

Zusammenfassung.

4'-Demethyl-podophyllotoxin- β -glucosid wird mit radioaktivem Diazomethan in ^{14}C -Podophyllotoxin- β -glucosid übergeführt. Es wird über eine verbesserte Synthese von ^{14}C -Diazomethan berichtet.

Pharmazeutisch-chemisches Laboratorium
Sandoz, Basel

121. Zur Bedeutung der Metallkomplexbildung in der Biochemie.**Über das Komplexbildungsvermögen einer Ovalbuminfraktion**

von G. H. Wolff und S. Fallab.

(26. III. 56.)

Bei unseren Untersuchungen¹⁾ über das Cu^{2+} -Bindungsvermögen von Proteinen, Peptiden und Aminosäuren war das Verhalten von Ovalbumin²⁾ und Fibrinogen besonders aufgefallen. Die unerwarteten Messresultate liessen sich nur unter der Annahme deuten, dass diese Proteine als Komplexbildner eine gewisse Spezifität gegenüber Fe^{2+} besitzen.

Ein Vergleich der Komplexstabilitäten von zahlreichen einfachen Verbindungen der verschiedensten Strukturen mit M^{2+} -Ionen lässt erkennen, dass sie in erster Näherung unabhängig von der Ligandenstruktur sind³⁾. In der Reihe der 3-d-Elemente zeigt Cu^{2+} immer die stärkste Komplexbildungstendenz. Es folgen dann, mit abnehmender Elektronegativität⁴⁾, Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} und dann in der Reihe der Erdalkalien Mg^{2+} . Immerhin findet man Verbindungen, in denen der „Spreitungsfaktor“ $K_{\text{Cu}^{2+}}/K_{\text{Fe}^{2+}}$ erheblich von der Norm abweicht – z. B. in Dipyridyl und o-Phenanthrolin⁵⁾ –, woraus eine gewisse Fe^{2+} -Spezifität abzuleiten ist. Dennoch ist in jedem Fall $K_{\text{Cu}^{2+}} > K_{\text{Fe}^{2+}}$.

Wir hatten schon früher angedeutet⁶⁾, dass die strenge Gültigkeit dieser Regel für die ungehemmte Wirkungsweise von Metallfermenten eine Gefahr darstellen muss. Denn bei den im Serum stets vorhandenen Cu^{2+} wäre in diesem Fall die Erhaltung eines solchen Fermentes nur denkbar, wenn besondere sterische oder andere mor-

¹⁾ G. H. Wolff, S. Fallab & H. Erlenmeyer, Exp. 11, 440 (1955); G. H. Wolff & S. Fallab, Helv. 39, 837 (1956).

²⁾ Purissimum pulvis, Bohny & Co. AG., Basel.

³⁾ H. Irving & R. J. P. Williams, J. chem. Soc. 1953, 3192.

⁴⁾ D. Chapman, Nature 174, 887 (1954).

⁵⁾ P. G. Länger, S. Fallab & H. Erlenmeyer, Helv. 37, 1050 (1954).

⁶⁾ P. G. Länger, S. Fallab & H. Erlenmeyer, Helv. 38, 92 (1955).

phologische Verhältnisse einen Austausch von koordinativ schwächeren Metallionen gegen Cu^{2+} erheblich verzögern.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass in diesen Metallfermenten Systeme vorliegen, bei denen die Reihenfolge der Komplexstabilitäten umgekehrt ist, d. h. dass im Organismus Strukturen ausgebildet werden, die Fe^{2+} und vielleicht sogar Mg^{2+} fester zu binden vermögen als Cu^{2+} .

Dass solche Spezifitäten tatsächlich existieren, liessen unsere Versuche vermuten. Wir haben deshalb die Komplexbildung von Ovalbumin mit Cu^{2+} und Fe^{2+} näher untersucht.

Den direktesten Vergleich von Komplexstabilitäten liefert zweifellos der Metallaustauschversuch (1).



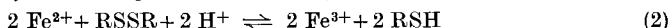
In schwach saurer Lösung reagiert Cu^{2+} mit Ovalbumin unter Bildung eines blaugrün gefärbten Komplexes ($\lambda_{\text{max}} = 7250 \text{ \AA}$, Fig. 1, A). Das erlaubt, den Metallionenaustausch (1) spektrophotometrisch zu verfolgen.

Da solche Komplexbildungsreaktionen des Ovalbumins mit Cu^{2+} - und Fe^{2+} -Salzen von Trübungen und bei entsprechender Konzentration von voluminösen Fällungen begleitet sind, haben wir zunächst eine „stabile“ Ovalbuminfraktion gewonnen, die in Gegenwart von Cu^{2+} und Fe^{2+} mindestens 24 Std. klar bleibt und damit die einwandfreie spektrophotometrische Messung erlaubt.

Eine solche Lösung wurde zunächst mit Cu^{2+} , später mit einer äquivalenten Menge Fe^{2+} versetzt und während der Reaktion die Veränderungen des Absorptionsspektrums beobachtet. 60 Min. nach dem Beginn des Austausches war ein Gleichgewichtszustand erreicht und die Cu^{2+} -Protein-Bande weitgehend verschwunden (Fig. 1, B).

Um eine Oxydation der zugesetzten Fe^{2+} zum koordinativ stärkeren Fe^{3+} 7), das in der Folge Cu^{2+} aus dem Protein verdrängt, nach Möglichkeit auszuschliessen, sahen wir davon ab, den Versuch in einem den physiologischen Bedingungen entsprechenden Milieu durchzuführen. Versuche mit zwei Vergleichslösungen ergaben, dass zu Ovalbumin zugesetztes Fe^{2+} mit Rhodanid nicht als Fe^{3+} nachzuweisen ist, während Fe^{3+} in Gegenwart von Ovalbumin nach kurzer Zeit mit Dipyridyl in erheblichen Mengen als Fe^{2+} nachgewiesen werden kann.

Das für diese reduzierende Wirkung des Ovalbumins verantwortliche Redoxsystem lässt sich im Cystein-Cystin-Gleichgewicht vermuten (2).



Messungen von *Kolthoff* et al.⁸⁾ ergaben für die Reaktion (2) die Gleichgewichtskonstante $K = 5 \cdot 10^{-24}$. Daraus ergibt sich, dass bei den von uns realisierten Konzentrationen das Gleichgewicht (2) bei weitem auf der Seite von Fe^{2+} liegt.

7) *S. Fallab, Margrith Schuster & H. Erlenmeyer*, Exp. **12**, 207 (1956).

8) *N. Tanaka, I. M. Kolthoff & W. Stricks*, J. Amer. chem. Soc. **77**, 2004 (1955).

Die spektrophotometrische Verfolgung des Austausches (1) zeigt, dass für die Komplexstabilitätskonstanten dieser Ovalbumin-Fraktion die Beziehung $K_{\text{Fe}^{2+}} > K_{\text{Cu}^{2+}}$ gilt. Die für einfache Komplexbildner allgemein gültige Beziehung $K_{\text{Cu}^{2+}} > K_{\text{Fe}^{2+}}$ haben *Irving & Williams*³⁾ eingehend diskutiert. Sie begründen diese Gesetzmässigkeit ausschliesslich mit den Eigenschaften des Metallions und nehmen an, dass der Einfluss des Liganden auf die koordinative Bindung gering ist. Der Grund für das ganz andersartige Verhalten dieser von uns untersuchten Protein-Fraktion ist vermutlich in der Besonderheit der Ligandenstruktur zu suchen.

Die Makrostruktur des Proteins ermöglicht offensichtlich eine in bezug auf die Koordinationsstellen des Fe^{2+} optimale Lage der beteiligten funktionellen Gruppen. Als weiterer Grund mag auch der bei der Austauschreaktion (1) stattfindende Übergang von der Koordinationszahl 4 zur Koordinationszahl 6 eine Rolle spielen. So kann beispielsweise bei einem 6zähligen Liganden⁹⁾ nur ein Metallion mit der Koordinationszahl 6 die Komplexbildungstendenz dieses Liganden voll ausnützen.

Für die Bedeutung der Makrostruktur für Komplexbildungsreaktionen spricht ferner folgender Versuch: Die untersuchte Ovalbumin-Lösung wurde bei 0° im Hochvakuum entwässert. Der so erhaltene weisse Rückstand, dessen Makrostruktur nur geringfügig verändert worden sein kann, bildet – wieder in Lösung – den blaugrünen Cu^{2+} -Komplex nicht mehr¹⁰⁾.

Die vorliegende Untersuchung zeigt, dass es Strukturen gibt, deren Metallionen-Spezifität so ausgeprägt ist, dass ihre Komplexstabilitäten nicht der *Irving-Williams*-Reihe entsprechen. Wenn wir annehmen, dass Fermente, die von Metallionen aktiviert werden, aus solchen spezifischen Strukturen bestehen, so ist dadurch die Erhaltung wie auch die Entstehung des Metall-Ferment-Komplexes auf Grund von Gleichgewichtsreaktionen prinzipiell möglich.

Experimentelles.

Zur Darstellung der weder durch Cu^{2+} noch durch Fe^{2+} fällbaren Fraktion von Ovalbumin wird einer 5-proz. Ovalbumin-Lösung CuSO_4 und $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ in den Konzentrationen 0,1-m. und 0,05-m. zugesetzt. Nach 12stündigem Schütteln und 24-stündigem Stehen wird filtriert. Das Filtrat wird 5 Tage gegen eine 10^{-2} -m. Lösung von Dinatrium-äthylendiamin-tetraacetat und anschliessend 3 Tage gegen H_2O dialysiert. Eine Konzentrationsbestimmung der dialysierten Lösung durch Trocknen bei 0° im Hochvakuum ergab einen Proteingehalt von 2,2%.

Zur Ermittlung der für den Austauschversuch (Fig. 1) optimalen $[\text{Cu}^{2+}]$ bestimmten wir durch kolorimetrische Titration die Cu^{2+} -Sättigung unserer Protein-Lösung (Fig. 2). Wir studierten die Austauschreaktion (1) an einer 2-proz. Protein-Lösung, die Cu^{2+} und

⁹⁾ B. D. Sarma, J. C. Bailar jr., J. Amer. chem. Soc. **76**, 4051 (1954); F. P. Dwyer, N. S. Gill, E. C. Gyrfas & F. Lions, *ibid.* **76**, 383 (1954).

¹⁰⁾ Über einen ähnlichen Versuch siehe R. C. Warner, Trans. N. Y. Acad. Sci. **16**, 182 (1954).

Fe^{2+} in einer Konzentration von je $1,8 \cdot 10^{-3}$ -m. enthielt. Es wurde das Absorptionsspektrum des Cu^{2+} -Komplexes (Fig. 1, A) und der Mischlösung 60 Min. nach der Fe^{2+} -Zugabe gegen eine entsprechende Protein-Vergleichslösung aufgenommen.

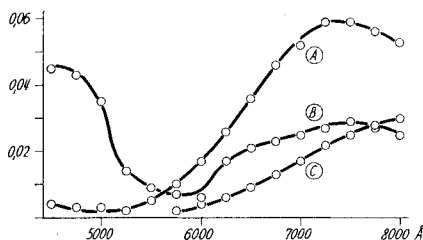


Fig. 1.

Austauschversuch: (A) Protein + Cu^{2+} ,
(B) Protein + Cu^{2+} + Fe^{2+} nach 60 Min.,
(C) Vergleichskurve von Cu^{2+} gleicher
Konzentration.

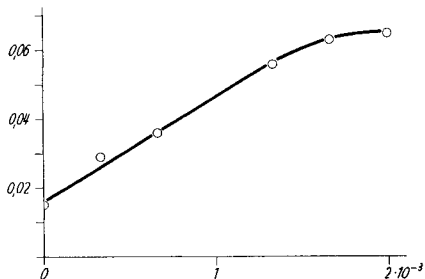


Fig. 2.

Kolorimetrische Titration der 2-proz.
Ovalbumin-Fraktion. Ordinate: Optische
Dichte des Cu^{2+} -Protein-Komplexes bei
7250 Å. Abszisse: Cu^{2+} -Totalkonzentration.

Die spektrophotometrischen Messungen wurden mit einem *Unicam*-Spektrophotometer SP 500 durchgeführt.

Herrn Prof. *H. Erlenmeyer* danken wir für das Interesse, das er dieser Arbeit entgegengebracht hat.

SUMMARY.

Exchange reactions on metal protein complexes have been studied. A fraction of ovalbumin has been found, the affinity of which is greater for Fe^{2+} than for Cu^{2+} . The meaning of the relative stabilities of metal protein complexes for enzymatic processes is discussed.

Anstalt für anorganische Chemie der Universität Basel.

122. Über Muscarin aus Fliegenpilzen.

2. Mitteilung über Muscarin¹⁾

von **C. H. Eugster.**

(28. III. 56.)

Die intensiven und eigentümlichen Wirkungen des Muscarins haben schon einer grossen Zahl von chemischen und pharmakologischen Untersuchungen gerufen, ohne dass es in der nun schon über 100 Jahre dauernden Erforschung dieses Naturstoffes gelungen wäre, das Muscarinrätsel zu lösen. Die folgende knappe Übersicht erwähnt die wichtigsten Arbeiten über Muscarin:

¹⁾ 1. Mitt. *C. H. Eugster & P. G. Waser*, *Experientia* **10**, 298 (1954).