

Wirtszellen ist möglicherweise die Ursache für die außерordentlich selektive Cytotoxizität von QHS. Mit der Vorstellung des ersten Modells für die irreversible Denaturierung/Inaktivierung des Redoxzentrums in diesen Spezies, – die beispielsweise bei Markierungsexperimenten mit radioaktiven Isotopen wegen ihrer geringen Konzentration möglicherweise übersehen werden, – wird die vorliegende Arbeit wahrscheinlich Anlaß für weitere Untersuchungen dieses bisher weitgehend unbeachteten Gebietes der Nicht-Häm-Proteine geben. Darüber hinaus könnten die hierbei erhaltenen Ergebnisse unser Verständnis der Parasiten-abtötenden Wirkung von QHS völlig verändern.

Eingegangen am 6. April,

veränderte Fassung am 12. Mai 1999 [Z13239]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2580–2582

Stichwörter: Alkylierungen • Chelate • Malariatherapie • Radikale • S-Liganden

- [1] F. H. Collins, S. M. Pasewitz, *Annu. Rev. Entomol.* **1995**, *40*, 195–219.
- [2] a) S. R. Meshnick, A. Thomas, A. Ranz, C. M. Xu, H. P. Pan, *Mol. Biochem. Parasitol.* **1991**, *49*, 181–190; b) S. R. Meshnick, Y.-Z. Yang, V. Lima, F. Kuypers, S. Kamchonwongpaisan, Y. Yuthavong, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37*, 1108–1114; c) J. Bhisutthibhan, X.-Q. Pan, P. A. Hossler, D. J. Walker, C. A. Yowell, J. Carlton, J. B. Dame, S. R. Meshnick, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 16192–16198.
- [3] a) W.-M. Wu, Z.-J. Yao, Y.-L. Wu, K. Jiang, Y.-F. Wang, H.-B. Chen, F. Shan, Y. Li, *Chem. Commun.* **1996**, 2213–2214; b) W.-M. Wu, Y.-K. Wu, Y.-L. Wu, Z.-J. Yao, C.-M. Zhou, Y. Li, F. Shan, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3316–3325.
- [4] a) G. H. Posner, C. H. Oh, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8328–8329; b) G. H. Posner, C. H. Oh, D.-S. Wang, L. Gerena, W. K. Milhous, S. Meshnick, W. Asawamahasadka, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1256–1258; c) G. H. Posner, J. N. Cumming, P. Ploypradith, C. H. Oh, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5885–5886; d) G. H. Posner, S. B. Park, L. Gonzalez, D.-S. Wang, J. N. Cumming, D. Klinedinst, T. A. Shapiro, M. D. Balci, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3537–3538; e) J. N. Cumming, P. Ploypradith, G. H. Posner, *Adv. Pharmacol.* **1997**, *37*, 253–297; f) G. H. Posner, M. H. Parker, J. Northrop, F. S. Elias, P. Ploypradith, S. Xie, T. A. Shapiro, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 300–304.
- [5] a) M. A. Avery, P. C. Fan, J. M. Karle, J. D. Bonk, R. Miller, D. K. Goins, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1885–1897; b) C. W. Jefford, F. Favarger, M. G. H. Vicente, Y. Jacquier, *Helv. Chim. Acta* **1995**, *78*, 452–458; c) C. W. Jefford, M. G. H. Vicente, Y. Jacquier, F. Favarger, J. Mareda, P. Millason-Schmidt, G. Brunner, U. Burger, *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 1475–1487; d) A. J. Bloodworth, A. Shah, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 7551–7554; e) R. K. Haynes, S. C. Vonwiller, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 253–256; f) R. K. Haynes, S. C. Vonwiller, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 257–260.
- [6] A. F. G. Slater, A. Cerami, *Nature* **1992**, *355*, 167–169.
- [7] a) A. Robert, B. Meunier, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5968–5969; b) S. Bharel, R. A. Vishwakarma, S. K. Jain, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1998**, 2163–2166.
- [8] a) W. Asawamahasadka, I. Ittarat, Y.-M. Pu, H. Ziffer, S. R. Meshnick, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, *38*, 1854–1858; b) Y.-Z. Yang, B. Little, S. R. Meshnick, *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48*, 569–573; c) Y.-Z. Yang, W. Asawamahasadka, S. R. Meshnick, *Biochem. Pharmacol.* **1993**, *46*, 336–339.
- [9] Physikalische und spektroskopische Daten von **5** (Zuordnung der ¹H- und ¹³C-NMR-Signale auf Grundlage der DQF-COSY- und HMQC-Spektren): Smp. 45.5–46.5 °C; $[\alpha]_D^2 = +54.5$ ($c = 1.0$ in CHCl_3); ¹H-NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 10.10$ (s, 1H), 2.68 (quint., 1H, $J = 8.0$ Hz; H-9), 2.41 (m, 1H; H-8a), 2.07 (m, 1H; H-6), 2.04 (m, 1H; H-7), 1.84 (dq, $J = 3.4$, 13.0 Hz, 1H; H-8β), 1.68 (br. d, $J = 13.2$ Hz, 1H; H-8α), 1.63 (m, 1H; H-5), 1.52 (m, 1H; H-5a), 1.35 (m, 1H; H-5), 1.33 (m, 1H; H-7), 1.03 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H; Me an C-6), 1.02 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H; Me an C-9), 0.99 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, H-4); ¹³C-NMR

(150 MHz, CDCl_3): $\delta = 204.09$ (C-12), 179.17 (C-10), 91.73 (C-12a), 53.96 (C-5a), 52.84 (C-8a), 37.56 (C-9), 35.31 (C-7), 33.68 (C-6), 22.19 (C-5), 20.65 (C-8), 20.22 (Me an C-6), 13.34 (C-4), 11.42 (Me an C-9); IR (Film): $\tilde{\nu} = 1795$, 1735 cm^{-1} ; MS: m/z (%): 225 [$M+1$]⁺ (56.3), 207 (58.3), 195 (100), 179 (12.7), 167 (0.4), 151 (17.3), 121 (81.3), 97 (29), 83 (91), 69 (65), 55 (91), 43 (18); Elementaranalyse: ber. für $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_3$: C 69.60, H 8.99; gef.: C 69.68, H 9.14.

- [10] A. R. Butler, B. C. Gilbert, P. Hulme, L. Irvine, L. Renton, A. C. Whitwood, *Free Radicals Res.* **1998**, *28*, 471–476.
- [11] P. J. Rosenthal, S. R. Meshnick, *Mol. Biochem. Parasitol.* **1996**, *83*, 131–139.

- [12] H. Atamna, H. Ginsburg, *Eur. J. Biochem.* **1997**, *250*, 670–679.

- [13] Siehe beispielsweise: a) A. C. Beekman, H. J. Woerdenbag, W. van Uden, N. Pras, A. W. T. Konings, H. V. Wikstrom, *J. Pharm. Pharmacol.* **1997**, *49*, 1254–1258; b) Q. Y. Zheng, L. G. Darbie (Hauser Chemical Research), WO-A 9701548 A1, **1997** [Chem. Abstr. **1997**, *126*, 157663]; c) H. C.-Y. Lai, N. P. Singh (University of Washington), WO-A 9634602 A1, **1996** [Chem. Abstr. **1997**, *126*, 26821]; d) S. O. Duke, F. E. Dayan, A. Hernandez, M. V. Duke, H. K. Abbas, *Brighton Crop Prot. Conf. Weeds* **1997**, *2*, 579–586 [Chem. Abstr. **1998**, *128*, 98854]; e) M. Jung, R. F. Schinazi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 931–4; f) R. L. Berens, E. C. Krug, P. B. Nash, T. J. Curiel, *J. Infect. Dis.* **1998**, *177*, 1128–1131.

- [14] Physikalische und spektroskopische Daten von **11** (Zuordnung der ¹H- und ¹³C-NMR-Signale auf Grundlage der DQF-COSY- und HMQC-Spektren): Smp. 148.5–149.5 °C; $[\alpha]_D^2 = -64.9$ ($c = 0.53$ in CHCl_3); ¹H-NMR (CDCl_3): $\delta = 5.95$ (s, 1H; H-12), 3.46 (dq, $J = 1.2$, 7.2 Hz, 1H; H-9), 2.84 (dt, $J = 3.0$, 14 Hz, 1H; H-4α), 2.39 (dt, $J = 14$, 3.0 Hz, 1H; H-4β), 2.12 (tt, $J = 15$, 4.2 Hz, 1H; H-5β), 2.02 (m, 1H; H-5α), 2.00 (m, 1H; H-8a), 1.92 (m, 1H; H-7β), 1.89 (m, 1H; H-8α), 1.73 (m, 1H; H-6), 1.47 (dt, $J = 12$, 2.4 Hz, 1H; H-5a), 1.24 (m, 1H; H-8β), 1.19 (t, $J = 6.6$ Hz, 3H; Me an C-9), 1.12 (dq, $J = 3$, 13 Hz, 1H; 7a), 0.91 (d, $J = 6.0$ Hz, 3H; Me an C-6); ¹³C-NMR (CDCl_3): $\delta = 172.33$ (C-10), 80.60 (C-12), 67.76 (C-12a), 50.58 (C-5a), 44.70 (C-8a), 35.27 (C-9), 34.38 (C-7), 29.91 (C-6), 24.15 (C-4), 23.74 (C-8), 23.62 (C-5), 20.08 (Me an C-9), 12.78 (Me an C-6); IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3501$, 1735 cm^{-1} ; MS: m/z (%): 256 [M^+]⁺ (35), 238 (100); HR-MS: ber. für $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_3\text{S}$: 256.1133; gef.: 256.1132.

4-[3,5-Bis(2-hydroxyphenyl)-1,2,4-triazol-1-yl]-benzoësäure: ein neuartiger, effizienter und selektiver Eisen(III)-Komplexbildner**

Uwe Heinz, Kaspar Hegetschweiler,* Pierre Acklin, Bernard Faller, René Lattmann und Hans Peter Schnebli

In der Humanmedizin kennt man mehrere Krankheitsbilder, die auf einem fehlerhaften Eisenstoffwechsel beruhen.^[1] Eisenmangel ist weitverbreitet, kann jedoch leicht therapiert werden. Die selteneren Eisenüberladungen hat hingegen sehr viel gravierendere Auswirkungen. Da im mensch-

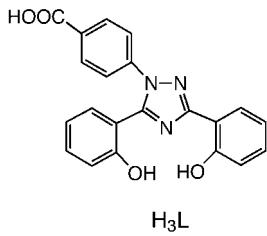
[*] Prof. Dr. K. Hegetschweiler, Dipl.-Chem. U. Heinz
Universität des Saarlandes, Anorganische Chemie
Postfach 15 11 50, D-66041 Saarbrücken
Fax: (+49) 681-302-2663
E-mail: hegetsch@rz.uni-sb.de
Dr. P. Acklin, Dr. B. Faller, Dr. R. Lattmann, Dr. H. P. Schnebli
Novartis Pharma AG, CH-4002 Basel (Schweiz)

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert. Herrn Martin Kiefer, Herrn Prof. Dr. Michael Zeppezauer, Herrn Jürgen Sander, Herrn Bernd Morgenstern und Herrn Dirk Kuppert danken wir für wertvolle Hilfe.

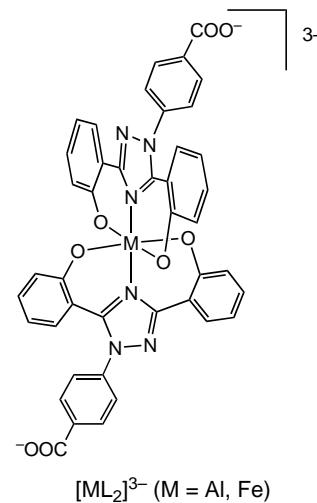
lichen Körper keine aktiven Wege zur Eisenausscheidung vorhanden sind, führt die übermäßige Aufnahme von Eisen zu Ablagerungen von festem FeOOH und dadurch zu Organ schäden mit Todesfolgen. Eine häufige Ursache für Eisen überladung sind ständige Bluttransfusionen, die zur Therapie von Blutkrankheiten wie der β -Thalassämie erforderlich sind (weltweit über 500000 Betroffene).^[2] Durch die Gabe eines geeigneten Komplexbildners kann das überschüssige Fe^{III} gebunden und in eine ausscheidbare Form überführt werden. Heute wird dazu vorwiegend der Siderophor Desferrioxamin-B (Desferal) eingesetzt. Da diese Verbindung jedoch nicht oral applizierbar ist und eine kurze biologische Halbwertszeit aufweist, wurde in den letzten Jahren intensiv nach neuen Eisenchelatbildnern gesucht.^[3] Neben einer geringen Toxizität, geeigneter Biodistribution und Pharmakokinetik sind die metallbindenden Eigenschaften einer solchen Verbindung von zentraler Bedeutung. Dabei ist sowohl eine hohe Stabilität des Fe^{III}-Komplexes als auch eine hohe Selektivität gegenüber anderen Biometallen erforderlich.

Im folgenden berichten wir über die Metallkomplexbildung eines substituierten 3,5-Bis(*ortho*-hydroxyphenyl)-1,2,4-triazols in Lösung. Bereits Ryabukhin entdeckte, daß die Verbindungen dieser Klasse mit zweiwertigen Übergangsmetallionen Komplexe in Form unlöslicher Polymere zu bilden vermögen.^[4] Unsere Studien haben nun ergeben, daß die entsprechende Benzoesäure H₃L^[5] ideale Eigenschaften aufweist, um zur Therapie der Eisenüberladung eingesetzt werden zu können. Aufgrund der guten oralen Bioverfügbarkeit, der Verträglichkeit im Tierversuch und der effizienten Eisenausscheidung ist dieser Ligand ein möglicher Nachfolger für Desferal.^[6]

Freies H₃L reagiert in Lösung als schwache, dreiprotonige Säure. Im Neutralbereich liegt dabei das Carboxylat-Ion H₂L⁻ vor. Die Stickstoffatome im fünfgliedrigen Heterocyclus sind kaum basisch und oberhalb pH 2 nicht protonierbar. Mit Fe^{III} bildet der Ligand einen intensiv dunkelvioletten 1:1- und einen tiefroten 1:2-Komplex.^[7] Die periphere Carboxylatgruppe ist bei der Metallkomplexbildung nicht beteiligt, und [FeL] kann einmal, [FeL₂]³⁻ sogar zweimal protoniert werden. In Übereinstimmung mit der höheren negativen Ladung erwies sich [FeL₂]³⁻ als die etwas stärkere Base. L³⁻ fungiert somit als dreizähniger, meridional koordinierender Ligand,^[8] wobei die Koordination über die beiden Phenolatgruppen und über eines der Stickstoffatome im Heterocyclus erfolgt. Das Fe^{III}-Zentrum ist dadurch in [FeL₂]³⁻ *trans*-N₂O₄-koordiniert. Mit Al^{III} ist die Komplexbildung so langsam, daß im ¹H-NMR-Spektrum für den freien Liganden, den 1:1- und den 1:2-Komplex jeweils getrennte Signale beobachtet werden.^[9] Für die einzelnen Protonierungsgleichgewichte findet man hingegen gemittelte Signale mit pH-abhängiger Verschiebung. Gemäß diesen NMR-spektroskopischen Untersuchungen liegt unterhalb von pH 2 ausschließlich freies H₃L vor. Im Bereich 2 < pH < 4 entsteht [Al(HL)]⁺, das anschließend zu [AlL] deprotoniert wird. Ab pH 5.5 setzt dann die Bildung der



fünfgliedrigen Heterocyclus sind kaum basisch und oberhalb pH 2 nicht protonierbar. Mit Fe^{III} bildet der Ligand einen intensiv dunkelvioletten 1:1- und einen tiefroten 1:2-Komplex.^[7] Die periphere Carboxylatgruppe ist bei der Metallkomplexbildung nicht beteiligt, und [FeL] kann einmal, [FeL₂]³⁻ sogar zweimal protoniert werden. In Übereinstimmung mit der höheren negativen Ladung erwies sich [FeL₂]³⁻ als die etwas stärkere Base. L³⁻ fungiert somit als dreizähniger, meridional koordinierender Ligand,^[8] wobei die Koordination über die beiden Phenolatgruppen und über eines der Stickstoffatome im Heterocyclus erfolgt. Das Fe^{III}-Zentrum ist dadurch in [FeL₂]³⁻ *trans*-N₂O₄-koordiniert. Mit Al^{III} ist die Komplexbildung so langsam, daß im ¹H-NMR-Spektrum für den freien Liganden, den 1:1- und den 1:2-Komplex jeweils getrennte Signale beobachtet werden.^[9] Für die einzelnen Protonierungsgleichgewichte findet man hingegen gemittelte Signale mit pH-abhängiger Verschiebung. Gemäß diesen NMR-spektroskopischen Untersuchungen liegt unterhalb von pH 2 ausschließlich freies H₃L vor. Im Bereich 2 < pH < 4 entsteht [Al(HL)]⁺, das anschließend zu [AlL] deprotoniert wird. Ab pH 5.5 setzt dann die Bildung der



1:2-Komplexe ein, wobei der 1:1-Komplex vollständig verschwindet. Bei den 1:2-Komplexen beobachtet man nur zehn Signale für die aromatischen Protonen. Offensichtlich sind die beiden Liganden in Übereinstimmung mit dem für [ML₂]³⁻ gezeigten Strukturvorschlag symmetriekivalent (C₂). In stark alkalischer Lösung zerfällt der Komplex unter Freisetzung von [Al(OH)₄]⁻, und in 5 mol dm⁻³ NaOD beobachtet man ausschließlich die Signale von freiem, deprotoniertem L³⁻.

Die verschiedenen Protonierungs- und Komplexbildungsgleichgewichte konnten durch umfangreiche potentiometrische und spektrophotometrische Messungen quantitativ aufgeklärt werden. Um eine ausreichende Löslichkeit über den gesamten pH-Bereich zu gewährleisten, arbeitete man generell in einem H₂O/DMSO-Gemisch mit einem Molenbruch von 0.20 DMSO.^[10] In diesem Medium betragen die pK_s-Werte von H₃L 4.62(2), 10.13(1) und 12.09(1).^[11] Wird Fe(NO₃)₃ und H₃L in Konzentrationen von 5 × 10⁻⁴ und 10⁻³ mol dm⁻³ gemischt, so erhält man eine saure Lösung, in der [Fe(HL)]⁺ bereits zu über 95 % vorliegt. In einer solchen Lösung können die Bildungskonstanten für die Folgeprodukte [FeL], [Fe(HL)₂]⁻, [FeL(HL)]²⁻ und [FeL₂]³⁻ durch potentiometrische Titrationen bestimmt werden.^[11-13] Die Stabilität von [Fe(HL)]⁺ ist jedoch zu hoch, um pH-metrisch erfaßt werden zu können. Diese Bestimmung gelang mit einer Reihe spektrophotometrischer Messungen.^[14] Die Kinetik der Komplexbildung wurde ebenfalls spektrophotometrisch untersucht.^[15] Man fand im sauren Bereich für die Bildung von [Fe(HL)]⁺ das Geschwindigkeitsgesetz $d[Fe(HL)^+]/dt = k[Fe^{3+}][H_3L]$, wobei k stark vom pH-Wert abhängt: Bei pH 3.5 beträgt dieser Wert 7×10^2 s⁻¹ mol⁻¹ dm³, bei pH 2 sinkt er auf 30 s⁻¹ mol⁻¹ dm³. Dieses Ergebnis ist in guter Übereinstimmung mit der Vorstellung, daß der Ligand unter Deprotonierung koordiniert. Die Bildung von [Al(HL)]⁺ erfolgt etwa 200mal langsamer ($k = 3.2$ s⁻¹ mol⁻¹ dm³ bei pH 3.5).^[16] Die Stabilität sämtlicher Al^{III}-Komplexe konnte potentiometrisch bestimmt werden.^[11] Entsprechende Messungen wurden auch für Mg^{II}, Ca^{II}, Cu^{II} und Zn^{II} durchgeführt. Bei Cu^{II} und Zn^{II} erschwerte die Bildung fester Phasen diese Bestimmungen,^[17] bei Mg^{II} und Ca^{II} traten solche Ausfällungen hingegen nicht auf.

Die Ergebnisse der Stabilitätsbestimmungen sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Die herausragend hohe Affinität von L^{3-} für Fe^{III} wird durch den Wert von 38.6 für $lg\beta(FeL_2)$ belegt. Besonders bemerkenswert ist jedoch auch die hohe Stabilität von $[AlL_2]^{3-}$. Dem ausgeprägt oxophilen Al^{III} wird generell nur eine geringe Affinität für Stickstoffdonoren

Tabelle 1. Brutto-Bildungskonstanten^[a] $lg\beta_{xy}^{[b]}$ der Komplexe $[ML_xH_y]$ ($L=4-[3,5\text{-Bis}(2\text{-hydroxyphenyl})-1,2,4\text{-triazol-1-yl}]benzoësäure$) in $H_2O/DMSO$.^[c]

	Mg^{II}	Ca^{II}	Cu^{II}	Zn^{II}	Al^{III}	Fe^{III}
$[ML]$	7.6	5.5	18.8	13.3	19.8	23.3
$[M(HL)]$					24.1	27.5
$[ML_2]$			23.9	17.5	34.0	38.6
$[ML(HL)]$					39.4	44.4
$[M(HL)_2]$					44.7	48.7

[a] $\beta_{xy} = [ML_xH_y][M]^{-1}[L]^{-x}[H]^{-y}$. [b] Die geschätzten Standardabweichungen sind 0.1 oder kleiner. [c] Molenbruch von DMSO: 0.20. Bei der Verfeinerung der Bildungskonstanten wurden die pK_s -Werte von H_3L (4.62, 10.13, 12.09) sowie die Gesamtkonzentrationen der Reaktanten festgehalten.

zugeschrieben. Die unerwartet hohe Stabilität des Al^{III} -Komplexes könnte auf sterischen Faktoren beruhen. Die starre Anordnung der Donoratome mit idealer Vororientierung, zusammen mit dem Umstand, daß ausschließlich sechsgliedrige Chelatringe gebildet werden, begünstigt offensichtlich die Komplexbildung mit dem kleinen Al^{III} -Kation in besonderem Maße.^[18] Demgegenüber ist die Affinität für Cu^{II} und Zn^{II} vergleichsweise gering, obwohl für diese Metallzentren eine Bevorzugung von Stickstoffdonoren wohlbekannt ist.^[19] Auch bei Mg^{II} und Ca^{II} wird nur eine geringe Affinität für diesen Liganden beobachtet. Insbesondere ist hier die Anlagerung eines zweiten Ligandmoleküls in verdünnter Lösung kaum mehr signifikant. Die Daten zeigen somit, daß H_3L sowohl hinsichtlich Stabilität als auch hinsichtlich Selektivität der Metallkomplexbildung ideale Bedingungen für den Einsatz zur Therapie der Eisenüberladung aufweist. Die vielversprechenden Ergebnisse der In-vivo-Studien^[6] werden dadurch klar bestätigt: In Gegenwart weiterer biorelevanter Metalle ist 4-[3,5-Bis(2-hydroxyphenyl)-1,2,4-triazol-1-yl]benzoësäure ein hoch selektiver Komplexbildner für Fe^{III} . Wegen der hohen Affinität für Al^{III} könnte die Verbindung jedoch auch für die selektive Sequenzierung von Aluminium von Interesse sein.

Eingegangen am 12. Februar,

veränderte Fassung am 27. Mai 1999 [Z13027]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2568–2570

Stichwörter: Aluminium • Chelate • Eisen

- [1] R. R. Crichton, *Inorganic Biochemistry of Iron Metabolism*, Ellis Horwood, London, **1991** (Series in Inorganic Chemistry).
- [2] a) S. Singh, *Chem. Ind.* **1994**, 452; b) A. E. Martell, R. D. Hancock, *Metal Complexes in Aqueous Solutions*, Plenum, New York, **1996**.
- [3] a) R. C. Hider, S. Singh, J. B. Porter, *Proc. R. Soc. Edinburgh Sect. B* **1992**, *99*, 137–168; b) R. C. Hider, A. D. Hall, *Prog. Med. Chem.* **1991**, *28*, 40–173.
- [4] Yu. I. Ryabukhin, N. V. Shibaeva, A. S. Kuzharov, V. G. Korobkova, A. V. Khokhlov, A. D. Garnovskii, *Koord. Khim.* **1987**, *13*, 869–874;

Yu. I. Ryabukhin, N. V. Shibaeva, A. S. Kuzharov, V. G. Korobkova, A. V. Khokhlov, A. D. Garnovskii, *Sov. J. Coord. Chem. (Engl. Transl.)* **1987**, *13*, 493–499.

- [5] Hergestellt durch Erhitzen äquimolarer Mengen von 2-(2-Hydroxyphenyl)benzo[e]-1,3-oxazin-4-on und 4-Hydrazinobenzoësäure in Ethanol (R. Lattmann, P. Acklin (Novartis AG), WO-A 9749395 A1 **1997** [*Chem. Abstr.* **1998**, *128*, 114953e]). 1H -NMR (500 MHz, $[D_6]DMSO$, TMS): $\delta = 6.88$ (d, 1H), 7.01 (m, 3H), 7.38 (m, 2H), 7.55 (m, 3H), 8.00 (d, 2H), 8.06 (d, 1H), 10.02 (s, 1H), 10.78 (s, 1H), 13.15 (br, 1H); ^{13}C -NMR (125 MHz, $[D_6]DMSO$, TMS): 19 Signale im Bereich $\delta = 113.6$ –166.4. Das eingesetzte Produkt gibt korrekte Elementaranalysen für $C_{21}H_{15}N_3O_4$.
- [6] H. P. Schnebli, *Brit. J. Haematol.* **1998**, *102*, 280 (Abstr. Pap. ISH-EHA Combined Haematology Congress, Amsterdam); ein ausführlicher Bericht über die biochemischen Untersuchungen ist in Vorbereitung.
- [7] UV/Vis-Daten: $[FeHL]^{+}$: $\lambda_{max} = 512$ nm ($\epsilon = 3.1 \times 10^3$ $dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$); $[FeL_2]^{3-}$: $\lambda_{max} = 403$ nm (sh, $\epsilon = 5.0 \times 10^3$ $dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$), 467 nm (sh, $\epsilon = 3.0 \times 10^3$ $dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$). Die Stöchiometrie der beiden Komplexe konnte durch Job-Diagramme eindeutig belegt werden. $[FeL_2]^{3-}$ wurde zudem (aus $MeOH/H_2O$ durch Zugabe von EtOH) als Natriumsalz in fester Form isoliert. Elementaranalyse (%): ber. für $C_{42}H_{24}N_6O_8FeNa_3 \cdot 10.75H_2O$: C 47.63, H 4.33, N 7.93, O 28.32, Na 6.51, Fe 5.27; gef.: C 47.79, H 4.25, N 7.84, O 28.38, Na 6.34, Fe 5.31.
- [8] Molekülmechanischen Rechnungen zufolge ist eine faciale Koordination wegen erheblicher Spannung deutlich benachteiligt: Programm MacroModel V.4.0 (F. Mohamadi, N. G. J. Richards, W. C. Guida, R. Liskamp, M. Lipton, C. Caufield, G. Chang, T. Hendrickson, W. C. Still, *J. Comput. Chem.* **1990**, *11*, 440), AMBER + -Kraftfeld (S. J. Weiner, P. A. Kollman, D. A. Case, U. C. Singh, C. Ghio, G. Alagona, S. Profeta, Jr., P. Weiner, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 765; S. J. Weiner, P. A. Kollman, D. T. Nguyen, D. A. Case, *J. Comput. Chem.* **1986**, *7*, 230), modifiziert zur Berechnung von Fe^{III} -Komplexen.
- [9] Bruker-Avance-DRX-500-Spektrometer (Resonanzfrequenz: 500.13 MHz für 1H), $[D_6]DMSO/D_2O$ (2/8), Gesamtkonzentrationen [$mol dm^{-3}$]: 2×10^{-3} für L und 0.86×10^{-3} für Al.
- [10] Löslichkeit von H_3L bei pH 7.4 in H_2O : $0.4 g dm^{-3}$.
- [11] Sämtliche Lösungen enthielten den gleichen Anteil an DMSO sowie $0.1 mol dm^{-3} KNO_3$. Alle Messungen wurden bei $25.0 \pm 0.1^\circ C$ durchgeführt. Wegen der konstanten Ionenstärke werden die Gleichgewichtskonstanten als Konzentrationsquotienten angegeben, und der pH-Wert ist als $-\lg[H_3O^+]$ definiert. Die Eichung der pH-Elektrode (Titration einer $2 \times 10^{-3} mol dm^{-3} HNO_3$ -Lösung mit KOH) ergab für $K_w = [\text{OH}^-][H_3O^+]$ den Wert $\lg K_w = -15.56$. Die Meßapparatur wurde bereits beschrieben (K. Hegetschweiler, T. Kradolfer, V. Gramlich, R. D. Hancock, *Chem. Eur. J.* **1995**, *1*, 74–88). Zur Auswertung wurden die Computerprogramme SUPERQUAD (P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1985**, 1195) und BEST (R. J. Motekaitis, A. E. Martell, *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 2403) verwendet. Die Komplexbildung fand generell bei einem so tiefen pH-Wert statt, daß die Hydrolyse der Aquaionen vernachlässigt werden konnte.
- [12] Spektrophotometrische Methoden sind für die Auswertung dieser Folgereaktionen weniger geeignet, da sich die Spektren der unterschiedlich protonierten Komplexe nur geringfügig unterscheiden. Eine Auswertung mit dem Programm SPECFIT^[14] im Bereich $3.4 < pH < 6.4$ ergab folgende Brutto-Bildungskonstanten: $lg\beta = 23.5(2)$ ($[FeL]$), $38.2(2)$ ($[FeL_2]^{3-}$), $44.2(2)$ ($[FeL(HL)]^{2-}$). Die Bildung von $[Fe(HL)_2]^-$, das gemäß potentiometrischer Messungen im Bereich um pH 5 zu etwa 10% vorliegt (Abbildung 1), konnte mit dieser Methode nicht verifiziert werden.
- [13] Ein Teilchen der Zusammensetzung $Fe : L : H = 1 : 1 : 0$ kann auch als zweikernige Spezies $[(HL)Fe-(\mu-OH)_2-Fe(HL)]$ oder $[(HL)Fe-(\mu-O)-Fe(HL)]$ aufgefaßt werden (D. M. Kurtz, Jr., *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 585–606). Die Auswertung der Titrationskurve mit diesem Modell führte jedoch zu einer deutlich schlechteren Übereinstimmung ($\sigma_{pH} = [\Sigma w(pH_{gef.} - pH_{ber.})^2 / \Sigma w]^{1/2} = 0.0067$ für $[(HL)_2Fe_2(OH)_2]$, $\sigma_{pH} = 0.0023$ für $[FeL]$).
- [14] Die Bestimmung erfolgte an Lösungen mit $0.01 < [H^+] < 0.1 mol dm^{-3}$, $[Fe]_t = [L]_t = 1.6 \times 10^{-4} mol dm^{-3}$ und $\mu = 0.1$ (KNO_3) unter Verwendung eines Diioden-Array-Spektrophotometers TIDAS-UVNIR/100-1 von J&M mit einer HELLMA-Tauchsonde und durch

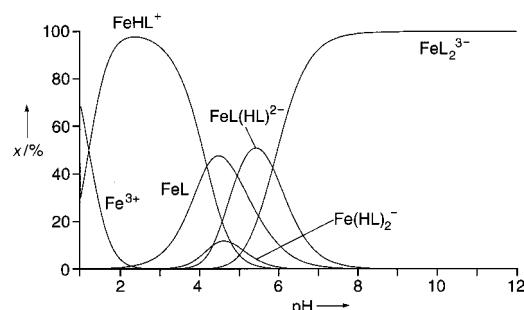


Abbildung 1. Teilchenverteilung (Anteile x [%]) für eine Komplexlösung ($[Fe]_t = 5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $[L]_t = 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ in $H_2O/DMSO$ (8/2)). Es sind nur die Fe-haltigen Spezies gezeigt. Zur Berechnung verwendet man die Bildungskonstanten und die pK_s -Werte aus Tabelle 1.

- Auswertung mit Kleinst-Fehlerquadrate-Verfahren (R. A. Binstead, A. D. Zuberbühler, SPECFIT Version 2.10, Spectrum Software Associates, Chapel Hill, NC 27515-4494 (USA); siehe auch H. Gampp, M. Maeder, C. J. Meyer, A. D. Zuberbühler, *Talanta* **1985**, 32, 257–264).
- [15] Die Messungen wurden auf einem DX17MV-Gerät der Firma Applied Photophysics bei 25°C durchgeführt.
- [16] Die mittlere Verweilzeit eines Wasserliganden in $[Al(OH_3)_6]^{3+}$ ist etwa 150mal größer als bei $[Fe(OH_6)_6]^{3+}$ (D. T. Richens, *The Chemistry of Aqua Ions*, Wiley, Chichester, **1997**).
- [17] In Analogie zu den von Ryabukhin beschriebenen Verbindungen^[4] handelt es sich vermutlich um polymere Komplexe. Die C,H,N-Analyse des Cu-Komplexes stimmt mit der Formulierung $Cu(HL) \cdot 2H_2O$ überein. Um die Bildung fester Phasen zu vermeiden, wurden Austauschtitrationen durchgeführt, in welchen das Metallkation M^{2+} als Nitrilotriacetato(NTA)- oder Iminodiacetato(IDA)-Komplex vorgelegt und in Gegenwart des Liganden H_3L durch Zugabe von KOH in den 1:2-Komplex $[ML_2]^{4-}$ überführt wurde. Alle benötigten pK_s -Werte und Stabilitätskonstanten von H_3NTA und H_2IDA wurden für das $H_2O/DMSO$ -System vorab bestimmt.
- [18] R. D. Hancock, *J. Chem. Educ.* **1992**, 69, 615–621.
- [19] M. Ghisletta, L. Hausherr-Primo, K. Gajda-Schrantz, G. Machula, L. Nagy, H. W. Schmalle, G. Rihs, F. Endres, K. Hegetschweiler, *Inorg. Chem.* **1998**, 37, 997–1008.

Kryo-TEM-Schnappschüsse von auf kleinen Zeolithkristallen adsorbiertem Ferritin**

Daniel Klint, Gunnar Karlsson und Jan-Olov Bovin*

Die Entwicklung von Kryo-Methoden für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) hat die Zahl untersuchbarer biologischer Systeme anwachsen lassen.^[1] Die Kryo-TEM hat sich zu einem Standardwerkzeug für die Untersuchung von Wasser/Detergens-Systemen^[2] und der Keim-

[*] Prof. J.-O. Bovin, Dr. D. Klint
National Center for HREM, Inorganic Chemistry 2
Center for Chemistry and Chemical Engineering
Lund University
P.O. Box 124, S-22100 Lund (Schweden)
Fax: (+46) 46-222-40-12
E-mail: jan-olov.bovin@org2.lth.se
G. Karlsson
The Biomicroscopy Unit, Chemical Center, Lund University (Schweden)

[**] Diese Arbeit wurde vom schwedischen National Science Research Council gefördert. Die Biomikroskopieeinheit wurde von der Knut- und Alice-Wallenberg-Stiftung finanziert.

bildung von Kristallen anorganischer Verbindungen in Wasser entwickelt.^[3, 4] Wir stellen im folgenden erstmals Aufnahmen vor, die die Wechselwirkungen von gelösten Proteinen mit Kristallen von Zeolith Y deutlich machen. Es ließ sich zeigen, daß eine ausgeprägte Adsorption von Ferritin auf ultrastabilem Zeolith Y die Proteinaggregation beeinflußt. Die Adsorption von Ferritinmolekülen auf Kristallen von Low- und High-silica-Zeolith Y führt zu unterschiedlichen Anordnungen der Proteinmoleküle. Auch ließ sich zeigen, daß Strukturinformationen wie Elementarzellenparameter der anorganischen Materialien in eingefrorener Lösung bestimmt werden können.

In den letzten Jahren hat sich die Verwendung von Zeolithen (kristallinen Alumosilicaten) als Alternative oder Ergänzung für die herkömmlichen zur Reinigung von Proteinen entwickelten biochemischen Methoden etabliert.^[5, 6] Frühere Untersuchungen der Adsorption von Proteinen auf ultrastabilem Zeolith Y (USY) hatten ergeben, daß die Proteinadsorption vom pH-Wert und von der Ionenstärke abhängt.^[5] Es wird angenommen, daß der Vorgang vorwiegend über Proteinaggregate vermittelt abläuft, die mit der Zeolithoberfläche wechselwirken.

Ferritin ist ein in Tieren und Pflanzen vorkommendes, kugelförmiges Eisenspeicherprotein, dessen Durchmesser etwa 12 nm beträgt. Der Eisenkern kann aus bis zu 4500 Eisenionen bestehen, was bei der mikroskopischen Untersuchung zu guten Kontrasten führt. In TEM-Aufnahmen sind Ferritinmoleküle als schwarze Punkte zu sehen; der Durchmesser des Eisenkerns beträgt etwa 5 nm. Der durch den Eisenkern bedingte hohe Kontrast erschwert es, die Proteinschale zu erkennen. Apoferritin (Ferritin ohne den Eisenkern) ist ein Doughnut-förmiges Molekül mit einem Durchmesser von 12 nm. Im allgemeinen ist die Löslichkeit eines Proteins in der Nähe des isoelektrischen Punktes (IEP) am geringsten (der IEP ist der pH-Wert, bei dem die Summe aller Ladungen des Proteins null ist). Bei Ferritin liegt der IEP bei $pH = 4.5$, und in Lösungen mit pH-Werten um den IEP liegen demnach Proteinaggregate vor. Die Adsorbensmatrix ist USY, das aus der Stammverbindung NaY durch eine Desaluminierung nach der Synthese erhalten wurde.^[7] Beide Zeolithe weisen die Faujasit(FAU)-Struktur auf, unterscheiden sich aber im Si/Al-Verhältnis und in der Oberflächentextur. Das Si/Al-Verhältnis beträgt bei NaY 2.6 und bei USY 230, was auf den großen Unterschied der Gerüstladungsdichten und demzufolge auch der Oberflächenladungsdichten hinweist. Die Texturen unterscheiden sich durch die bei USY vorhandenen Mesoporen, die bei der Desaluminierung entstehen,^[8] was zu weniger definierten Kristallformen bei USY führt.

Ferritin konnte aus Acetatlösung (20 mmol L^{-1}) bei $pH = 3.6$ (geringe Ionenstärke) und ebenso aus NaCl-haltiger (150 mmol L^{-1} ; große Ionenstärke) 20 mmol L^{-1} Acetatlösung bei $pH = 5.2$ teilweise ausgefällt werden. Aus Glycinlösungen (20 mmol L^{-1}) bei $pH = 3.0$ mit oder ohne NaCl (150 mmol L^{-1}) gelang dies ebensowenig wie aus Acetatlösung (20 mmol L^{-1}) bei $pH = 5.2$. In Lösungen mit geringer Ionenstärke lagen bei $pH = 3.0$ viele verschiedene Proteinaggregate mittlerer Größe vor, die aus weniger als 15–20 Ferritinmolekülen bestanden. Kryo-TEM-Aufnahmen derar-