

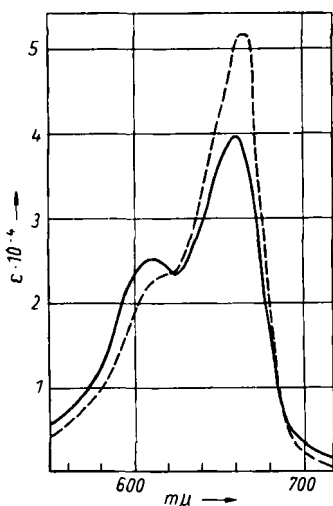
262. Friedrich Cramer: Über Einschlußverbindungen, VI. Mitteil.*): Änderung der Redoxpotentiale in Einschlußverbindungen**)

[Aus dem Chemischen Institut der Universität Heidelberg]
(Eingegangen am 28. August 1953)

Das Redox-Potential von Metylenblau und Dichlorphenol-indophenol ist in Einschlußverbindungen erhöht; das Verhalten dieser Verbindungen ähnelt dem des Gelben Fermentes. Einschließende Verbindungen werden als Modelle für Apofermente aufgefaßt.

Einschlußverbindungen können, wie wir gezeigt haben*), die Eigenschaften des Systems Ferment-Substrat modellmäßig wiedergeben.

Eine Analogie zwischen Einschlußverbindungen und Fermenten besteht aber auch noch in anderer Hinsicht. In den zusammengesetzten Fermenten ist der kolloidale Träger (Apoferment) mit einer spezifischen Gruppe (Cof ferment) zum Holoferment verbunden. Der kolloidale Träger hat dabei die doppelte Aufgabe, das Substrat zu aktivieren*) und das Cof erment zu binden. In dieser Mitteilung wird das Verhalten von reversiblen Redoxsystemen in wäßrigen Lösungen von Cyclodextrin untersucht.



Abbild. 1. Absorptionsspektrum von Metylenblau bei p_{H} 8.3 in Phosphatpuffer ohne ——— und mit 0.5% Cyclodextrin - - - -

Beim Lactoflavin z.B. beträgt das Redoxpotential – 0.185 Volt. Wenn sich Flavimononucleotid mit dem albuminähnlichen Apoferment zum „Alten Gelben Ferment“ verbindet, steigt das Redox-Potential auf – 0.06 Volt¹⁾. Mit diesem Redox-Potential kann es die ihm zukommende Aufgabe erfüllen, den Wasserstoff vom Dihydro-nicotinsäureamid zu übernehmen¹⁾. Mit der Bildung des Holofermentes ist gleichzeitig eine Verschiebung des Absorptionsmaximums nach längeren Wellen und eine Fluorescenz-Löschung verbunden²⁾.

Metylenblau bildet wie viele räumlich passende basische Farbstoffe in wäßriger Lösung eine Einschlußverbindung mit β -Dextrin³⁾. Die Änderung der Lichtabsorption zeigt Abbild. 1. Die Verschiebung nach längeren Wellen beträgt für das Hauptmaximum 5 $m\mu$, für das Nebenmaximum 10 $m\mu$.

*) V. Mitteil.: F. Cramer, Chem. Ber. 86, 1576 [1953], voranstehend.

***) Vorläufige Mitteil.: F. Cramer, Angew. Chem. 65, 320 [1953].

¹⁾ R. Kuhn u. P. Boulanger, Ber. dtsh. chem. Ges. 69, 1557 [1936]; O. Warburg, W. Christian u. A. Griese, Biochem. Z. 282, 157 [1935]; H. v. Euler u. E. Adler, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 298, 233 [1936].

²⁾ O. Warburg u. W. Christian, Biochem. Z. 295, 261, 296, 294, 297, 417, 298, 150 [1938]; H. Theorell, Biochem. Z. 278, 263 [1935].

³⁾ F. Cramer, Chem. Ber. 84, 851 [1951].

Das Redoxpotential von Methylenblau ist bei p_H 8.3 um 0.048 Volt, bei p_H 7.0 um 0.043 Volt erhöht.

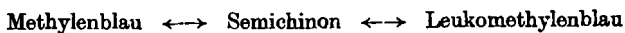
2.6-Dichlor-phenol-indophenol (Tillmanns Reagens) verschiebt sein Absorptionsmaximum bei Bildung der Einschlußverbindung um 20 $m\mu$ nach längeren Wellen.

Das Normalpotential des reduzierenden Systems Farbstoff/Leukoverbindung ist hier bei p_H 8.3 um 0.052 Volt erhöht.

Schon früher hatten wir beobachtet, daß bei der potentiometrischen Titration die Oxydationskraft des Jods in Lösungen von α -Dextrin ganz erheblich vermindert ist⁴⁾. Die Messung des Normalpotentials ergab nun eine Erniedrigung des Redoxpotentials J_2/J' bei p_H 7 mit α -Dextrin um 0.059 Volt. Die Oxydationsfähigkeit des oxydierenden Systems J_2/J' wird also geschwächt. Für β -Dextrin beträgt die Erniedrigung nur 0.034 Volt ganz entsprechend der Tatsache, daß die räumlichen Verhältnisse für die Bildung der α -Dextrin-Jod-Einschlußverbindung günstiger sind.

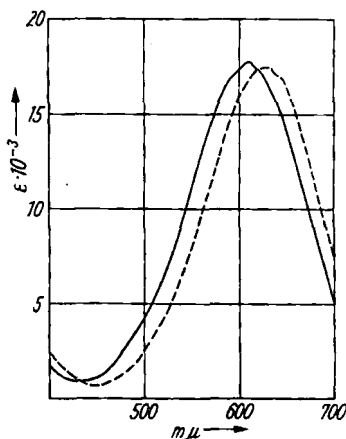
Eine Erhöhung des Redoxpotentials von Methylenblau (Me) sagt aus, daß die reduzierende Kraft des Systems Me/MeH_2 geschwächt ist, die Erhöhung des Potentials um 0.048 Volt bedeutet dabei eine Verminderung der Reduktionsarbeit um 1.13 kcal/Mol. Der Effekt könnte ein Maß dafür sein, daß das Redoxsystem räumlich abgedeckt ist, er könnte aber auch dadurch bewirkt werden, daß MeH_2 stärker zur Bildung der Einschlußverbindung neigt, so daß MeH_2 aus dem Redoxgleichgewicht entfernt wird und ständig ein relativer Überschuß an Me vorhanden ist. Da das Normalpotential von dem molaren Verhältnis Me/MeH_2 bestimmt wird, bleibt in diesem Falle der jeweils gemessene Potentialwert ständig über dem zu erwartenden.

Es ist aber auch möglich, daß die Elektronen des Einschlußhohlraumes die Freie Energie des Reaktionsablaufes



an irgendeiner Stelle verringern. An welcher Stelle des Redox-Vorganges die Einschlußverbindung wirksam wird, läßt sich jedoch zunächst noch kaum mit Sicherheit entscheiden.

Die gleichen Überlegungen gelten für die Änderung des Normalpotentials von 2.6-Dichlor-phenol-indophenol. Die Verbindung ist als halogenhaltiges Molekül zur Bildung von Einschlußverbindungen besonders geeignet. Die Verminderung der Reduktionsarbeit beträgt hier 1.2 kcal/Mol.



Abbild. 2. Absorptionsspektrum von 2.6-Dichlor-phenol-indophenol bei p_H 8.3 in Sek. Phosphatpuffer ohne — und mit 0.5% β -Dextrin - - - -

⁴⁾ l. c.³⁾, S. 855.

Beim Jod dürften die Verhältnisse etwas übersichtlicher liegen. J_2 hat eine große Affinität zu α -Dextrin. Es wird daher ständig aus dem Redox-Gleichgewicht entfernt, was eine Verminderung des Redox-Potentials zur Folge haben muß. Oder anders ausgedrückt: Das Jodmolekül hat als Acceptor das Bestreben, Elektronen aufzunehmen, d.h. reduziert zu werden. Diesem Bestreben kommt der Einschlußhohlraum als Donator entgegen, so daß der Potentialunterschied J_2/J' vermindert wird, und zwar um 1.4 kcal/Mol.

Gemeinsam ist allen Fällen, daß die Normalpotentiale durch Bildung der Einschlußverbindung nach einem „Redoxchemischen Neutralpunkt“ hin verschoben werden; die Potentiale von reduzierenden Systemen werden verstärkt, von oxydierenden Systemen geschwächt.

Die Potentialverschiebung des Lactoflavins ist mit einer Salzbildung zwischen Coferment und Proteinanteil nicht zu erklären, da bei der normalen Salzbildung (p_H 10.5) das Normalpotential nicht erhöht, sondern erniedrigt wird ($E' - 0.300$) (Kuhn u. Boulanger¹⁾). Das Vorliegen eines „topochemischen Salzes“⁵⁾ würde dagegen sowohl die Änderung des Redoxpotentials als auch die spektrale Verschiebung und die Spezifität der Bindung erklären. Das Fluoreszenz-Verhalten von Einschlußverbindungen mit Farbstoffen ist bisher noch nicht näher untersucht⁶⁾ worden. R. Kuhn hat 1938⁷⁾ über die Art der Bindung zwischen Protein und Farbstoff die Vermutung ausgesprochen: „. . . daß die Bindung an die Eiweißkomponente nicht nur salzartig ist, sondern daß überdies, wie bei der Bildung der Flavoproteine Kräfte im Spiele sind, welche eine spezifische, verhältnismäßig feste „Verankerung“ („Einbettung“) der Farbstoffkomponente . . . bewirken. Die wahre Natur dieser Kräfte, die sich an den Chromoproteiden und anderen zusammengesetzten Eiweißkörpern betätigen, ist uns aber noch verborgen.“

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Gewährung einer Sachbeihilfe.

Beschreibung der Versuche

Absorptionsspektren: Die Spektren wurden mit dem Unicam-Spektrophotometer vermessen. Die Konzentration von Metylenblau betrug $c = 2.5 \cdot 10^{-5}$ Mol/l, von Dichlorphenol-indophenol $c = 10^{-4}$ Mol/l. Die Farbstoffe waren in $m/30$ Phosphatpuffer gelöst, der Zusatz von β -Dextrin betrug 0.5%. Die Absorptionsmaxima haben folgende Lage:

	Metylenblau	ohne	mit β -Dextrin, p_H 8.3
$\lambda =$		660	665
$\epsilon =$		$4 \cdot 10^4$	$5.2 \cdot 10^4$
Dichlorphenol-indophenol $\lambda =$		611	630
$\epsilon =$		$1.77 \cdot 10^4$	$1.74 \cdot 10^4$

Redoxpotentiale: Die Redoxpotentiale wurden mit einem Röhrenvoltmeter gegen eine KCl-ges. Kalomelektrode mit einer Platinblechelektrode gemessen. Das Titriergefäß war vollständig abgeschlossen und wurde mit Reinst-Stickstoff durchspült. Die Farbstofflösungen (25 ccm) waren 10^{-4} m in $m/30$ Phosphatpuffer. Der Zusatz von β -Dex-

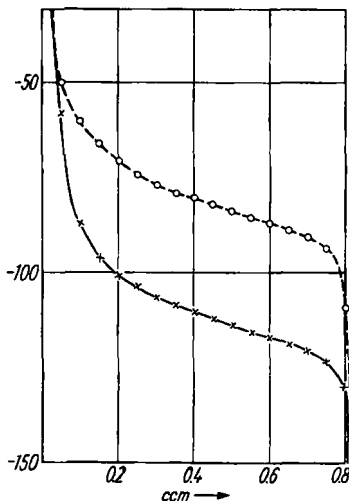
⁵⁾ F. Cramer, Liebigs Ann. Chem. 579, 17 [1953].

⁶⁾ Herrn Prof. R. Kuhn, Heidelberg, danke ich für wertvolle Hinweise.

⁷⁾ R. Kuhn u. N. Sörensen, Ber. dtsch. chem. Ges. 71, 1879 [1938].

trin betrug 0.5%. Titriermittel war $m/_{300}$ Natriumhydrosulfit, ebenfalls in $m/_{30}$ Phosphatpuffer. Die Jodlösung (J_2 in H_2O) war etwa $1.6 \cdot 10^{-3} m$ und wurde mit $n/_{100}$ Thio-sulfat titriert. Die Titrations wurden bei Zimmertemperatur ausgeführt.

Abbild. 3 zeigt als Beispiel die Titrationskurve von Dichlorphenol-indophenol. Zur Ermittlung von E'_0 wurde jeweils 249 mVolt addiert.



Abbild. 3. Potentiomet. Titration von Dichlorphenol-indophenol ohne x-x-x und mit o-o-o 0.5% β -Dextrin. Ordinate mVolt, Abszisse ccm $m/_{300} Na_2S_2O_4$

Die Redoxpotentiale betragen:

		Volt ohne	mit Cyclodextrin (0.5%)
Methylenblau	p_H 8	+ 0.006	+0.049 β -Dextrin
	p_H 8.3	- 0.027	+0.021 " "
Dichlorphenol-indoph. p_H 8.3	p_H 8.3	+ 0.139	+0.191 " "
	p_H 5.4	+ 0.724	+0.705 " "
Jod	p_H 7.0	+ 0.704	+0.655 α -Dextrin
			+0.670 β -Dextrin
			+0.645 α -Dextrin