

Kurze Mitteilungen

Maximalumfang: 6 Schreibmaschinenseiten (alles inbegriffen). Bis zum 15. des Monats bei der Redaktion eingehende Manuskripte können günstigenfalls am 15. des folgenden Monats veröffentlicht werden.

Über den Steringehalt pflanzlicher Mikrosomen*

Summary

The composition of microsomal lipids from *Spirodela oligorrhiza* L., *Lactuca sativa* L., and *Allium porrum* L. plants was investigated. Contamination by chloroplast lipids was calculated and eliminated, giving the lipids of "chloroplast-free microsomes" (CFM). These lipids originate from the endoplasmic reticulum and contain 6 to 14% sterol compounds and 38 to 45% phospholipids. On a total lipid base the sterol content is of the same range in microsomes of both plant and animal origin. The ratio of sterol compounds to phospholipids in plant microsomes is 0.14 to 0.33 compared to 0.07 to 0.17 in liver microsomes. These results suggest that sterol compounds represent an essential part of the lipids of both plant and animal microsomes.

Einleitung

Phytosterine und ihre Derivate sind regelmäßige Bestandteile pflanzlicher Zellen und erfüllen darin eine noch unbekanntete Funktion¹. Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, daß diese Verbindungen bei der Fraktionierung von Zellhomogenaten in der Mikrosomenfraktion angereichert sind^{1-5, 13}, was darauf schließen läßt, daß sie *in vivo* Bestandteile des endoplasmatischen Retikulums darstellen. Die Angaben über ihren quantitativen Anteil am Lipidbestand dieser Strukturen sind jedoch unvollständig und lassen von dieser Seite her kein Urteil über ihre Bedeutung zu. Bisherige Untersuchungen der Lipidzusammensetzung pflanzlicher Mikrosomen beziehen sich nur auf Phospholipide⁶ oder berücksichtigen nur die freien und veresterten, nicht aber die glykosylierten Sterine². Sterinreiche Strukturen wurden auch aus Kartoffelknollen isoliert, jedoch nicht auf ihre Zusammensetzung untersucht³.

Unsere Untersuchungen sollen zeigen, welchen Anteil die Sterinverbindungen am Lipidbestand pflanzlicher Mikrosomen gesamthaft haben. Zu diesem Zweck wurden Mikrosomenfraktionen aus *Spirodela oligorrhiza* L., *Lactuca sativa* L. und *Allium porrum* L. isoliert. Die daraus extrahierten Lipide wurden auf ihren Gehalt an Glykolipiden, Phospholipiden und Sterinverbindungen untersucht. Da die Mikrosomenfraktion noch andere Zellbestandteile, vor allem Plastidenfragmente, enthält, welche reich an Lipiden, aber arm an Sterinverbindungen sind¹⁸, wird der gefundene Steringehalt der Mikrosomen zu niedrig. Eine Korrektur läßt sich rechnerisch durchführen, wenn die Zusammensetzung der Chloroplastenlipide ermittelt und daraus über den Chlorophyllgehalt errechnet wird, welcher Anteil des Mikrosomenlipids aus den Chloroplastenfragmenten stammt. Nach Abzug dieses Anteils ergibt sich das Lipid der «chloroplastenfreien Mikrosomen» (CFM).

* Eingegangen am 21. Januar 1975.

Material und Methoden

Spirodela oligorrhiza L. (Stamm 220176) wurde in Fernbachkolben auf 200 ml Nährlösung mit 1% Glucose⁷ während 10 bis 12 Tagen kultiviert. Frisch geernteter Lattich (*Lactuca sativa* L.) und Lauch (*Allium porrum* L.) wurden vom Markt bezogen. Das Material wurde mit der gleichen Menge eines Mediums auf einer Walzenmühle homogenisiert, das auf 1 Liter folgende Zusätze enthält: 0,05 M Tris, 0,01 M KCl, 0,01 M MgSO₄, 0,01 M EDTA, 0,01 M Mercaptoäthanol und 0,5 M Rohrzucker. Der pH-Wert wurde, um den enzymatischen Lipidabbau auf ein Minimum zu reduzieren, auf 8,0 eingestellt¹⁷. Nach Filtrieren des Homogenats durch Gaze wurde 20 min bei 10000 g zentrifugiert (Sediment = Rohchloroplasten). Der Überstand wurde nach Zusatz von CaCl₂ in einer Konzentration von 8 mM/Liter¹⁵ 60 min bei 38000 g zentrifugiert (Sediment = Rohmikrosomen). Zur weiteren Reinigung wurden die Rohchloroplasten auf einem Gradienten mit den Zusätzen des Mediums und 16 bis 45% (g/g) Rohrzucker 20 min bei 1500 g und die Rohmikrosomen auf einem gleichen Gradienten 60 min bei 90000 g zentrifugiert. Die Chloroplasten wurden mit Wasser, die Mikrosomen mit 8 mM/Liter CaCl₂ gewaschen und 30 min bei 38000 g sedimentiert. Aliquote Teile der Sedimente wurden zur Bestimmung von Chlorophyll⁷, Protein⁷, NADH-Cytochrom-c-Reduktase⁶ und zur Extraktion der Lipide verwendet⁷. Die Bestimmung der Phospholipide erfolgte nach Bartlett⁶, die der Galactolipide nach Trennung auf DC-Platten (Kieselgel G, Chloroform-Methanol-Äthylacetat-Ammoniak 2% 50:25:25:1,5⁹) nach dem Anthronverfahren¹⁰. Zur Hydrolyse der Sterinverbindungen wurde das ätherlösliche Lipid (E-Lipid) in einem Seitenarmkolben¹¹ nach Zusatz von Cholesterol als internem Standard mit einem Gemisch von Äthanol-Wasser-HCl konz. 9:2:1 (v/v) 6 h am Rückfluß erhitzt. Die freien Sterinalkohole wurden mit 5 ml Petroläther-Äther 1:1 (v/v) ausgeschüttelt, auf Kieselgel G mit Chloroform-Äthanol 100:2 (v/v) chromatographiert, mit Rhodamin B sichtbar gemacht und mit Äther eluiert. Die Proben wurden silyliert¹² und gaschromatographisch getrennt (Perkin Elmer 990, OV-101 2% auf Chromosorb W, 1/8 in. ID (Glas), 6 ft., 220°C, 55 ml N₂/min, FID). Die prozentualen Anteile der einzelnen Komponenten im CFM-Lipid wurden wie folgt berechnet: Wenn die prozentualen Anteile einer Komponente A im Chloroplastenlipid A_c und im Mikrosomenlipid A_m und ferner die Chlorophyllgehalte im Chloroplastenlipid C_c und im Mikrosomenlipid C_m betragen, ergibt sich für den Anteil der Komponente A im CFM-Lipid

$$A_{cfm} = \frac{A_m \cdot C_c - A_c \cdot C_m}{C_c - C_m} \quad (I)$$

Das Verhältnis von E-Lipid zu Protein der CFM (R_{cfm}) wurde ebenfalls aus den entsprechenden Werten der Chloroplastenfraktion (R_c) und der Mikrosomenfraktion (R_m) und aus den beiden Chlorophyllgehalten C_c und C_m berechnet nach der Beziehung

$$R_{cfm} = \frac{C_c - C_m}{\frac{C_c}{R_m} - \frac{C_m}{R_c}} \quad (II)$$

Resultate und Diskussion

Aus Tabelle 1 geht hervor, daß die gewonnenen Mikrosomenlipide je nach Pflanze 5,1 bis 9,4% Chlorophyll enthalten. Demgegenüber beträgt der Chlorophyllgehalt

Tabelle 1. Zusammensetzung der ätherlöslichen Lipide (E-Lipid) aus Chloroplasten (C), Mikrosomen (M) und «chloroplastenfreien Mikrosomen» (CFM)

	<i>Spirodela</i>			<i>Lactuca</i>			<i>Allium</i>		
	C	M	CFM	C	M	CFM	C	M	CFM
Chlorophyll	19,1	9,4	0	19,3	5,1	0	17,5	5,8	0
Monogalactosyldiglycerid	18,2	9,6	1,3	21,5	7,7	2,7	19,0	7,1	1,2
Digalactosyldiglycerid	12,1	10,9	9,7	17,7	5,2	0,7	15,2	1,7	0
Phospholipide	17,7	28,3	38,5	13,6	34,8	42,5	13,8	34,1	44,6
Sterinverbindungen*	1,56	6,9	12,1	1,48	10,8	14,1	0,92	4,35	6,1
E-Lipid/Protein	1,10	1,25	1,43	1,04	0,95	0,92	0,92	1,02	1,07
Sterinverbindungen*/Phospholipide			0,31			0,33			0,14
NADH-Cytochrom-c-Reduktase**	12	31	55	13	64	80	58	111	142

* Freie Sterole, Ester, Glycoside und Acyl-Glycoside ** nM-Cytochrom-c-Reduktase \times [min \times mg Protein]⁻¹

im Chloroplastenlipid 17,5 bis 19,3%, was dem Gehalt nahezu reiner Chloroplasten entspricht¹⁴. Daraus läßt sich berechnen, daß 26 bis 49% des aus der Mikrosomenfraktion gewonnenen Lipids aus Chloroplastenfragmenten, die restlichen 74 bis 51% aus den «chloroplastenfreien Mikrosomen» (CFM) und somit vorwiegend aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) stammen. Dafür spricht auch die für diese Strukturen berechnete hohe Aktivität der NADH-Cytochrom-c-Reduktase, eines für das ER typischen Enzyms⁸. Die Berechnung nach (I) ergibt, daß das E-Lipid dieser Strukturen 6% (*Allium*) bis 14% (*Lactuca*) Sterinverbindungen und 38 bis 45% Phospholipide enthält. Der Gehalt an Galactolipiden ist nur in *Spirodela* für Digalactolipid signifikant von Null verschieden, was bedeuten könnte, daß in diesem Fall Digalactolipid auch außerhalb der Chloroplasten vorkommt.

Der Anteil der Sterinverbindungen am Gesamtlipid ergibt somit für pflanzliche Mikrosomen ähnliche Werte wie für Mikrosomen der Säugerleber, wo ein Betrag von 8% gefunden wurde¹⁶. Das Verhältnis von Sterinverbindungen zu Phospholipiden beträgt in Pflanzen 0,14 bis 0,33, in den tierischen Strukturen je nach Subfraktion dagegen 0,07 bis 0,17¹⁶. Dies bedeutet, daß pflanzliche Mikrosomen, die aus etwa gleichen Teilen Lipiden und Proteinen aufgebaut sind, gemessen an den Phospholipiden etwa doppelt soviel Sterinverbindungen enthalten wie entsprechende tierische Strukturen.

Diese Ergebnisse lassen erkennen, daß die Sterinderivate im pflanzlichen ER mengenmäßig mindestens so stark vertreten sind wie in gleichartigen Strukturen tierischer Zellen und daß sie für den Aufbau dieser Membransysteme offenbar unerläßlich sind. Während jedoch für die tierischen Zellen ein einziges Hauptsterin (Cholesterin) in ausschließlich freier und veresterter Form typisch ist, enthalten Pflanzen in der Regel mehrere Sterinalkohole, die zum Teil glykosyliert sind. In unseren Beispielen wurden durchwegs Sitosterol, Stigmasterol

und Campesterol gefunden, von denen 16% (*Spirodela*) bis 50% (*Allium*) in Glykosidform vorliegen. Nachdem gezeigt wurde, daß solche Glykoside keinen Einfluß auf die Packungsdichte von Phospholipiden und damit auf die Membranpermeabilität ausüben¹⁹, ist ihre Aufgabe in diesen Strukturen noch unklar. In weiteren Versuchen wird außerdem zu prüfen sein, ob sich die pflanzlichen Mikrosomenfraktionen in Subfraktionen mit unterschiedlicher Lipidzusammensetzung unterteilen lassen. Die Arbeiten wurden vom Schweizerischen Nationalfonds unterstützt.

Literatur

- 1 C. Grunwald, *Plant Physiol.* 45 (1970) 663.
- 2 R.D. Brandt und P. Benveniste, *Biochim. Biophys. Acta* 282 (1972) 85.
- 3 R. Dupéron, M. Brillard und P. Dupéron, *C. R. Sér. D* 274 (1972) 2321.
- 4 R. J. Kemp und E. I. Mercer, *Biochem. J.* 110 (1968) 119.
- 5 W. Eichenberger und E. C. Grob, *FEBS Letters* 11 (1970) 177.
- 6 R. P. Donaldson, N. E. Tolbert und C. Schnarrenberger, *Arch. Biochem. Biophys.* 152 (1972) 199.
- 7 E. C. Grob und W. Eichenberger, *FEBS Letters* 5 (1969) 335.
- 8 L. Ernster und L. C. Jones, *J. Cell Biol.* 15 (1962) 563.
- 9 A. Radunz, *Z. physiol. Chem.* 350 (1969) 411.
- 10 E. Heinz, *Biochim. Biophys. Acta* 144 (1968) 333.
- 11 M. Kates, *J. Lipid Res.* 5 (1964) 132.
- 12 C. C. Sweely, R. Bentley, M. Makita und W. W. Wells, *J. Amer. Chem. Soc.* 85 (1963) 2497.
- 13 M.-A. Hartmann, M. Ferne, C. Gigot, R. Brandt und P. Benveniste, *Physiol. Vég.* 11 (1973) 209.
- 14 R. B. Park und J. Biggins, *Science* 144 (1964) 1009.
- 15 S. A. Kamath und E. Rubin, *Arch. Biochem. Biophys.* 158 (1973) 312.
- 16 H. Glaumann, *Structural and functional heterogeneity of the endoplasmic reticulum in the liver cell*, Stockholm 1971.
- 17 T. Galliard, *Biochem. J.* 121 (1971) 379.
- 18 W. Eichenberger und W. Menke, *Z. Naturforsch.* 21b (1966) 859.
- 19 C. Grunwald, *Plant Physiol.* 48 (1971) 653.

W. Eichenberger

Institut für organische Chemie der Universität Bern
CH-3012 Bern/Schweiz, Länggäßstraße 7

Ternary Complexes in Solution, XXIII¹: Comparison of the Stability of 2,2'-Bipyridyl-Cu²⁺-1,2-Diaminobenzene with some Related Mixed-Ligand Complexes*

Summary

The stability of the mixed-ligand Cu²⁺ complexes containing 2,2'-bipyridyl (Bipy) and 1,2-diaminobenzene (Dab), *o*-aminophenolate (Ap) or pyrocatecholate (Pyr) is compared by determining the constants ($I = 0.1$, NaClO₄; 25°) due to Cu(Bipy)₂ + CuL₂ ⇌ 2 Cu(Bipy)L (log X) and Cu(Bipy) + CuL ⇌ Cu(Bipy)L + Cu (Δ log K). The discriminating qualities of Cu(Bipy)²⁺ are obvious: Cu(Bipy)(Dab)²⁺, log X = 1.06, Δ log K = -1.18; Cu(Bipy)(Ap)⁺, log X = 3.14, Δ log K = -0.31; and Cu(Bipy)(Pyr), log X = 6.15, Δ log K = +0.43. This discriminating behavior of Cu²⁺-amine 1:1 complexes is observed only with tert. aromatic-heterocyclic but not with aliphatic amines.

Earlier studies of mixed-ligand Cu²⁺ complexes revealed a surprisingly high stability of those ternary complexes formed by 2,2'-bipyridyl or related tert. aromatic-heterocyclic amines and a second ligand with O as donor atoms^{2,3}. For example^{2,4}, pyrocatecholate forms a more stable complex with Cu(2,2'-bipyridyl)²⁺ than with Cu(aq)²⁺. Additionally, Cu(Bipy)²⁺ shows remarkable discriminating qualities, *i.e.* oxalate⁵ is more firmly bound than ethylenediamine², while the stability of the corresponding complex with glycinate is about intermediate². The second ligands occurring in the mentioned series, *i.e.* oxalate, glycinate and ethylenediamine, are of aliphatic nature. As the π system of the tert. aromatic-heterocyclic amine is known to be crucial for the qualities of its mixed-ligand complexes^{2,3}, it appeared appropriate to compare the stability of the mentioned complexes with those formed by Cu(Bipy)²⁺ and a similar series of ligands derived from benzene, *i.e.* pyrocatecholate (Pyr), *o*-aminophenolate (Ap), and 1,2-diaminobenzene (Dab). Of these later complexes only the stability of Cu(Bipy)(Pyr) had been determined so far^{2,4}. Now, we have studied the systems, Bipy-Cu²⁺-Ap and Bipy-Cu²⁺-Dab⁶. The acidity constants of the ligands and the stability constants of their binary Cu²⁺ complexes are given in Table 1. Table 2 contains the constants of the mixed-ligand Cu²⁺ complexes formed by 2,2'-bipyridyl and 1,2-diaminobenzene or *o*-aminophenol. For the ternary complexes the overall constant log β_{Cu(Bipy)L}^{Cu} according to equilibrium 1 was computed². The constant log K_{Cu(Bipy)L}^{Cu(Bipy)} according to equilibrium 2 was calculated from eq. 3. Of course, one may consider the reaction between CuL and 2,2'-bipyridyl, too; the corresponding equilibrium constant was calculated according to eq. 4 and is also listed in Table 2.

There are two common ways to characterize the stability of mixed-ligand complexes^{12,13}. One is according to eq. 5, where Δ log K corresponds to equilibrium 6. The other

is based on log X (eq. 7) and equilibrium 8. Generally, one would expect to observe negative values for Δ log K (eq. 5), since usually it holds that $K_{CuL}^{Cu} > K_{CuL_2}^{Cu}$ (*cf. e.g.* Table 1). To give an unambiguous statistical value for Δ log K_{Cu} is rather difficult, but recently - 0.9 was suggested¹³. To judge the conditions in a solution which contains the same or a smaller amount of ligands, compared to the concentration of the metal ion, Δ log K is preferably used, while reasoning on a solution containing excess of ligands is best based on log X. Obviously, this is the consequence of the fact that the one method relies on the 1:1 complexes (*cf.* eqs. 5 and 6) and the other on the 1:2 complexes (*cf.* eqs. 7 and 8). The statistical value¹⁴ due to X of equilibrium 8 is 4, *i.e.* log X = 0.6.

Table 1. Negative log Acidity Constants of 2,2'-Bipyridyl (Bipy), 1,2-Diaminobenzene (Dab), and *o*-Aminophenol (Ap), and log Stability Constants of Their Binary Cu²⁺ Complexes^a

	Bipy ⁹	Dab	Ap
$pK_{H_2L}^H$	- 0.2 ^b	0.6 ^c	4.74 ± 0.01
pK_{HL}^H	4.49	4.63 ± 0.01	9.87 ± 0.01
log K _{CuL} ^{Cu}	8.00	4.44 ± 0.01 ^{d, e}	8.49 ± 0.02 ^{d, f}
log K _{CuL₂} ^{CuL}	5.60	3.42 ± 0.03	7.03 ± 0.09
log β _{CuL₂} ^{Cu}	13.60	7.86	15.52

^a $I = 0.1$, NaClO₄; 25°C. The given range of error corresponds to three times the standard deviation. ^b Ref. 10. ^c Ref. 11. ^d Value from titrations with Cu²⁺ in excess. ^e Titrations with Dab in excess gave: 4.43 ± 0.01. ^f Titrations with Ap in excess gave: 8.48 ± 0.04.

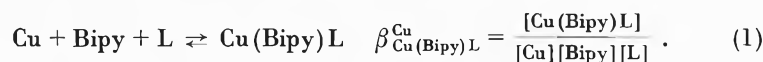
Table 2. Log Stability Constants of the Ternary 2,2'-Bipyridyl-Cu²⁺-1,2-Diaminobenzene and 2,2'-Bipyridyl-Cu²⁺-*o*-Aminophenolate Complexes^a

	Cu(Bipy)(Dab) ²⁺	Cu(Bipy)(Ap) ⁺
log β _{Cu(Bipy)L} ^{Cu}	11.26 ± 0.05	16.18 ± 0.02
log K _{Cu(Bipy)L} ^{Cu(Bipy)}	3.26	8.18
log K _{CuL(Bipy)} ^{CuL}	6.82	7.69
Δ log K	- 1.18	- 0.31
log X	1.06	3.14

^a See footnote (a) of Table 1.

A comparison of the data summarized in Figure 1 indicates that there are only slight differences in stability between the ternary complexes containing 2,2'-bipyridyl and a second ligand being either aliphatic or derived

* Received February 3, 1975.



$$\log K_{\text{Cu}(\text{Bipy})\text{L}}^{\text{Cu}(\text{Bipy})} = \log \beta_{\text{Cu}(\text{Bipy})\text{L}}^{\text{Cu}} - \log K_{\text{Cu}(\text{Bipy})}^{\text{Cu}} \quad (3)$$

$$\log K_{\text{CuL}(\text{Bipy})}^{\text{CuL}} = \log \beta_{\text{Cu}(\text{Bipy})\text{L}}^{\text{Cu}} - \log K_{\text{CuL}}^{\text{Cu}} \quad (4)$$

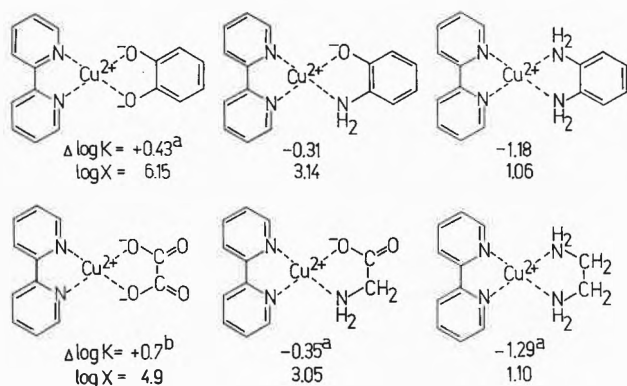


Figure 1. Discriminating qualities of Cu(2,2'-Bipyridyl)²⁺ (a = ref. 2; b = estimation taken from ref. 5)

from benzene. The importance of the π acceptor ability of the amine for the stability of the mixed-ligand complexes becomes obvious from a comparison of the data in Figure 1 with those of the ethylenediamine-Cu²⁺-oxalate system¹⁵, for which $\log X = 0.94$ and $\Delta \log K = -0.79$ (cf. 2, 3, 12, 13). However, the most important result is the confirmation of the discriminating qualities of Cu²⁺-complexes formed with tert. aromatic-heterocyclic amines, i.e. of Cu(Bipy)²⁺: The complex formed with pyrocatechol is considerably more stable than the one with 1,2-diaminobenzene; in accord herewith is the stability of Cu(Bipy)(Ap)⁺. These differences in stability are reflected, of course, in the concentration of the ternary complexes present in such mixed-ligand systems; an instructive example is shown in Figure 2. In contrast herewith, aliphatic amine-Cu²⁺ complexes, like Cu(ethylenediamine)²⁺, show no discriminating qualities^{12, 13}.

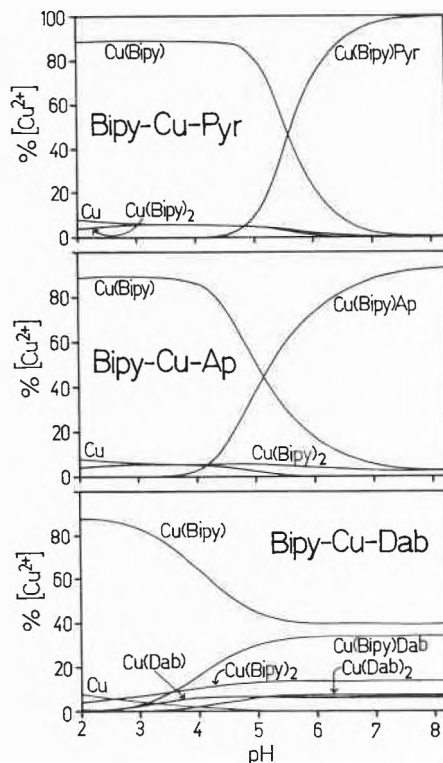
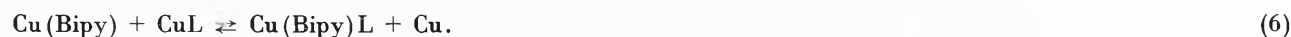
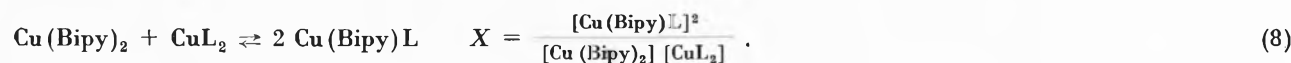


Figure 2. Variation with pH of the concentrations (given as the percentage of the total Cu²⁺ present) of the several species present in an aqueous solution ($I = 0.1$; 25°) of Cu²⁺, 2,2'-bipyridyl (Bipy), and pyrocatechol (Pyr) [upper part: Cu(Pyr) reaches its maximal concentration at pH 6 with 1.2%; Cu(Pyr)₂²⁻ is less than 0.1% at pH < 8.3]³ or o-aminophenolate (Ap) [middle part: Cu(Ap)⁺ reaches its maximal concentration at pH 5.4 with 3.3%; Cu(Ap)₂ is less than 2.3% at pH < 8.3] or 1,2-diaminobenzene (Dab) (lower part). Computed with the constants of ref. 2, and Tables 1 and 2; hydrolysis was omitted in these calculations

$$\Delta \log K = \log K_{\text{Cu}(\text{Bipy})\text{L}}^{\text{Cu}(\text{Bipy})} - \log K_{\text{CuL}}^{\text{Cu}} = \log K_{\text{CuL}(\text{Bipy})}^{\text{Cu}} - \log K_{\text{Cu}(\text{Bipy})}^{\text{Cu}} \quad (5)$$



$$\begin{aligned} \log X &= 2 \log \beta_{\text{Cu}(\text{Bipy})\text{L}}^{\text{Cu}} - (\log \beta_{\text{Cu}(\text{Bipy})_2}^{\text{Cu}} + \log \beta_{\text{CuL}_2}^{\text{Cu}}) \\ &= (\log K_{\text{Cu}(\text{Bipy})\text{L}}^{\text{Cu}(\text{Bipy})} - \log K_{\text{CuL}_2}^{\text{CuL}}) + (\log K_{\text{CuL}(\text{Bipy})}^{\text{CuL}} - \log K_{\text{Cu}(\text{Bipy})_2}^{\text{Cu}}) \end{aligned} \quad (7)$$



The measurements and evaluations of complex stabilities were performed with the skillful technical assistance of Miss M. Nicholson and Miss R. Baumbusch. The support of this work by the "Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung" is gratefully acknowledged.

Helmut Sigel and Bernhard Prijs

Institut für Anorganische Chemie
Universität Basel, Spitalstraße 51
CH-4056 Basel (Schweiz)

Footnotes

- 1 Part XXI: Ch. F. Naumann and H. Sigel, *FEBS Letters* 47 (1974) 122.
- 2 R. Griesser and H. Sigel, *Inorg. Chem.* 9 (1970) 1238.
- 3 P. R. Huber, R. Griesser, and H. Sigel, *Inorg. Chem.* 10 (1971) 945.
- 4 G. A. L'Heureux and A. E. Martell, *J. Inorg. Nucl. Chem.* 28 (1966) 481.
- 5 H. Sigel, P. R. Huber, and R. F. Pasternack, *Inorg. Chem.* 10 (1971) 2226.
- 6 All reagents were from Fluka AG, Buchs, Switzerland. The constants were measured by potentiometric pH titrations (25°; $I = 0.1$, NaClO_4) as described². $K_{\text{CuL}}^{\text{Cu}}$ was determined from 1:1 titrations ($[\text{Cu}^{2+}]_{\text{tot}} = 8 \times 10^{-4}\text{M}$ or $1.6 \times 10^{-3}\text{M}$; volume 50 ml; 0.1 NaOH) by taking into account $K_{\text{CuL}_2}^{\text{CuL}}$. The latter constant was calculated for the *o*-aminophenol system according to Irving and Rossotti⁷ from titrations where $[\text{Ap}] = 1.6 \times 10^{-3}\text{M}$ ($[\text{L}]:[\text{Cu}^{2+}] = 1:0.7$ to 0.4 ; volume 50 ml; 0.1 N NaOH); for the 1,2-diaminobenzene system titrations with $[\text{Dab}] = 1.6 \times 10^{-2}\text{M}$ ($[\text{L}]:[\text{Cu}^{2+}] = 1:0.5$ to 0.25 ; volume 50 ml; 1 N NaOH) were carried out and evaluated². The stability constant, $\beta_{\text{Cu}(\text{Bipy})\text{L}}^{\text{Cu}}$, of the ternary systems was computed² from the data obtained by alkalimetric titrations with 0.1 N NaOH of solutions (50 ml) containing Cu^{2+} , 2,2'-bipyridyl and L in a ratio of 1:1:1 (each $8 \times 10^{-4}\text{M}$ or $1.6 \times 10^{-3}\text{M}$), and by considering the species H, H_2Bipy , HBipy , Bipy , $\text{Cu}(\text{Bipy})$, $\text{Cu}(\text{Bipy})_2$, H_2L , HL , L , CuL , CuL_2 , Cu and $\text{Cu}(\text{Bipy})\text{L}$. Hydrolysis was taken into account in all experiments, and all of them were carried out under N_2 to prevent oxidation (especially of Dab)⁸.
- 7 H. Irving and H. S. Rossotti, *J. Chem. Soc.* 1953, 3397.
- 8 K. Wüthrich and S. Fallab, *Helv. Chim. Acta* 47 (1964) 1440.
- 9 G. Anderegg, *Helv. Chim. Acta* 46 (1963) 2397.
- 10 R. H. Linnell and A. Kaczmarczyk, *J. Physic. Chem.* 65 (1961) 1196.
- 11 K. Wüthrich and S. Fallab, *Chimia* 17 (1963) 356.
- 12 H. Sigel, Structural Aspects in Mixed-Ligand Complex Formation, in *Metal Ions in Biological Systems* (H. Sigel, Ed.), Marcel Dekker, Inc., Vol. 2, p. 63, New York 1973.
- 13 H. Sigel, *Angew. Chem.*, in press; *Angew. Chem. Internat. Ed.*, in press (summer 1975).
- 14 R. DeWitt and J. I. Watters, *J. Amer. Chem. Soc.* 76 (1954) 3810; S. Kida, *Bull. Chem. Soc. Jap.* 29 (1956) 805.
- 15 H. Sigel, R. Caraco, and B. Prijs, *Inorg. Chem.* 13 (1974) 462.