

Friedrich Cramer und Georg Mackensen

Über Einschlußverbindungen, XXII¹⁾

Cyclodextrin-Imidazol-Verbindungen^{2,3)}

Aus dem Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Abteilung Chemie, Göttingen

(Eingegangen am 27. Dezember 1969)

Es wird versucht, Modelle für das Zusammenwirken der Hydroxygruppe eines Serins und des Imidazolrestes eines Histidins im aktiven Zentrum des Chymotrypsins aufzubauen. Dazu werden Cyclodextrine, die zahlreiche Hydroxygruppen tragen und in ihren inneren Hohlraum andere Stoffe einschließen können, mit 4(5)-Chlormethylimidazol oder Cyclodextrin-Derivate mit 4(5)-Aminoalkylimidazolen zu amorphen, erwartungsgemäß nicht stöchiometrischen Cyclodextrin-Imidazol-Verbindungen umgesetzt. Diese beschleunigen die Hydrolyse von *p*-Nitro-phenylacetat bis etwa 300fach.

Inclusion Compounds, XXII¹⁾

Cyclodextrin-Imidazole Compounds^{2,3)}

A model for the cooperation of a hydroxyl group of the amino acid serine and an imidazole residue of histidine in the active site of chymotrypsin has been synthesized. Cyclodextrins with their numerous hydroxyl groups and a cavity capable of including other molecules and derivatives of cyclodextrins reacted with 4(5)-chloromethylimidazole or 4(5)-aminoalkylimidazoles to give, as expected, amorphous, non stoichiometric cyclodextrin-imidazole compounds. These accelerate the hydrolysis of *p*-nitrophenyl acetate about 300-fold.

Katalytische Wirkungen von Cyclodextrinen – Ring-Molekülen aus 6 (α), 7 (β) oder 8 (γ) α -1,4-verknüpften D-Glucose-Einheiten mit inneren Durchmessern von 6–10 Å – wurden mehrfach beschrieben^{4,5)}, darunter die Pyrophosphat-Spaltung⁶⁾ sowie die Decarboxylierung⁷⁾, und durch Zusammenwirken der Fixierung eines Sub-

¹⁾ XX. Mittel.: F. Cramer, G. Mackensen und K. Senses, Chem. Ber. 102, 494 (1969); XXI. Mittel.: K. Senses und F. Cramer, Chem. Ber. 102, 509 (1969).

²⁾ G. Mackensen, Dissertat., Techn. Univ. Braunschweig 1967; Vorläuf. Mittel.: F. Cramer und G. Mackensen, Angew. Chem. 78, 641 (1966); Angew. Chem. internat. Edit. 5, 601 (1966).

³⁾ Review: F. Cramer und H. Hettler, Naturwissenschaften 54, 625 (1967).

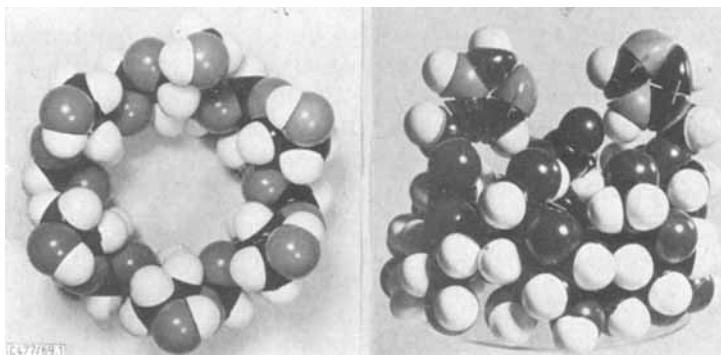
⁴⁾ F. Cramer, Einschlußverbindungen, Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1954; F. Cramer, Liebigs Ann. Chem. 579, 17 (1953); Angew. Chem. 64, 136 (1952); Chem. Ber. 86, 1576 (1953); W. Krum, Dissertat., Univ. Heidelberg 1955; W. Dietsche, Dissertat., Univ. Heidelberg 1958.

⁵⁾ M. L. Bender, R. L. VanEtten, G. A. Clowes und J. F. Sebastian, J. Amer. chem. Soc. 88, 2318 (1966); R. L. VanEtten, J. F. Sebastian, G. A. Clowes und M. Bender, ebenda 89, 3242 (1967); M. L. Bender, R. L. VanEtten und G. A. Clowes, ebenda 88, 2319 (1966); R. L. VanEtten, G. A. Clowes, J. F. Sebastian und M. L. Bender, ebenda 89, 3253 (1967).

⁶⁾ N. Hennrich und F. Cramer, J. Amer. chem. Soc. 87, 1121 (1965).

⁷⁾ F. Cramer und W. Kampe, J. Amer. chem. Soc. 87, 1115 (1965).

strats im Hohlraum des Cyclodextrins und seiner im Raum ziemlich starr angeordneten funktionellen Gruppen, besonders der Hydroxygruppen, erklärt. Da die Wirkungsweise vieler Enzyme, wie etwa des Chymotrypsins⁸⁾, durch Zusammenwirken einer Hydroxygruppe der Aminosäure Serin und eines Imidazol-Kerns der Aminosäure Histidin in richtiger sterischer Anordnung zustande kommt, versuchten wir, Cyclodextrine durch Anfügen eines oder mehrerer Imidazol-Kerne zu Modellen für diese Enzyme zu gestalten. Zu erwarten war, daß Cyclodextrin-Moleküle, die mit etwa 2–4 Imidazol-Kernen versehen waren, am günstigsten sind, um einerseits ideale Nachbarschaft der reaktiven Gruppen aufzuweisen und andererseits noch freie Hydroxygruppen zu tragen und den Zugang zum Hohlraum nicht zu blockieren (Abbild. 1).



Abbild. 1. Kalottenmodell links: Cyclodextrin; rechts: Cyclodextrin mit Imidazolen und eingeschlossenem *p*-Nitro-phenylacetat

Synthese der Cyclodextrin-Imidazol-Verbindungen

Die Cyclodextrine wurden durch Abbau von Stärke mit Amylase aus *B. macerans*⁹⁾ gewonnen und nach *Cramer* und *Henglein*¹⁰⁾ getrennt. Als Ausgangsstoffe^{1, 11)} wurden Heptakis-[6-*O*-tosyl]- β -cyclodextrin, Hexakis-[6-*O*-tosyl]- α -cyclodextrin, Heptakis-[6-*O*-mesyl]- β -cyclodextrin, 6-Jod-6-desoxy-cyclodextrine mit 5–6 Jodatomen pro Cyclodextrin, 6-Amino-6-desoxy-cyclodextrine¹¹⁾ und Pertrifluoracetyl-cyclodextrine – mit 3 Acylgruppen pro Glucose – eingesetzt.

Die flüssigen freien Basen von Imidazol, 4(5)-Chlormethyl-imidazol, 4(5)-Aminomethyl-imidazol und Histamin¹²⁾ wurden aus den kristallinen Hydrochloriden mit Ionen-Austauschern freigesetzt.

⁸⁾ *M. L. Bender*, Chem. Reviews **60**, 53 (1960); *M. L. Bender* und *F. J. Kezdy*, J. Amer. chem. Soc. **86**, 3704 (1964); *M. L. Bender*, *G. R. Schonbaum* und *G. A. Hamilton*, J. Polymer Sci. **49**, 75 (1961); *B. S. Hartley*, Structure and Activity of Enzymes (Ed. *T. W. Goodwin*, *J. I. Harris* und *B. S. Hartley*), S. 47, Academic Press, London, New York 1964.

⁹⁾ *F. Schardinger*, Z. Unters. Lebensmittel **6**, 874 (1903).

¹⁰⁾ *F. Cramer* und *F. M. Henglein*, Chem. Ber. **91**, 308 (1958).

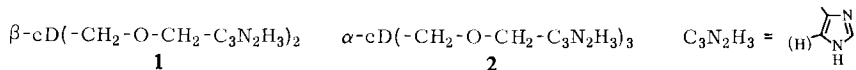
¹¹⁾ *W. Lautsch*, *R. Wiechert* und *H. Lehmann*, Kolloid-Z. **135**, 134 (1954); *W. Lautsch* und *R. Wiechert*, ebenda **153**, 103 (1957).

¹²⁾ *J. R. Totter* und *W. J. Darby*, Org. Syntheses, Coll., Vol. III, S. 460, 1955; *R. A. Turner*, *C. F. Huebner* und *C. R. Scholz*, J. Amer. chem. Soc. **71**, 2801 (1949); *O. K. Nikiforowa*, Zhur. Obshechi Khim. **24**, 1866 (1954), C. A. **49**, 13224 c (1955); *B. N. Ames* und *H. K. Mitchell*, J. Amer. chem. Soc. **74**, 252 (1952); *K. Hofman*, The chemistry of heterocyclic compounds (Ed. *A. Weissberger*), Vol. 6, 1: Imidazole and its Derivatives, Interscience Publishers, Inc., New York/London 1953.

In jedem Fall wurde die Verknüpfung des Imidazols mit dem Kohlenstoffatom 6 einer Glucose-Einheit angestrebt. Diese Stellung ist die reaktivste in der Glucose, jedoch waren trotzdem keine völlig spezifischen Reaktionen und keine stöchiometrischen Cyclodextrin-Imidazol-Verbindungen zu erwarten. Die Reaktionen wurden zuerst mit β -Cyclodextrin und dann mit dem kleineren α -Cyclodextrin ausgeführt; letzteres zeigte immer geringere Reaktivität und seine Derivate waren schwieriger aufzuarbeiten.

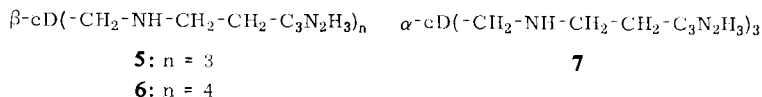
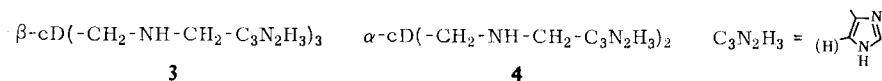
Die Cyclodextrin-Imidazol-Verbindungen sind hygroskopisch und amorph. Sie wurden durch Papierchromatographie, Dünnschichtchromatographie, Elektrophorese, Schmelzpunkte und optische Drehungen charakterisiert. Die Anzahl der Imidazol-Einheiten pro Cyclodextrin wurde aus den Elementaranalysen berechnet.

Um eine Ätherbrücke ($-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ zwischen Pyran- und Imidazol-Ring) zwischen der Hydroxygruppe in 6-Stellung der Glucose des β -Cyclodextrins und der 4(5)-Chlormethyl-Gruppe des Imidazols zu schließen, benutzten wir trockenes pulverisiertes KOH in Dimethylformamid bei 100° ¹³⁾. Für die amorphe, farblose, wasserlösliche Cyclodextrin-Imidazol-Verbindung ergab die Analyse 2 Imidazol-Reste pro Cyclodextrin-Molekül (1).



Weitere Experimente mit dem Ziel, eine Ätherbrücke zwischen C-6 einer Glucose und C-4 eines Imidazols auf ähnliche Weise zu schließen, blieben ohne Ergebnis²⁾.

Bei der Umsetzung von Heptakis-[6-*O*-tosyl]- β -cyclodextrin mit Aminoalkyl-Derivaten des Imidazols im Bombenrohr bei $70-120^\circ$ wurden je nach Reaktionsbedingungen¹⁴⁾ 3–4 Imidazol-Reste pro Cyclodextrin aufgenommen (Brücke vom Pyran zum Imidazol $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$ oder $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$). Mit Äthanol oder Äthanol/Essigester konnten die Cyclodextrin-Imidazol-Verbindungen als schwach gefärbte, amorphe, hygroskopische Produkte aus Wasser gefällt werden.



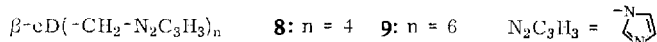
In der α -Cyclodextrin-Reihe wurden dieselben Reaktionen ausgeführt, ausgehend von Tosylaten oder Benzolsulfonaten. Nur kleine Ausbeuten an Cyclodextrin-Imidazol-Verbindungen mit geringer Wasserlöslichkeit und 2–3 Imidazol-Resten pro α -Cyclodextrin wurden erhalten.

¹³⁾ G. Zemplén, Z. Csürös und S. Angyal, Ber. dtsh. chem. Ges. **70**, 1848 (1937); A. M. Michelson und A. Todd, J. chem. Soc. [London] **1956**, 3459; C. M. McCloskey, Advances Carbohydrate Chem. **12**, 137 (1957).

¹⁴⁾ K. Freudenberg und H. Hess, Liebigs Ann. Chem. **448**, 121 (1926); Methoden der organ. Chemie (Houben-Weyl), Bd. 11/1, S. 217, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1957.

Die direkte Umsetzung von Heptakis-[6-*O*-tosyl]- β -cyclodextrin mit Imidazol in Methanol bei 160° während 24 Std. in Bombenrohr ergab nur eine sehr geringe Produkt-Ausbeute. Deshalb wurden unter gleichen Bedingungen Heptakis-[6-*O*-mesyl]- und 6-Jod-6-desoxy- β -cyclodextrin eingesetzt. Die gewonnenen Cyclodextrin-Imidazol-Verbindungen enthielten ca. 4 Imidazol-Reste je Cyclodextrin-Molekül und kein Mesylat oder Jod mehr (8).

Auch eine Reaktion in der Schmelze von pertrifluoracetyliertem β -Cyclodextrin mit Imidazol führte nach 30 Min. bei 160° zu β -Cyclodextrin-Imidazol-Verbindungen mit 4–6 Imidazol-Einheiten pro β -Cyclodextrin-Molekül, ohne noch Trifluoracetylgruppen zu enthalten (9) (zwischen dem Pyran und dem Imidazol nur $-\text{CH}_2-$).

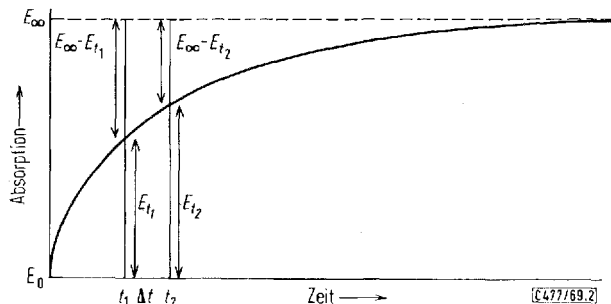


Schließlich versuchten wir noch β -Cyclodextrin und ein Imidazol über eine Ester- oder Amidbindung zu verknüpfen. Die Umsetzungen von Imidazol-carbonsäure-(4(5))-chlorid¹⁵⁾ mit Cyclodextrin in Pyridin und mit 6-Amino-6-desoxy- β -cyclodextrin bei 0° in Wasser mit Triäthylamin führten nur zu geringen Ausbeuten wasserunlöslicher Produkte; diese wurden nicht weiterverwendet.

Katalytische Aktivität der Cyclodextrin-Imidazol-Verbindungen

Die Verseifung von *o*-, *m*- und *p*-Nitro-phenylacetat in Gegenwart von Cyclodextrin, Imidazol, substituierten Imidazolen und Cyclodextrin-Imidazol-Verbindungen wurde mit der alkalischen Eigenhydrolyse bei gleichem pH-Wert verglichen. Dies geschah bei pH 7.5 und 8.5 in Trispuffer, bei den Ionenstärken $13.5 \cdot 10^{-3}$ und $5 \cdot 10^{-3}$ und den Konzentrationen $0.33 \cdot 10^{-4} m$ an Ester und $0.33 \cdot 10^{-2} m$ an Katalysator bei 23°. Der Start der Reaktion erfolgte je durch Zugabe des Esters und rasches mechanisches Mischen. Das bei der Hydrolyse freiwerdende Nitrophenolat-Anion wurde spektrophotometrisch verfolgt. Um vergleichbare Werte zu erhalten, wurden die Katalysatorkonzentrationen bei den Cyclodextrin-Imidazol-Verbindungen auf Imidazol-Einheiten bezogen. Die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion 1. Ordnung (Tab.) wurden aus den Reaktionsverläufen nach Abbild. 2 durch Auftragen von $\Delta \lg E$ gegen die Zeit gewonnen (siehe Beschreibung der Versuche).

$$\lg \frac{E_{\infty} - E_{t_2}}{E_{\infty} - E_{t_1}} = \frac{k(t_2 - t_1)}{2.303} \quad k = \frac{\Delta \lg E}{\Delta t} \cdot 2.303$$



Abbild. 2. Absorption des freigesetzten Nitrophenolat-Anions in Abhängigkeit von der Zeit

¹⁵⁾ R. Weidenhagen und H. Wegner, Ber. dtsh. chem. Ges. 70, 2309 (1937).

Geschwindigkeitskonstanten $k \cdot 10^5$ (sec⁻¹) der Hydrolyse von Estern mit verschiedenen Katalysatoren (C₃N₂H₃ = Imidazolyl-(4)-; N₂C₃H₃ = *N*-Imidazolyl-)

Katalysator	pH	<i>o</i> -Nitro-phenylacetat		Substrat	<i>p</i> -Nitro-phenylacetat	
		7.5	8.5	<i>m</i> -Nitro-phenylacetat	7.5	8.5
Ohne		3.2	10.2	1.9	1.2	9.6
α -Cyclodextrin		13.4	16	148	3.2	13.4
β -Cyclodextrin		15.3	28.8	38.3	5.9	14
6-Amino-6-desoxy- α -cyclodextrin		154	192	222	122	130
6-Amino-6-desoxy- β -cyclodextrin		325	345	211	245	460
Imidazol		192	243	65	154	192
<i>N</i> -Methyl-imidazol		255	288	57	88	192
4(5)-Hydroxymethyl-imidazol		50	67	25.5	32.8	38.4
4(5)-Aminomethyl-imidazol		26.8	62	27	21.2	61.5
Histamin		74	25.5	54	40.4	105
1 β -cD(-CH ₂ -O-CH ₂ -C ₃ N ₂ H ₃) ₂		38.4	50	71	384	400
3 β -cD(-CH ₂ -NH-CH ₂ -C ₃ N ₂ H ₃) ₃		38.3	69	77	36.5	100
5 β -cD(-CH ₂ -NH-CH ₂ -CH ₂ -C ₃ N ₂ H ₃) ₃		55	88	61.5	61.5	160
6 β -cD(-CH ₂ -NH-CH ₂ -CH ₂ -C ₃ N ₂ H ₃) ₄		34.5	62	69	128	100
8 β -cD(-CH ₂ -N ₂ C ₃ H ₃) ₄		30.6	49	307	54	153
9 β -cD(-CH ₂ -N ₂ C ₃ H ₃) ₆				106	84.5	
2 α -cD(-CH ₂ -O-CH ₂ -C ₃ N ₂ H ₃) ₃					25	
4 α -cD(-CH ₂ -NH-CH ₂ -C ₃ N ₂ H ₃) ₂					44.7	
7 α -cD(-CH ₂ -NH-CH ₂ -CH ₂ -C ₃ N ₂ H ₃) ₃					76.8	
α -Methylglucosid					2.5	

Diskussion

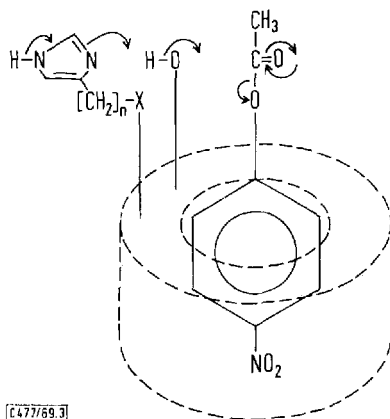
p-Nitro-phenylacetat wird bei pH 7.5 durch α -Cyclodextrin etwa 2–3fach, durch β -Cyclodextrin etwa 5fach schneller gespalten als ohne Katalysator. Es ist im α -Cyclodextrin so eingeschlossen, daß seine Achse mit der des Cyclodextrins zusammenfällt (axialer Einschluß); die Estergruppierung liegt damit nicht günstig zu den Hydroxygruppen des Cyclodextrins⁵⁾. Im β -Cyclodextrin kann das Substrat dichter an die Hydroxygruppen kommen (äquatorialer Einschluß), jedoch ist im Vergleich zum α -Cyclodextrin die Beweglichkeit des eingeschlossenen Substrats größer und deshalb die katalytische Wirksamkeit nur mäßig höher. Bei *m*-Nitro-phenylacetat wird die Hydrolyse durch α -Cyclodextrin etwa 70fach beschleunigt. Vermutlich wird die Acetatgruppierung des Esters auf den Rand des Cyclodextrinrings gedrückt und gelangt damit in enge Berührung mit den Hydroxygruppen⁵⁾. Der größere β -Cyclodextrinring kann keine ebenso starke Fixierung bewirken und beschleunigt die Hydrolyse nur etwa 20fach.

Die aminosubstituierten Cyclodextrine sind gute Hydrolysekatalysatoren aufgrund der Basizität der Aminogruppen; auch hier wird *m*-Nitro-phenylacetat in Gegenwart der α -Cyclodextrin-Verbindung schneller gespalten als in Gegenwart des β -Cyclodextrin-Derivats. Die zusätzliche Aminogruppe im Aminomethyl-imidazol und Histamin und ihren Cyclodextrin-Derivaten kann für ihre katalytische Aktivität wichtig sein.

Die Cyclodextrin-Imidazol-Verbindung **1** zeigt mit einem Faktor bis 300 sehr gute Katalyse der Esterverseifung, was ein Kalotten-Modell durch sehr gutes sterisches

Zusammenwirken von Substrat, Imidazol- und Hydroxygruppen erklärt (Abbild. 3). *o*- und *m*-Nitro-phenylacetat sind bei allen substituierten Cyclodextrinen meist mehr oder weniger an der Bildung einer Einschlußverbindung gehindert, so daß die Geschwindigkeitskonstanten der Hydrolyse kleiner sind. Im allgemeinen zeigen die α -Cyclodextrin-Derivate geringere Katalyse als die β -Cyclodextrin-Derivate (1 und 2, 3 und 4, 5, 6 und 7). Die Cyclodextrin-Imidazol-Verbindungen mit NH-Brücken katalysieren die Hydrolyse des *p*-Nitro-phenylesters um so besser, je größer der Imidazolgehalt je Cyclodextrin-Molekül ist (5 und 6), die Histamin-Derivate zeigen einen stärkeren Effekt als die Aminomethylverbindungen (5, 6 und 3, 7 und 4). Die Cyclodextrin-Imidazol-Verbindungen, in denen das Imidazol über eines seiner Stickstoffatome an das Cyclodextrin gebunden ist, weisen keine Hinderung des Eintretens in den Hohlraum auf (8, 9). Deshalb wird der weniger leicht verseifbare *m*-Nitrophenylester schneller hydrolytisch gespalten als das *p*-Nitro-phenylacetat, da die *m*-Nitrogruppe die Estergruppierung sowohl in die Nähe der Hydroxy- als auch der Imidazolgruppen drückt. Von geringerer Wirkung ist die Cyclodextrin-Imidazol-Verbindung 9, die durch Umsetzen von Pertrifluoracetyl-cyclodextrin mit Imidazol dargestellt wurde und die 6 Imidazolgruppen pro Cyclodextrin enthält (Substitution auch an C-2 und C-3 der Glucose-Einheiten).

Die Hydrolyse durch Imidazol und Cyclodextrin-Imidazol-Verbindungen ist pH-abhängig.



Abbild. 3. Modell für den Mechanismus der Ester-Spaltung durch eine Cyclodextrin-Imidazol-Verbindung (X = O oder NH, n = 1 oder 2)

Die Bildung einer Cyclodextrin-Einschlußverbindung kann mit der Bildung eines (aktivierten) Enzym-Substrat-Komplexes verglichen werden, aus dem heraus die weitere Hydrolyse unter Beteiligung der funktionellen Gruppen des Enzyms abläuft. Die Kräfte, die den „Enzym-Substrat-Komplex“ beim Cyclodextrin stabilisieren, sind Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen¹⁾, während im Enzym noch weitere Wechselwirkungen, etwa π - π -Wechselwirkungen zwischen aromatischen Resten oder Wechselwirkungen zwischen Ladungen in Frage kommen. Allen bisher untersuchten Enzymmodellen (Peptide, Imidazol-Verbindungen u. a.)

fehlt ein Bindungszentrum für das Substrat, das der „pocket“ oder „groove“ des Enzyms vergleichbar wäre. Dort ist eine genaue Fixierung des Substrats wie starre sterische Lage der funktionellen Gruppen wahrscheinlich, während bei den Cyclodextrin-Imidazol-Einschlußverbindungen sowohl das eingeschlossene Substrat wie die Imidazol-Reste beweglich bleiben.

In Analogie zur Produkt-Inhibierung eines Enzyms können Cyclodextrin-Imidazol-Verbindungen *p*-Nitro-phenol einschließen und damit weitere Ester-Spaltungen inhibieren. Eine intermediäre Acylierung des Enzyms wird bei der Chymotrypsin-katalysierten Ester-Spaltung angenommen. Dies ist ebenso bei einer Ester-Spaltung durch eine Cyclodextrin-Imidazol-Verbindung möglich (Abbild. 3)⁵⁾. Diese Überlegungen erklären sowohl die Beschleunigung der Ester-Verseifung durch Cyclodextrin-Imidazol-Verbindungen als auch die Tatsache, daß sie noch etwa um 2 Größenordnungen weniger wirksam sind als Chymotrypsin.

Beschreibung der Versuche

Die Cyclodextrine wurden bei 100° i. Vak. über P₂O₅, die Imidazol-Derivate bei Raumtemperatur i. Vak. über P₂O₅ und die Lösungsmittel in der üblichen Weise sorgfältig getrocknet. Die Papierchromatographie erfolgte auf dem Papier 2043 b gewaschen (Schleicher & Schüll, Dassel) oder dem Papier 3 MM (Whatman) in 1 *n* Essigsäure/Isopropylalkohol (1 : 4), wenn nicht anders angegeben; bei präparativer Auftrennung wurde das Reaktionsprodukt mit Wasser eluiert. Die Cyclodextrine ließen sich mit Jod und die Imidazole durch Kuppeln mit diazotierter Sulfanilsäure (Pauly-Reagens) zu roten Azofarbstoffen¹²⁾ anfärben. Die Dünnschichtchromatographie wurde auf den Kieselgelplatten HF 254 (Merck, Darmstadt) in Propanol/1 *n* Essigsäure (3 : 1) durchgeführt; Anfärbung erfolgte wie bei der Papierchromatographie. Die angegebenen Schmp. geben den Bereich der Verfärbung und des Erweichens (Zersetzung) der Stoffe an. Drehwerte wurden mit dem Polarimeter 141 von Perkin-Elmer bestimmt. Die Verseifungsgeschwindigkeit wurde spektrophotometrisch mit dem Modell 14 von Cary gemessen. Puffer (1 cm; pH 7.5: 40.6 ccm 0.1 *n* HCl + 25 ccm 0.2 *m* Tris + H₂O bis 100 ccm; pH 8.5: 15 ccm 0.1 *n* HCl + 25 ccm 0.2 *m* Tris + H₂O bis 100 ccm) und Katalysator (1 cm, 10⁻² *m*) wurden in eine Küvette im Spektrophotometer gegeben, dann der Ester (1 cm, 10⁻⁴ *m* in H₂O/Dioxan (95 : 5 v/v)) zugefügt, rasch mechanisch gemischt und die Messung des entstehenden Nitrophenolat-Anions (*o*- bei 410, *m*- 390, *p*- 400 nm) sofort begonnen und bis zum konstanten Endwert fortgeführt.

Umsetzung von β-Cyclodextrin mit 4(5)-Chlormethyl-imidazol zu 1: Zu 1.1 g (1 mMol) β-Cyclodextrin und 1.2 g (10 mMol) 4(5)-Chlormethyl-imidazol wurden in 100 ccm Dimethylformamid unter Rühren portionsweise 3.0 g (53 mMol) pulverisiertes, trockenes KOH zugefügt. Erst als das Reaktionsgemisch nach vorübergehender Eindickung wieder dünnflüssig geworden war, erfolgte der Zusatz der letzten Teile von KOH. Dann wurde 4 Stdn. auf 100° erhitzt und 20 Stdn. bei Raumtemp. belassen. Im Ölpumpenvak. wurde das Lösungsmittel völlig abdestilliert, der Rückstand in Wasser aufgenommen und mit verd. Salzsäure neutralisiert. Bei der fraktionierten Fällung mit Äthanol schieden sich zuerst die anorganischen Salze und nichtumgesetztes β-Cyclodextrin, dann das Reaktionsprodukt ab, während das 4(5)-Hydroxymethyl-imidazol in Lösung blieb; dies wurde mehrmals wiederholt. Das Reaktionsprodukt ließ sich auch durch Abtrennen der anorganischen Salze durch Ionenaustauschchromatographie an Merck I und III (Merck, Darmstadt) und Elution mit Wasser und anschließende Fällung mit Äthanol oder präparative Papierchromatographie reinigen. Eine Papierelektrophorese wurde bei pH 4 im Puffer Citrat-Salzsäure, 1500–1700 V und 35–40

mA während 2 Stdn. ausgeführt. β -Cyclodextrin blieb am Start, das Reaktionsprodukt erreichte ungefähr $\frac{1}{3}$ der Laufstrecke des 4(5)-Hydroxymethyl-imidazols. IR- und NMR-Spektren zeigten wenig Feinstruktur. Schmp. 280–285°, $[\alpha]_D^{24}$: $126 \pm 2^\circ$ (1% in H₂O); Dünnschichtchromatogramm R_F 0–0.10 (β -Cyclodextrin 0.41, 4(5)-Hydroxymethyl-imidazol 0.75), Papierchromatogramm R_F 0–0.15 (β -Cyclodextrin 0.25, 4(5)-Hydroxymethyl-imidazol 0.45), Ausb. 500–700 mg.

C₅₀H₇₈N₄O₃₅ (1295.2) (2 Imidazol-Einheiten pro 1 β -Cyclodextrin)

Ber. C 46.45 H 6.04 N 4.31 Gef. C 46.48 H 6.53 N 4.37

Umsetzung von Heptakis-[6-O-p-toluolsulfonyl]- β -cyclodextrin mit 4(5)-Aminomethyl-imidazol zu 3: 1.1 g (0.5 mMol) des *Cyclodextrins* und 1.85 g (20 mMol) des *Imidazols* wurden in 20 ccm Methanol 24 Stdn. im Bombenrohr auf 120° erhitzt. Gegen Ende der Reaktion färbte sich der Ansatz dunkelrot. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert, die Lösung des Rückstands in Wasser über Aluminiumoxid neutral (Woelm, Eschwege) filtriert und nach Einengen mit Äthanol fraktioniert gefällt. Die mittleren Fraktionen ergaben eine schwach gefärbte *Cyclodextrin-Imidazol-Verbindung*. Schmp. 255–260°, $[\alpha]_D^{24}$: $92 \pm 2^\circ$ (1% in H₂O), Papierchromatogramm R_F 0–0.1 (Heptakis-[6-O-tosyl]- β -cyclodextrin 0.86, 4(5)-Aminomethyl-imidazol 0.29), Ausb. 200–400 mg.

C₅₄H₈₅N₉O₃₂ (1372.3) (3 Imidazol-Einheiten pro 1 β -Cyclodextrin) Ber. N 9.16 Gef. N 8.36

Umsetzung von Heptakis-[6-O-p-toluolsulfonyl]- β -cyclodextrin mit Histamin zu 5 und 6: 1.0 g (0.45 mMol) des *Cyclodextrins* und 0.9 g (8 mMol) *Histamin* wurden in 15 ccm absol. Methanol im Bombenrohr 70 Stdn. bei 70° gehalten. Die klare hellgelbe Lösung wurde noch 3 Stdn. auf 110° erhitzt und nahm dabei dunkelrote Farbe an. Sie wurde eingeeengt, die Lösung des Rückstands in Wasser filtriert und durch Versetzen mit Äthanol das Produkt mehrfach umgefällt. Schmp. 250–255°, $[\alpha]_D^{24}$: $63 \pm 2^\circ$ (1% in H₂O), Dünnschichtchromatogramm R_F 0–0.1 (Heptakis-[6-O-tosyl]- β -cyclodextrin 0.82, Histamin 0.31), Papierchromatogramm R_F 0–0.15 (Heptakis-[6-O-tosyl]- β -cyclodextrin 0.66, Histamin 0.68, Laufmittel sek. Butylalkohol/HCO₂H/H₂O 40:30:30), Ausb. 100–150 mg 5.

C₅₇H₉₁N₉O₃₂ (1414.3) (3 Histamin-Einheiten pro 1 β -Cyclodextrin) Ber. N 8.91 Gef. N 8.77

Dieselbe Reaktion bei 110° und 24 Stdn. ergab eine schwarze Lösung, die über Aktivkohle und Aluminiumoxid neutral (Woelm, Eschwege) filtriert wurde. Aus wäßriger Lösung ließ sich mit Äthanol/Essigester die schwach gefärbte *Cyclodextrin-Imidazol-Verbindung* fällen. Es wurde mehrmals umgefällt. Schmp. 275–280°, $[\alpha]_D^{24}$: $86 \pm 2^\circ$ (1% in H₂O), Papierchromatogramm R_F 0–0.1 (Heptakis-[6-O-tosyl]- β -cyclodextrin 0.86, Histamin 0.60), Ausb. 400 mg 6.

C₆₂H₉₈N₁₂O₃₁ (1507.6) (4 Histamin-Einheiten pro 1 β -Cyclodextrin)

Ber. N 11.18 Gef. N 11.38

Umsetzung von Heptakis-[6-O-methansulfonyl]- β -cyclodextrin oder 6-Jod-6-desoxy- β -cyclodextrin mit Imidazol zu 8: 1.0 g (0.65 mMol) *Heptakis-[6-O-methansulfonyl]- β -cyclodextrin* und 1.0 g (13 mMol) *Imidazol* wurden in 20 ccm absol. Methanol 24 Stdn. bei 150–160° im Bombenrohr belassen. Die dunkle Lösung wurde über Aktivkohle filtriert und die gelbliche *Cyclodextrin-Imidazol-Verbindung* durch fraktioniertes Füllen mit Äthanol gewonnen und mehrfach umgefällt. Schmp. 245–250°, $[\alpha]_D^{24}$: $56 \pm 2^\circ$ (1% in H₂O), Papierchromatogramm R_F 0 bis 0.15 (Heptakis-[6-O-mesyl]- β -cyclodextrin 0.85, Imidazol 0.65), Ausb. 150–200 mg 8.

C₅₄H₇₈N₈O₃₁ (1325.3) (4 Imidazol-Einheiten pro 1 β -Cyclodextrin) Ber. N 8.4 Gef. N 8.21

Gleiche Reaktionen mit *6-Jod-6-desoxy- β -cyclodextrin*: Schmp. 245–255°, $[\alpha]_D^{24}$: $69 \pm 2^\circ$ (1% in H₂O), Papierchromatogramm R_F 0.1–0.2 (6-Jod-6-desoxy- β -cyclodextrin 0.90), gef. N 9.15.

Umsetzung von Pertrifluoracetyl- β -cyclodextrin mit Imidazol zu 9: Einer Schmelze von 1.0 g (0.3 mMol) Pertrifluoracetyl-cyclodextrin bei 160° wurden 2.0 g (30 mMol) Imidazol langsam zugesetzt. Nach 1/2stdg. Reaktionsdauer und Abkühlen wurde in Wasser aufgenommen. Die Reinigung erfolgte durch Papierchromatographie. Das Produkt wurde aus der Startzone eluiert und mit Äthanol gefällt. Schmp. 270–275°, $[\alpha]_D^{25}$: $71 \pm 2^\circ$ (0.1% in H₂O), Papierchromatogramm R_F 0–0.1, Laufmittel H₂O/Äthanol (7:3), Ausb. 80–100 mg.

C₆₀H₈₂N₁₂O₂₉ (1435.4) (6 Imidazol-Einheiten pro 1 β -Cyclodextrin)

Ber. N 11.71 Gef. N 11.68

Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten der Hydrolyse

Die Hydrolyse von *p*-Nitro-phenylacetat in Anwesenheit von Verbindung 5 ist als Beispiel angeführt; alle übrigen Hydrolysen wurden ebenso ausgewertet.

Zeit (Min.)	<i>E</i> Einheiten	lg <i>E</i>
0	56	1.7482
6	43	1.6335
12	33	1.5185
16	28	1.4472
18	26	1.4150
60	5	0.6990

$$k = \frac{2.303 \cdot 0.32}{20 \cdot 60} = 6.15 \cdot 10^{-4} \text{ [sec}^{-1}\text{]}$$

Umsetzung von α -Cyclodextrin mit 4(5)-Chlormethyl-imidazol zu 2: Zu 1.0 g (1 mMol) α -Cyclodextrin in 30 ccm Dimethylsulfoxid wurden unter Rühren 2.3 g Kalium-*tert.*-butylat (20 mMol) gegeben. Nach vorübergehender Eindickung der Lösung erfolgte Zusatz von 1.2 g (10 mMol) 4(5)-Chlormethyl-imidazol, dann wurde 2 Stdn. auf 60° erhitzt und noch 6 Stdn. bei Raumtemp. gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde unter Rühren in Wasser eingegossen und die Mischung i. Ölpumpenvak. bis auf einen öligen Rückstand eingeengt. Dieser Rückstand wurde in wenig Wasser aufgenommen, die Lösung mit Äthanol versetzt, der sich bildende hellgelbe Niederschlag abfiltriert, in Wasser gelöst und über Sephadex-G 25 chromatographiert. Die eluierten Fraktionen wurden papierchromatographisch analysiert. Aus den ersten Fraktionen ließ sich durch Abdestillieren des Wassers und mehrfaches Umfällen mit Äthanol die α -Cyclodextrin-Imidazol-Verbindung gewinnen. Schmp. 205–210°, $[\alpha]_D^{25}$: $97 \pm 2^\circ$ (0.1% in Wasser); Papierchromatogramm R_F 0–0.2 (α -Cyclodextrin 0.3, 4(5)-Hydroxymethyl-imidazol 0.7), Laufmittel: Cellosolve/H₂O (2.5:1), Ausb. 200–300 mg.

C₄₈H₇₂N₆O₃₀ (1213.2) (3 Imidazol-Einheiten pro 1 α -Cyclodextrin) Ber. N 6.95 Gef. N 6.99

*Umsetzung von Hexakis-[6-*O*-benzolsulfonyl]- α -cyclodextrin mit 4(5)-Aminomethyl-imidazol zu 4:* 1.0 g (0.55 mMol) des Cyclodextrins und 1.0 g (10 mMol) des Imidazols wurden in 30 ccm absol. Methanol im Bombenrohr 3 Stdn. bei 150° und anschließend 20 Stdn. bei 120° umgesetzt. Nach Befreien der dunkel gefärbten Lösung vom Lösungsmittel wurde in wenig Wasser aufgenommen, filtriert und das Produkt durch Zugabe von Äthanol zum Filtrat mehrfach umgefällt. Man erhielt ein schwach gefärbtes Produkt mit Schmp. 230–235°, $[\alpha]_D^{25}$: $79 \pm 2^\circ$ (0.1% in Wasser), Papierchromatogramm R_F 0–0.1 (4(5)-Aminomethyl-imidazol 0.23, Hexakis-[6-*O*-benzolsulfonyl]- α -cyclodextrin 0.75), Ausb. 100–150 mg.

C₄₄H₇₀N₆O₂₈ (1131.1) (2 Aminomethyl-imidazol-Reste pro 1 α -Cyclodextrin)

Ber. N 7.44 Gef. N 8.62

Hexakis-[6-O-benzolsulfonyl]- α -cyclodextrin: 2.0 g (2 mMol) α -Cyclodextrin wurden mit 3.5 g (20 mMol) *Benzolsulfonylchlorid* in 30 ccm absol. *Pyridin* 48 Stdn. bei Raumtemp. gehalten. Nach Eingießen unter Rühren in Eiswasser, Abfiltrieren des Niederschlages und mehrfaches Umfällen aus heißem Methanol Schmp. 170–173°, $[\alpha]_D^{25}$: $48 \pm 2^\circ$ (1% in Methanol), Ausb. 2.6 g.

(C₁₂H₁₄O₇S)₆ (1813.7) Ber. C 47.62 H 4.66 S 10.60 Gef. C 47.44 H 4.97 S 10.48

Umsetzung von Hexakis-[6-O-p-toluolsulfonyl]- α -cyclodextrin mit Histamin zu 7: 2.0 g (1.05 mMol) des *Cyclodextrins* und 2.0 g (18 mMol) *Histamin* wurden in 30 ccm absol. Methanol im Bombenrohr 24 Stdn. bei 150° gehalten. Die dunkel gefärbte Lösung wurde vom Lösungsmittel befreit, die Lösung des Rückstands in Wasser aufgenommen, filtriert und das Produkt durch Zugabe von Äthanol zum Filtrat mehrfach umgefällt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, in wenig Wasser aufgenommen und über Sephadex-G 25 chromatographiert. Die eluierten Fraktionen ließen sich papierchromatographisch analysieren. Durch Abdestillieren des Wassers und Versetzen mit Äthanol erhielt man die *Cyclodextrin-Histamin-Verbindung* mit Schmp. 245–250°, $[\alpha]_D^{25}$: $84 \pm 2^\circ$ (0.1% in Wasser), Papierchromatogramm R_F 0–0.15, (Histamin 0.37, Hexakis-[6-O-p-toluolsulfonyl]- α -cyclodextrin 0.70), Ausb. 150–200 mg.

C₅₁H₈₁N₉O₂₇ (1253.3) (3 Histamin-Reste pro 1 α -Cyclodextrin) Ber. N 10.05 Gef. N 9.38/9.34

[477/69]