

## 74. Das Komplexbildungsvermögen von acylierten Aminosäuren<sup>1)</sup>

von A. Weiss und S. Fallab.

(17. III. 57.)

*J. Schubert* hat in einer Reihe von Arbeiten<sup>2)</sup> dargelegt, dass man mit Hilfe von Untersuchungen über Verteilungsgleichgewichte an Ionenaustauschern quantitative Aussagen über die Bindung von Metallionen an organische Komplexbildner machen kann. Hierbei wird zunächst unter bestimmten, konstant gehaltenen Versuchsbedingungen die Verteilung  $K_v^0$  des zu untersuchenden Metallions auf Ionenaustauscher (IA) und Lösung bestimmt (1),

$$K_v^0 = [\text{Me}^{2+}]_{\text{IA}}/[\text{Me}^{2+}]_{\text{Lös}} \quad (1)$$

und alsdann die Verteilung  $K_v$  in Gegenwart eines Komplexbildners R gemessen. Unter der Annahme der Komplexbildungsreaktion (2)



$$K = [\text{MeR}_n^{2+}]/[\text{Me}^{2+}][\text{R}]^n \quad (3)$$

ergibt sich dann für die gesuchte Stabilitätskonstante K (3) die Beziehung (4):

$$K = [(K_v^0/K_v) - 1]/[\text{R}]^n. \quad (4)$$

Die von *Schubert* untersuchten Komplexbildner – biochemisch interessante Di- und Tricarbonensäuren<sup>3)</sup> – bilden elektrisch neutrale oder negativ geladene Komplexe und treten somit nicht in ein Verteilungsgleichgewicht mit dem Kationenaustauscher.

Wir interessierten uns in der vorliegenden Arbeit für das Komplexbildungsvermögen von Verbindungen RH, die mit Schwermetallionen in 2 Stufen unter Ausbildung von Acidokomplexen reagieren können (5), (6), wobei der in der ersten Stufe gebildete 1:1-



Komplex  $\text{MeR}^+$  eine positive Ladung trägt und damit die Möglichkeit zu diskutieren ist, dass diese komplexe Partikel ebenfalls in die IA-Phase eintritt. Es zeigte sich jedoch, dass bei der Verwendung von Dowex 50 mit einem Vernetzungsgrad DVB 8% infolge des Siebeffektes eine Reaktion von  $\text{MeR}^+$  mit dem Ionenaustauscher zu vernachlässigen war.

Entsprechend den beiden Stufen (5) und (6) ist die Reaktion durch 2 Stabilitätskonstanten  $k_1$  und  $k_2$  (7), (8) zu beschreiben.

$$k_1 = [\text{MeR}^+]/[\text{Me}^{2+}][\text{R}^-] \quad (7); \quad k_2 = [\text{MeR}_2]/[\text{MeR}^+][\text{R}^-] \quad (8)$$

<sup>1)</sup> Auszug aus Diss. A. Weiss, Basel 1956.

<sup>2)</sup> *J. Schubert*, J. phys. and Colloid Chemistry **52**, 340 (1948); *J. Schubert*, E. R. Russel & L. S. Myers, J. biol. Chemistry **185**, 387 (1950).

<sup>3)</sup> *J. Schubert & A. Lindenbaum*, J. Amer. chem. Soc. **74**, 3529 (1952).

Für die Konzentration des komplex gebundenen  $\text{Me}^{2+}$  ergibt sich dann die Beziehung (9).

$$[\text{Me}^{2+}]_{\text{geb}} = [\text{Me}^{2+}]_{\text{tot}} - [\text{Me}^{2+}]_{\text{Lös}} - [\text{Me}^{2+}]_{\text{IA}} \quad (9)$$

worin  $[\text{Me}^{2+}]_{\text{tot}}$  vorgegeben ist,  $[\text{Me}^{2+}]_{\text{IA}}$  experimentell bestimmt wird und  $[\text{Me}^{2+}]_{\text{Lös}}$  aus  $K_v^0$  (1) berechnet werden kann.  $[\text{Me}^{2+}]_{\text{geb}}$  verteilt sich auf die Komplexe  $\text{MeR}^+$  und  $\text{MeR}_2$ , und so ergibt sich durch Substitution von  $[\text{MeR}^+]$  und  $[\text{MeR}_2]$  aus (7) und (8):

$$[\text{Me}^{2+}]_{\text{geb}} = k_1[\text{Me}^{2+}][\text{R}^-] + k_1 k_2 [\text{Me}^{2+}][\text{R}^-]^2 \quad (10)$$

Durch Auswertung von mindestens 2 Verteilungsmessungen mit verschiedener  $[\text{R}^-]$  können die Grössen  $k_1$  und  $k_1 k_2$  mit Hilfe der Gleichung (10) bestimmt werden.

Die in Tab. 1 zusammengestellten Resultate, die mit bereits untersuchten Komplexbildnern erhalten wurden, belegen die Brauchbarkeit der Methode.

Tabelle 1.

Komplexbildner	Metallion	log $k_1$		log $k_1 k_2$	
		W. & F.	Lit.-Werte	W. & F.	Lit.-Werte
Glycin . . . . .	$\text{Cu}^{2+}$	8,1	8,2 <sup>4)</sup>	15,0	15,2 <sup>5)</sup>
Glycyl-glycin . .	$\text{Cu}^{2+}$	6,7	6,0 <sup>6)</sup>	10,7	11,7 <sup>6)</sup> 9,1 <sup>7)</sup>
Glycin . . . . .	$\text{Mn}^{2+}$	3,2	3,4 <sup>6)</sup>	5,7	5,5 <sup>8)</sup>
$\alpha$ -Picolinsäure .	$\text{Mn}^{2+}$	3,6	3,4 <sup>9)</sup>	4,6	—

Im Hinblick auf eine Bestimmung des Komplexbildungsvermögens von Penicillin und verwandten Strukturen untersuchten wir in der Folge das Verhalten von acylierten Aminosäuren gegenüber  $\text{Cu}^{2+}$ . Die Resultate dieser Untersuchungen sind in Tab. 2 zusammengestellt:

Tabelle 2.

Komplexbildner		log $k_1$	log $k_1 k_2$
I	Phenylalanin . . . . .	—	14,9 <sup>8)</sup>
II	N-Acetylphenylalanin . . . .	2,2	—
III	Alanin . . . . .	8,5 <sup>6)</sup>	15,4 <sup>6)</sup>
IV	N-Benzoylalanin . . . . .	1,5	—
V	DL-Pipecolinsäure . . . . .	7,7	14,2
VI	N-Benzoyl-DL-pipecolinsäure .	1,8	—
VII	Picolinsäure . . . . .	5,6 <sub>5</sub>	9,1
VIII	6-Methylpicolinsäure . . . .	5,6 <sub>0</sub>	8,9

<sup>4)</sup> J. Bjerrum, Chem. Rev. **46**, 481 (1950).

<sup>5)</sup> R. M. Keefer, J. Amer. chem. Soc. **68**, 2329 (1946).

<sup>6)</sup> C. B. Monk, Trans. Farad. Soc. **47**, 297, 285 (1951).

<sup>7)</sup> H. Dobbie & W. O. Kermack, Biochem. J. **59**, 240 (1955).

<sup>8)</sup> A. Albert, Biochem. J. **46**, Proc. of Soc. XXXIX (1950).

<sup>9)</sup> A. Weiss, S. Fallab & H. Erlenmeyer, Helv. **38**, 263 (1955).

Aus den Messresultaten mit den drei Verbindungspaaren I–VI geht eindeutig hervor, dass Acylierung der basischen Funktion in der Aminosäure einen beträchtlichen Abfall des Komplexbildungsvermögens zur Folge hat. Immerhin zeigen die Verbindungen II, IV und VI noch ein messbares Bindungsvermögen für  $\text{Cu}^{2+}$ . Am Beispiel der 6-Methylpicolinsäure (VIII) untersuchten wir die Möglichkeit der sterischen Hinderung einer dem Donator-Atom benachbarten Methylgruppe. Entsprechend der Abnahme der Basizität des Ringstickstoffs ( $\text{pK}_{\text{NH}} = 5,6$  bzw.  $5,5$ ) ist eine sehr geringe Abnahme des Komplexbildungsvermögens festzustellen. Die sterischen Verhältnisse scheinen demnach für  $\text{H}^+$  wie für  $\text{Cu}^{2+}$  den gleichen, und zwar nicht einen sehr starken, Einfluss zu haben.

### Experimentelles.

**Messungen:** Käuflicher IA Dowex 50 mit 8% DVB wurde zunächst in Wasser gewaschen und auf einer Säule mit 5-proz. HCl vollständig in die Acidoform übergeführt, um eventuell noch vorhandene Metallionen zu eluieren. Darauf wurde der IA durch Aufschlammung in 5-proz. NaOH in das Na-Salz übergeführt, mit 0,1-n. NaCl gewaschen, filtriert und bei  $60^\circ$  an der Luft getrocknet. Zur Durchführung der Messungen wurde die für die erwünschte Konzentration benötigte Menge Komplexbildner in einen  $250\text{-cm}^3$ -Masskolben eingewogen, mit  $25\text{ cm}^3$  einer 1-n. NaCl-Lösung,  $25\text{ cm}^3$  eines  $1,2 \cdot 10^{-1}$ -n. Acetatpuffers (pH 5,5) sowie einem der erwünschten  $[\text{Cu}^{2+}]$  entsprechendes Volumen einer  $10^{-3}$ -m.  $\text{CuSO}_4$ -Lösung versetzt, das Ganze mit  $\text{H}_2\text{O}$  aufgefüllt und der pH-Wert mit konz. Säure bzw. Base potentiometrisch auf 5,5 eingestellt. Von dieser Lösung wurden zwei Proben von  $100\text{ cm}^3$  mit  $500\text{ mg}$  des nach der oben beschriebenen Vorschrift zubereiteten IA in einer  $200\text{-cm}^3$ -Polyäthylenflasche drei Std. geschüttelt.

Bei den Messungen mit  $\text{Mn}^{2+}$  arbeiteten wir mit  $200\text{ mg}$  IA in  $10^{-2}$ -m. Veronalpuffer vom pH 7, da es sich zeigte, dass  $\text{Mn}^{2+}$  von der IA-Phase stärker beansprucht wird als  $\text{Cu}^{2+}$ .  $[\text{Me}^{2+}]_{\text{tot}}$  bewegte sich zwischen  $10^{-5}$  und  $10^{-4}$ . Bei Verbindungen mit starkem Komplexbildungsvermögen wie Picolinsäure war  $[\text{RH}]_{\text{tot}}$  in der Größenordnung von  $10^{-4}$  und bei Verbindungen mit geringerem Komplexbildungsvermögen in der Größenordnung von  $10^{-2}$ .

Nach Einstellung des Gleichgewichts wurde der IA auf Glaswatte filtriert und mit wenig 0,1-n. NaCl ausgewaschen. Zur Eluierung der IA-Phase wurde in einem Becherglas viermal mit HCl (1:1) gewaschen, die vereinigten Eluate mit 50-proz. NaOH neutralisiert und auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt. In dieser Lösung wurde die Konzentration der eluierten  $\text{Me}^{2+}$  spektrophotometrisch bestimmt,  $\text{Cu}^{2+}$  nach Umsetzung mit Na-Diäthylthiocarbamat<sup>10)</sup> und  $\text{Mn}^{2+}$  nach Oxydation mit Kaliumperjodat zu Permanganat<sup>11)</sup>.

Die gemessenen Werte sind scheinbare Gleichgewichtskonstanten. Die Temperatur betrug bei allen Messungen  $22^\circ \pm 2^\circ$ . Für alle Versuche wurde IA-Wasser verwendet.

**Präparate.** DL-Pipicolinsäure-äthylester: Eine Lösung von 10 g Picolinsäure-äthylester in  $180\text{ cm}^3$  abs. Dioxan wurde mit 4 g Raney-Nickel<sup>12)</sup> im Schüttelautoklaven mit Glaseinsatz bei  $150^\circ$  und 250 Atm. hydriert, die Reaktionslösung vom Katalysator abgetrennt und im Vakuum destilliert. Man erhielt 7,1 g (68%) DL-Pipicolinsäure-äthylester als farbloses Öl vom Sdp.  $88\text{--}89^\circ/11\text{ mm}^{13)}$ .

DL-Pipicolinsäure<sup>14)</sup> erhielten wir durch Hydrierung von Picolinsäure in Eisessig mit  $\text{PtO}_2$  als Katalysator<sup>15)</sup>.

<sup>10)</sup> E. B. Sandell, Colorimetric Determination of Traces of Metals, New York 1944, p. 221.

<sup>11)</sup> E. B. Sandell, l. c. <sup>10)</sup>, p. 312.

<sup>12)</sup> H. Adkins & L. W. Covert, J. Amer. chem. Soc. **54**, 4116 (1932).

<sup>13)</sup> R. Willstätter, Ber. deutsch. chem. Ges. **29**, 390 (1896): 1079/20 mm.

<sup>14)</sup> C. M. Stevens & B. Ellmann, J. biol. Chemistry, **182**, 75 (1950).

<sup>15)</sup> Org. Synth., coll. vol. I, 463 (1941).

N-Benzoyl-DL-pipecolinsäure: Eine Lösung von 5 g DL-Pipecolinsäure-äthylester in 20 cm<sup>3</sup> Chloroform wurde in der Kälte tropfenweise mit 2,3 g frisch destilliertem Benzoylchlorid versetzt. Nach kurzer Zeit wurde das gallertig ausgefallene DL-Pipecolinsäure-äthylester-hydrochlorid abfiltriert und mit Chloroform nachgewaschen. Das Filtrat wurde mit weiteren 50 cm<sup>3</sup> Chloroform versetzt und unter Zugabe von Eis mit verd. HCl, verd. NaOH und H<sub>2</sub>O gewaschen, mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingedampft. Der ölige Rückstand, N-Benzoyl-DL-pipecolinsäure-äthylester, wurde 20 Min. mit 10 cm<sup>3</sup> 2-n. NaOH geschüttelt; dann wurde mit verd. HCl angesäuert, mit Essigester extrahiert, der Extrakt mit H<sub>2</sub>O gewaschen, mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingedampft. Das zurückbleibende Öl erstarrte nach einiger Zeit und wurde aus Benzol-Ligroin umkristallisiert: 2,9 g (40%) N-Benzoyl-DL-pipecolinsäure vom Smp. 130—131°.

C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>O<sub>3</sub>N Ber. C 66,93 H 6,48 N 6,01% Gef. C 66,76 H 6,37 N 6,16%

Der Direktion der Firma *F. Hoffmann-La Roche & Co. AG*, die uns in ihren Laboratorien die Durchführung von Druckhydrierungen ermöglichte, möchten wir auch an dieser Stelle unsern Dank aussprechen.

Die Mikroanalysen verdanken wir dem Mikrolabor der Organisch-chemischen Anstalt der Universität Basel (*E. Thommen*).

#### SUMMARY.

Complex formation of substituted amino acids with Cu<sup>2+</sup> has been studied by use of ion exchangers. Acylation of the amino group results in a heavy decrease of coordination tendency.

Anstalt für anorganische Chemie der Universität Basel.

## 75. Fluoreszierende Stoffe aus *Drosophila melanogaster*: die roten Augenfarbstoffe

5. Mitteilung<sup>1)</sup>

von **M. Viscontini**<sup>2)</sup>, **E. Hadorn**<sup>3)</sup> und **P. Karrer**<sup>2)</sup>.

(8. III. 57.)

Bei der Chromatographierung der im Imaginalauge von *Drosophila melanogaster* (Wildrasse) vorhandenen Stoffe werden im Papierchromatogramm, welches man mit Propanol, NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O und mit Butanol, CH<sub>3</sub>COOH, H<sub>2</sub>O entwickelt, zwei rotorangefarbige Flecken sichtbar, die im UV.-Licht rot bzw. orange fluoreszieren und kleine Rf-Werte besitzen. Es handelt sich hier um eine chromatographische Aufteilung des von zahlreichen Autoren beobachteten „wasserlöslichen roten Augenfarbstoffes“ der *Drosophila*<sup>4)5)6)7)</sup>.

<sup>1)</sup> 3. Mitt., *Helv.* **38**, 2034 (1955); 4. Mitt., *Naturwissenschaften* **43**, 379 (1955).

<sup>2)</sup> Chemisches Institut der Universität Zürich.

<sup>3)</sup> Zoologisch vergleichend-anatomisches Institut der Universität Zürich.

<sup>4)</sup> *J. Schultz*, *Amer. Nat.* **69**, 30 (1935).

<sup>5)</sup> *F. Mainx*, *Z. Vererbungslehre* **75**, 256 (1938).

<sup>6)</sup> *B. Ephrussi & J. L. Herold*, *Genetics* **29**, 148 (1944).

<sup>7)</sup> *D. J. Nolte*, *J. of Genetics* **51**, 142 (1952).