 $x = 1$, on pose qu'une seule molécule d'oxygène participe à la réaction, initialement.

En fait, la valeur de K ainsi calculée est sensiblement constante (Tableau VII), K moyen = 0.48.

TABLEAU VII

VALEURS DE LA CONSTANCE DE DISSOCIATION DE LA RÉACTION (1) CALCULÉES D'APRÈS LES DONNÉES EXPÉRIMENTALES DU TABLEAU V (7 MINUTES)

p O ₂ en atmosphère	K
0.75	0.39
0.50	0.53
0.21	0.52 K moyen = 0.48
0.1	0.50
0.05	0.45

3. Influence de la température; calcul de l'énergie d'activation de la réaction à sa phase initiale

Les mesures de vitesses dont il a été question jusqu'ici ont toutes été faites à une même température de 37°. Il nous a paru intéressant de les répéter à deux autres températures: 21° et 10° 3, et, à partir de ces données (Tableau VIII), de calculer la con-

TABLEAU VIII

INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE SUR LA RÉACTION D'OXYDATION DE L'ADRÉNALINE EN PRÉSENCE DE CUIVRE ET DE PHOSPHATE

Adrénaline et Cl₂Cu 10⁻³ m

Tampon-phosphate potassium 0.2 m — $p_H = 7.2$

Atmosphère d'oxygène pur

a = mm³ d'oxygène consommé, mesurés expérimentalement

b = molécules d'oxygène consommées par molécule d'adrénaline

Temps en minutes	Températures			
	10° 3		21°	
	a	b	a	b
5'	—	—	2	0.044
15'	—	—	7.5	0.165
30'	4	0.088	—	—
35'	—	—	29.5	0.65
40'	7	0.154	—	—
50'	—	—	40.5	0.89
65'	—	—	56	1.23
70'	12	0.264	—	—
75'	—	—	67	1.47
90'	14	0.308	83.5	1.84
105'	19	0.420	98.5	2.17
120'	21	0.462	113	2.48

stante de vitesse k de formation du complexe oxygéné pour ces différentes températures. Ayant constaté que, dans les conditions où nous nous plaçons, le temps nécessaire au transport d'une demi-molécule d'oxygène sur une molécule d'adrénaline est approximativement indépendant de la concentration initiale de l'adrénaline dans les essais, il était à supposer que, dans la phase initiale, la réaction était de premier ordre par rapport à O_2 ; nous avons donc utilisé pour le calcul de k l'expression:

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x} \quad (3)$$

où t = temps en minutes

a = concentration initiale du complexe (adrénaline-Cu) = 1

x = quantité du complexe entrée en réaction avec O_2 à l'instant t .

Les valeurs de k (37°), k (21°), k ($10^\circ 3$) sont données dans le Tableau IX.

TABLEAU IX

CONSTANTE DE VITESSE k DE LA RÉACTION, DANS SA PHASE INITIALE, À DIFFÉRENTES TEMPÉRATURES

Adrénaline et Cl_2Cu 10^{-3} m

Tampon phosphate K 0.2 m — $pH = 7.3$

Atmosphère O_2 pur

t = temps écoulé en minutes à partir de l'introduction de l'adrénaline dans les essais

Mol O_2 consommé par mol d'adrénaline	Températures					
	37°		21°		$10^\circ 3$	
	t	k	t	k	t	k
0.044	—	—	5'	$90 \cdot 10^{-4}$	—	—
0.088	—	—	—	—	30'	$30 \cdot 10^{-4}$
0.154	2'	$91 \cdot 10^{-3}$	—	—	40'	$42 \cdot 10^{-4}$
0.165	—	—	15'	$119 \cdot 10^{-4}$	—	—
0.264	—	—	—	—	70'	$44 \cdot 10^{-4}$
0.308	—	—	—	—	90'	$41 \cdot 10^{-4}$
0.350	5'	$86 \cdot 10^{-3}$	—	—	—	—
0.462	—	—	—	—	120'	$52 \cdot 10^{-4}$

Connaissant k pour différentes températures, l'énergie d'activation a pu être calculée d'après la relation d'Arrhénius:

$$\ln k' = \ln B - \frac{Q}{R.T} \quad (4)$$

où k' = constante de vitesse pour une température donnée

B = constante pratiquement indépendante de la température

R = constante des gaz parfaits = 2 calories

T = température absolue

Premier calcul: à partir de k ($10^\circ 3$) = $36 \cdot 10^{-4}$

et de k (37°) = $88 \cdot 10^{-3}$

$Q = 22600$ calories/molécule

Deuxième calcul: à partir de k ($21^\circ 4$) = 10^{-2}

et de k (37°) = $88 \cdot 10^{-3}$

$Q = 28000$ calories/molécule

Bibliographie p. 483.

Ces valeurs de Q sont suffisamment voisines pour que l'on puisse conclure que dans sa phase initiale la réaction d'oxydation de l'adrénaline catalysée par le cuivre, en milieu tampon-phosphate, en atmosphère d'oxygène pur, dépend de la température suivant la loi d'Arrhénius et que l'énergie d'activation de cette réaction, à $p_H = 7.3$, est de l'ordre de 25 000 calories/molécule.

4. Influence du p_H

La réaction d'oxydation de l'adrénaline est fortement influencée par les variations de p_H . L'expérience rapportée dans le Tableau X donne les variations quantitatives des vitesses de fixation d' O_2 en fonction du p_H dans les conditions très précises que nous avons définies.

TABLEAU X

INFLUENCE DU p_H (MAINTENU CONSTANT PAR UN TAMPON AU PHOSPHATE) SUR LA VITESSE D'OXYDATION DE L'ADRÉNALINE EN PRÉSENCE D'UNE QUANTITÉ ÉQUIMOLÉCULAIRE DE CHLORURE CUIVRIQUE, EN ATMOSPHÈRE D'OXYGÈNE PUR

Adrénaline et Cl_2Cu : 10^{-3} m

Tampon-phosphate de potassium: 0.2 m

a = mm³ d'oxygène consommés, mesurés expérimentalement

b = molécules d'oxygène consommées par molécule d'adrénaline

Temps en minutes	$p_H = 5.9$		$p_H = 6.3$		$p_H = 6.6$		$p_H = 7.0$		$p_H = 7.3$		$p_H = 7.8$	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
5'	1	0.02	1.5	0.03	2	0.04	13	0.29	16	0.35	40	0.88
10'	2	0.04	5	0.11	11	0.24	32	0.70	45	0.99	81	1.78
15'	3	0.06	8	0.18	19	0.42	54	1.19	72	1.59	100	2.23
20'	4	0.08	12	0.26	28	0.61	69	1.52	90	1.98	107	2.36
35'	—	—	25	0.55	55	1.21	102	1.98	112	2.46	119	2.62
45'	10	0.22	30	0.66	73	1.60	114	2.50	118	2.60	124	2.73
75'	21	0.46	60	1.32	110	2.42	127	2.8	126	2.76	128	2.82

5. Comparaison entre l'action catalytique du cuivre et celle du fer, du magnésium, du nickel et du manganèse

Les phénolases isolées jusqu'ici^{3, 4} étant des ferments dont le métal actif est le cuivre, il était naturel de nous attacher, tout d'abord, à l'étude de la catalyse par le cuivre. Toutefois une comparaison de l'activité catalytique du cuivre avec celle d'autres métaux jouant un rôle important dans les phénomènes biologiques nous a paru devoir être particulièrement fructueuse. Le Tableau XI et la Fig. 1 donnent, en fonction du temps, la quantité d'oxygène fixé par l'adrénaline dans des essais non additionnés de métaux lourds et dans des essais additionnés des ions suivants: Cu^{++} , Mg^{++} , Fe^{++} , Fe^{+++} , Mn^{++} et Ni^{++} à une concentration équimoléculaire de celle de l'adrénaline.

a) *Ion Cu^{++}* : le cuivre, introduit dans le tampon-phosphate sous forme de chlorure, donne lieu à la formation d'un précipité. L'addition d'adrénaline provoque la dissolution totale de ce précipité (même en atmosphère d'azote pure). Immédiatement après, la fixation d'oxygène se manifeste d'une façon très sensible.

b) *Ion Mg^{++}* : introduit également sous forme de chlorure, il ne provoque aucune variation dans la coloration ou la fixation d'oxygène des essais qui évoluent exactement comme les essais-témoins sans addition de métal lourd.

c) *Ions Fe^{++} et Fe^{+++}* : ces ions introduits sous forme de sulfate ferreux ou de

TABLEAU XI

OXYDATION DE L'ADRÉNALINE EN PRÉSENCE DE QUANTITÉS ÉQUIMOLÉCULAIRES DE
Cu, Ni, Mn, Fe ET Mg

Concentration en chlorhydrate d'adrénaline = 10^{-3} m

Tampon-phosphate de potassium 0.2 m — $pH = 7.6$

Atmosphère d'oxygène pur

Ces différents métaux sont introduits sous forme de chlorures (sauf le fer, sous forme de $(SO_4)_2Fe_2$)
à une concentration équimoléculaire à celle de l'adrénaline

a = mm³ d'oxygène consommés, mesurés expérimentalement

b = molécules d'oxygène consommées par molécule d'adrénaline

Temps en minutes	Ions métalliques ajoutés											
	o		Mg ⁺⁺		Fe ⁺⁺⁺		Mn ⁺⁺		Ni ⁺⁺		Cu ⁺⁺	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
5'	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0.06	32	0.70
10'	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0.22	70	1.54
15'	0	0	0	0	0	0	7	0.15	20	0.44	92	2.02
20'	0	0	0.5	0.01	0	0	21	0.46	31	0.68	101	2.22
25'	3	0.06	3	0.06	4	0.09	48	1.05	43	0.95	107	2.36
30'	7	0.15	7	0.15	10	0.22	92	2.02	57	1.25	112	2.46
50'	21	0.46	21	0.46	35	0.77	175	3.85	103	2.26	127	2.80
70'	37	0.81	36	0.79	57	1.25	185	4.07	145	3.19	132	2.90
85'	47	1.03	48	1.05	72	1.58	190	4.18	165	3.63	136	3.00
105'	60	1.32	60	1.32	90	1.98	194	4.27	178	3.92	139	3.06

chlorure ferrique dans le tampon-phosphate donnent lieu à la formation d'un précipité blanc opalescent; après addition d'adrénaline le précipité ne se dissout apparemment pas et il se développe une teinte violette beaucoup plus nette à $pH = 7.6$ et 7.2 qu'à $pH = 6.5$. Cette coloration violette témoigne de la formation d'un complexe (adrénaline-Fe) comparable au complexe (pyrocatechol-Fe)^{10, 8}. La vitesse de fixation de l'oxygène a été légèrement supérieure à celle des essais-témoins en ce qui concerne l'expérience effectuée à $pH = 7.6$ résumée dans le Tableau XI, et rigoureusement égale à celle des essais-témoins dans une expérience identique effectuée à $pH = 6.5$.

d) Ion Mn^{++} : mélangé au tampon-phosphate, Cl_2Mn ne détermine pas de précipitation; pendant les 10 premières minutes qui suivent l'addition d'adrénaline, la solution reste incolore et la fixation d'oxygène nulle. Après cette période d'induction, l'oxygène est consommé à une vitesse qui devient

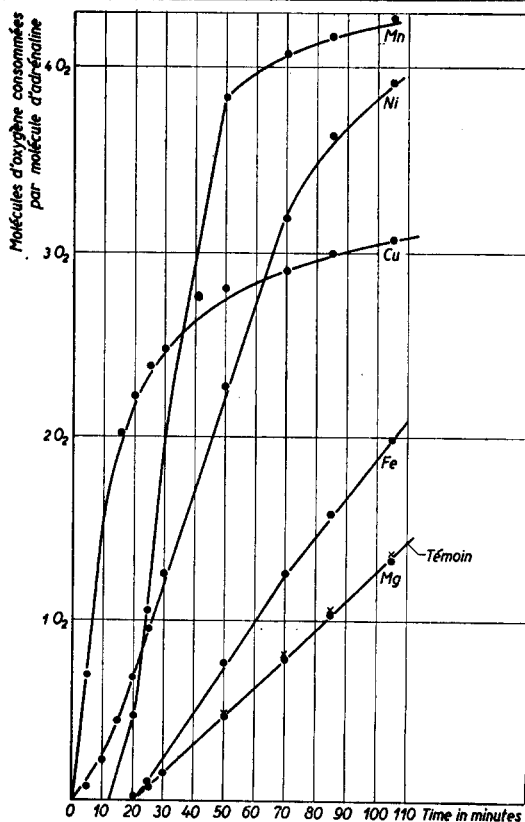


Fig. 1

TABLEAU XII

OXYDATION DE L'ADRÉNALINE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN IONS Mn^{++} EN ATMOSPHÈRE D'OXYGÈNE PUR

Adrénaline 10^{-3} m

Tampon-phosphate K 0.2 m — $p_H = 7.1$

a = mm³ d'oxygène consommés, mesurés expérimentalement

b = molécules d'oxygène consommées par molécule d'adrénaline

Temps en minutes	Concentration en Cl_2Mn											
	0		10^{-5}		10^{-4}		10^{-3}		$2 \cdot 10^{-3}$		$5 \cdot 10^{-3}$	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
5'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10'	0	0	0	0	0	0	1	0.02	1	0.02	1	0.02
15'	0	0	0	0	2	0.04	2	0.04	2	0.04	2	0.04
20'	0	0	1	0.02	3	0.06	5	0.11	4	0.09	4	0.09
25'	1	0.02	4	0.09	8	0.17	13	0.29	9	0.22	9	0.22
30'	3	0.06	8	0.17	17	0.37	25	0.55	20	0.44	18	0.4
50'	11	0.24	36	0.79	103	2.26	140	3.08	126	2.77	106	2.33
90'	31	0.68	110	2.42	180	3.96	196	4.3	190	4.2	191	4.2
150'	61	1.34	178	3.92	200	4.4	208	4.6	204	4.5	205	4.5

rapidement plus grande que celle mesurée en présence de cuivre (Tableau XI et XII).

La dégradation oxydative totale de l'adrénaline correspond à la fixation de 3 molécules d'oxygène par molécule d'adrénaline quand la réaction est catalysée par le cuivre, et à la fixation d'au moins 4 molécules d'oxygène par molécule d'adrénaline quand elle est catalysée par le manganèse. Un essai témoin contenant Cl_2Mn (10^{-3} m) dans du tampon-phosphate à $p_H = 7.6$, agité en atmosphère d'oxygène pur à 37° , nous a montré que Cl_2Mn n'était pas autoxydable dans les conditions de nos essais.

Ion Ni^{++} : L'introduction de Cl_2Ni dans le tampon-phosphate détermine la formation d'un léger précipité. Aussitôt après l'addition d'adrénaline se manifeste une fixation d'oxygène dont la vitesse est, au bout de 5 minutes, environ 10 fois plus faible que celle mesurée dans les mêmes conditions en présence de cuivre. La catalyse par le nickel, comme la catalyse par le manganèse provoque une dégradation oxydative de l'adrénaline au cours de laquelle il y a au moins 4 molécules d'oxygène consommées par molécule d'adrénaline.

L'ensemble de ces résultats montre l'activité catalytique tout à fait remarquable du cuivre en ce qui concerne l'oxydation de l'adrénaline.

6. Influence de la concentration en tampon-phosphate; influence des sels neutres (ClK , $ClNa$)

Au cours de cette étude cinétique de l'oxydation de l'adrénaline nous avons utilisé des solutions tampon-phosphate très concentrées (0.2 m) pour être sûrs que le p_H de nos essais ne varie pas. Une telle précaution est notamment justifiée par le fait (discuté dans un prochain article), que la formation du complexe adrénaline-cuivre à $p_H = 7.3$ s'accompagne de la libération d'un ion H^+ acide par molécule d'adrénaline. Il nous a été cependant possible d'abaisser la concentration du tampon-phosphate à 0.02 m sans que le p_H , contrôlé par des mesures potentiométriques, varie. Que la concentration en tampon-phosphate soit de 0.2 m ou de 0.02 m, les vitesses de consommation initiale d'oxygène sont les mêmes. Pour mieux apprécier le rôle éventuel des phosphates, il eût été souhaitable de pouvoir faire varier la concentration du phosphate dans de plus larges

TABLEAU XIII

INFLUENCE ACCÉLÉRATRICE EXERCÉE PAR ClK 0.2 m SUR L'OXYDATION DE L'ADRÉNALINE
À DIFFÉRENTS PHAdrénaline et Cl_2Cu : 10^{-3} mTampon phosphate Na 0.2 m $\text{pH} = 6.5; 6.8; 7.2; 7.3$

Atmosphère d'oxygène pur

a = mm^3 d'oxygène consommés mesurés expérimentalement

b = molécules d'oxygène consommées par molécule d'adrénaline

Temps en minutes	PH = 6.5				PH = 6.8				PH = 7.2			
	—		+ KCl		—		+ KCl		—		+ KCl	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
5'	3	0.06	7	0.15	3	0.06	17	0.37	4	0.08	16	0.35
10'	9	0.19	21	0.46	16	0.35	45	0.99	33	0.73	74	1.63
15'	16	0.35	35	0.77	32	0.70	71	1.56	73	1.60	100	2.20
20'	23	0.50	49	1.08	52	1.15	90	1.97	97	2.13	113	2.48
30'	38	0.84	72	1.79	80	1.98	113	2.48	116	2.55	126	2.77
60'	91	2.00	127	2.80	134	2.95	130	3.08	140	3.08	140	3.08
105'	134	2.95	142	3.12	149	3.28	149	3.28	146	3.22	147	3.24

TABLEAU XIV

INFLUENCE ACCÉLÉRATRICE EXERCÉE PAR ClK ET ClNa 0.2 m SUR
L'OXYDATION DE L'ADRÉNALINEAdrénaline et Cl_2Cu : 10^{-3} m

Tampon-phosphate Na 0.2 m

Atmosphère d'oxygène pur

a = mm^3 d'oxygène consommés, mesurés expérimentalement

b = molécules d'oxygène consommées par molécule d'adrénaline

Temps en minutes	PH = 6.8						PH = 7.2					
	—		+ ClNa		+ ClK		—		+ ClNa		+ ClK	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
5'	3	0.06	9	0.20	15	0.33	2	0.04	13	0.29	16	0.35
10'	16	0.35	31	0.68	48	1.05	31	0.68	66	1.45	81	1.78
15'	33	0.72	57	1.25	75	1.65	70	1.54	97	2.13	100	2.20
20'	50	1.10	79	1.73	95	2.10	93	2.04	107	2.38	112	2.46
30'	79	1.74	103	2.26	116	2.55	110	2.42	121	2.66	124	2.72
70'	129	2.84	134	2.95	145	3.20	130	2.86	140	3.08	143	3.14

limites. Comme cela n'a pas été possible, nous devons nous borner à constater, pour l'instant, que la réaction est indépendante de la concentration en phosphate entre des concentrations de 0.2 et 0.02 m.

L'addition aux essais de chlorure de potassium (0.2 m) provoque des accroissements de la vitesse initiale de fixation d'oxygène de l'ordre de 200 à 500%, suivant le pH (Tableau XIII). Le chlorure de sodium, à la même concentration, exerce aussi un effet accélérateur mais moins marqué (Tableau XIV). Il s'agit, sans doute, d'un "effet de sel" à rapprocher de celui signalé par O. WARBURG⁹ à propos de l'oxydation de l'acide tartrique catalysée par le fer.

RÉSUMÉ

De l'étude cinétique que nous avons faite de l'oxydation de l'adrénaline *en solution dans du tampon phosphate* se dégagent les faits suivants:

a) il n'est plus soutenable que l'oxydation de l'adrénaline soit une "autoxydation". Dans des

essais-témoins, non additionnés de métal lourd, l'adrénaline (10^{-3} m) dans un milieu de pH supérieur à 7, agitée en présence d'oxygène pur, à 37° , ne donne lieu à aucune fixation d'oxygène appréciable pendant des temps relativement longs, de l'ordre de 30 minutes. La fixation d'oxygène ultérieure, faible et lente, est à mettre sur le compte des traces d'impuretés métalliques existant dans nos réceptifs ou dans nos réactifs. Notre matériel n'a pas été purifié d'une façon aussi rigoureuse que dans les expériences de SAKUMA⁷ relatives à la catalyse d'oxydation de la cystéine par les métaux lourds. Les traces métalliques présentes dans nos essais n'empêchent cependant pas de juger la question car, dans le cas de l'adrénaline, la concentration en métal catalyseur nécessaire pour obtenir la vitesse d'oxydation *maxima* est incomparablement plus élevée que celle des traces métalliques éventuellement présentes.

b) L'oxydation de l'adrénaline dépend de la formation d'un complexe adrénaline-métal (cuivre ou nickel ou manganèse). Dans le cas du cuivre la vitesse maximum de consommation d'oxygène à pH 7.3 correspond à un rapport ions Cu^{++} /mol adrénaline de l'ordre de $\frac{1}{2}$. La valeur de ce rapport dépend du pH.

c) l'aptitude du cuivre à catalyser l'oxydation de l'adrénaline est supérieure à celle du nickel et à celle du manganèse.

d) le fer forme avec l'adrénaline un complexe violet, non-autoxydable dans les conditions de nos expériences; l'adrénaline paraît indifférente à la présence du magnésium.

e) la dégradation oxydative totale de l'adrénaline correspond à la fixation de 3 molécules d'oxygène par molécule d'adrénaline dans le cas d'une catalyse par le cuivre, et à une fixation d'au moins 4 molécules d'oxygène par molécule d'adrénaline dans le cas d'une catalyse par le nickel ou par le manganèse.

f) la vitesse d'autoxydation du complexe adrénaline-cuivre dépend de la *pression partielle d'oxygène*; la réaction est apparemment de premier ordre par rapport à l'oxygène dans sa phase initiale; elle dépend du pH et de la température; l'énergie d'activation de cette réaction serait d'environ 25 000 calories/molécule.

g) dans les conditions de nos expériences, l'oxydation de l'adrénaline est accélérée par la présence de ClNa 0.2 m et plus encore par ClK 0.2 m.

h) la participation éventuelle des phosphates aux réactions étudiées sera discutée dans une prochaine publication.

SUMMARY

Kinetical studies undertaken by us concerning the oxidation of adrenaline in phosphate buffer solution have revealed the following facts:

a) the assumption that the oxidation of adrenaline would be an "autoxidation" can no longer be maintained. In control experiments without addition of a heavy metal, adrenaline (10^{-3} m), when shaken with pure oxygen at 37°C in a medium more alkaline than pH 7, does not take up an appreciable amount of oxygen, even in relatively long periods of about 30 minutes. The final fixation of oxygen, though little and proceeding slowly, must be due to traces of metallic impurities present in our apparatus or our reagents. Our material has not been so rigorously purified as in the experiments of SAKUMA⁷ concerning the catalysis of cystein oxidation by heavy metals. However, the traces of metals present in our experiments do not preclude our judgment, for in the case of adrenaline the concentration of metal catalyst required to obtain the *maximal* velocity of oxidation is incomparably higher than the traces of metals that might possibly be present.

b) the oxidation of adrenaline depends upon the formation of a complex adrenaline-metal (copper, nickel or manganese). In the case of copper the maximal velocity of oxygen consumption at pH 7.3 corresponds to a ratio Cu^{++} ions/mol. adrenaline of the order of $\frac{1}{2}$. The value of this ratio depends on the pH.

c) copper is a more powerful catalyst of adrenaline oxidation than nickel or manganese.

d) iron forms a violet complex with adrenaline that is not autoxidable under our experimental conditions; magnesium does not appear to react.

e) the total oxidative degradation of adrenaline is accompanied by the fixation of 3 molecules of oxygen per molecule of adrenaline when copper is the catalyst, and a fixation of at least 4 molecules of oxygen per molecule of adrenaline when nickel or manganese are used as catalysts.

f) the autoxidation velocity of the adrenaline-copper complex depends upon the partial vapour pressure of the oxygen; in its initial phase the reaction appears to be a first-order reaction in regard to the oxygen. The reaction is a function of the pH and the temperature; its activation energy would be about 25 000 calories/molecule.

g) under our experimental conditions, the oxidation of adrenaline is accelerated by NaCl 0.2 m and still more so by KCl 0.2 m.

h) the possible participation of phosphate in these reactions will be discussed in a following paper.

ZUSAMMENFASSUNG

Aus der von uns durchgeführten kinetischen Untersuchung der Adrenalin-Oxydation in *Phosphatpuffer-Lösung* lassen sich folgende Tatsachen ableiten:

a) Es kann nicht mehr behauptet werden, dass die Oxydation des Adrenalins eine Autoxydation sei. In Kontroll-Versuchen ohne Schwermetall-Beigabe nimmt Adrenalin (10^{-3} molar) in einer Pufferlösung von pH über 7, bei 37° in Gegenwart von reinem Sauerstoff geschüttelt, während der verhältnismässig langen Zeitspanne von ca 30 Minuten keine merklichen Mengen von Sauerstoff auf. Die spätere Sauerstoff-Aufnahme, die schwach und träge ist, muss auf Spuren metallischer Verunreinigungen zurückgeführt werden, welche in unseren Gefässen oder Reagentien vorhanden waren. Unser Material war nicht so gründlich gereinigt, worden als in den Versuchen von SAKUMA⁷ über die Oxydationskatalyse des Cysteins durch Schwermetalle. Die in unseren Versuchen anwesenden Metallspuren verhindern jedoch ein Urteil über die Frage nicht, da im Falle des Adrenalins die Menge des Metallkatalysators, die notwendig ist um die *maximale* Oxydationsgeschwindigkeit zu erreichen, unvergleichlich höher ist als die vielleicht gegenwärtigen Metallspuren.

b) Die Oxydation des Adrenalins hängt ab von der Bildung eines Komplexes Adrenalin-Metall (Kupfer, Nickel oder Mangan). Im Falle des Kupfers entspricht die maximale Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauches bei pH 7.3 einem Verhältnis Cu^{++} Ionen/Mol Adrenalin von der Grössenordnung $\frac{1}{4}$. Der Wert dieses Verhältnisses ist vom pH abhängig.

c) Die Fähigkeit des Kupfers, die Oxydation des Adrenalins zu katalysieren, ist derjenigen des Nickels und des Mangans überlegen.

d) Eisen bildet mit Adrenalin einen violetten Komplex, der unter den Versuchsbedingungen nicht autoxydabel ist; Magnesium scheint auf Adrenalin nicht einzuwirken.

e) Der gesamte oxydative Abbau des Adrenalins entspricht der Bindung von 3 Molekeln Sauerstoff per Molekel Adrenalin im Falle einer Kupferkatalyse, und von mindestens 4 Molekeln Sauerstoff per Molekel Adrenalin im Falle einer Nickel- oder Mangankatalyse.

f) Die Autoxydationsgeschwindigkeit des Komplexes Adrenalinkupfer ist abhängig vom *Teildruck des Sauerstoffs*; die Reaktion ist scheinbar erster Ordnung in Bezug auf Sauerstoff in ihrer Initialphase; sie ist abhängig vom pH und von der Temperatur; ihre Aktivierungsenergie scheint ungefähr 25000 Calorien/Molekel zu betragen.

g) Unter unseren Versuchsbedingungen wird die Oxydation des Adrenalins durch die Gegenwart von 0.2 M NaCl und noch mehr von 0.2 M KCl beschleunigt.

h) Die mögliche Teilnahme der Phosphate an den untersuchten Reaktionen soll in einer späteren Veröffentlichung besprochen werden.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ K. BHAGVAT ET D. RICHTER, *Biochem. J.*, 32 (1938) 1397.
- ² D. E. GREEN ET D. RICHTER, *Biochem. J.*, 31 (1937) 596.
- ³ D. KEILIN ET T. MANN, *Proc. Roy. Soc. London B*, 125 (1938) 187.
- ⁴ D. KEILIN ET T. MANN, *Nature*, 143 (1939) 23.
- ⁵ F. KÜBOWITZ, *Biochem. Z.*, 292 (1937) 221; 299 (1938) 32.
- ⁶ D. RICHTER, *Biochem. J.*, 31 (1937) 2022.
- ⁷ S. SAKUMA, *Biochem. Z.*, 142 (1923) 68.
- ⁸ A. SZENT-GYÖRGYI, *Z. physiol. Chem.*, 254 (1938) 147.
- ⁹ O. WARBURG, *Z. physiol. Chem.*, 92 (1914) 230.
- ¹⁰ R. F. WEINLAND ET K. BINDER, *Ber.*, 45 (1912) 1113.

Reçu le 20 avril 1949