

b) *Attaque à la carboxypeptidase*: Cet enzyme libère après 2 h déjà His et la totalité de Leu et Phe. L'unique peptide résiduel, demeurant inchangé même après 24 h de digestion, migre moins vite ($E_{1,9}^0 = 1,0$ Leu) que le décapeptide XXXI. Après hydrolyse acide totale, il fournit Asp, Arg, Tyr, Val, His et Pro; il contient également la leucine dont la tache coïncide avec celle de l'heptapeptide au pH 1,9.

c) *Attaque à la trypsine*: Il se produit après 24 h une scission complète du décapeptide en deux fragments. Le premier migrant plus vite ($E_{1,9}^0 = 0,8$ His) que le décapeptide XXXI, fournit après hydrolyse Asp et Arg. Le seconde migre moins vite ($E_{1,9}^0 = 1,0$ Asp) et donne par hydrolyse totale Val, His, Pro, Phe, Tyr et Leu.

SUMMARY

Val⁵-angiotensin-I and one of its optical isomers, Val⁵-D-Phe⁸-angiotensin-I, were synthesized by a new way excluding any possibility of racemisation. The optical purity of the intermediary and final peptides was furthermore ascertained by enzymatic degradation. Val⁵-angiotensin-I exhibited the full biological activity expected. Val⁵-D-Phe⁸-angiotensin-I was found to be practically inactive. It failed also to antagonize Val⁵- or Ileu⁵-angiotensin-I or to inhibit «converting enzyme».

Laboratoires de Chimie Pharmaceutique SANDOZ, Bâle

86. Die Wechselwirkung von Polymyxin B mit zweiwertigen Kationen in wässriger Lösung

von H. Brintzinger

(2. III. 61)

Von NEWTON¹⁾ ist festgestellt worden, dass die Zugabe gewisser Metallionen wie Mg²⁺ zum Nährmedium die bakteriostatische Wirkung von Polymyxinen *in vitro* aufzuheben vermag.

Dieser Befund kann, worauf auch NEWTON hinweist, zunächst auf zwei Arten verstanden werden: Entweder hebt eine Komplexbildung zwischen Polymyxin und zugegebenem Metallion die bakteriostatische Wirkung des ersteren auf, oder aber es wird eine – durch das positiv geladene Polymyxin bewirkte – kompetitive Verdrängung des Metallions aus bestimmten Haftstellen des Organismus durch die Erhöhung der Metallionenkonzentration wieder rückgängig gemacht. Wir stellten uns die Aufgabe, – zunächst in wässriger Lösung – die Reaktion von Polymyxin B²⁾ mit zweiwertigen Kationen auf der einen, und mit solchen Ligandsystemen auf der anderen Seite zu studieren, deren biologische Bedeutung mit ihrer Tendenz zur Bildung von Mg²⁺-Komplexen verknüpft ist.

Polymyxin B ist ein cyclisches Decapeptid, dem – Abbauuntersuchungen verschiedener Autoren^{3a)} sowie einer Reihe synthetischer Arbeiten von K. VOGLER & Mitarb.^{3b)} zufolge – eine der in Fig. 1 dargestellten Strukturen zuzuschreiben ist. Es besitzt 5 freie Aminogruppen von α, γ -Diaminobuttersäure-Bausteinen und ist deshalb und wegen der Möglichkeit zur Acidokomplexbildung an den Amid-Gruppierungen ein potentieller Chelat-Komplexbildner.

1) B. A. NEWTON, Nature 172, 160 (1953).

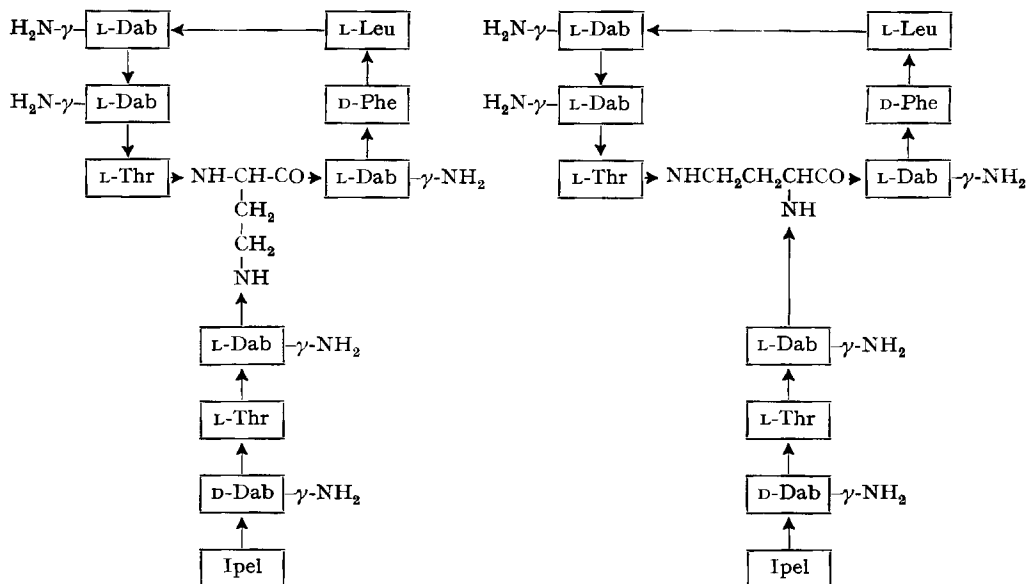


Fig. 1. Die zwei möglichen Strukturen von Polymyxin B

A. Komplexbildung mit Kationen

Wir untersuchten die Komplexbildung zwischen Polymyxin B und den Metallionen Mg^{2+} , Cu^{2+} und Ni^{2+} sowohl mit Hilfe von potentiometrischen als auch – im Falle von Cu^{2+} und Ni^{2+} – von spektrophotometrischen Messungen. Das Ergebnis von Titrationsen einer $5 \cdot 10^{-3}$ M Lösung von Polymyxiniumsulfat allein, sowie einer solchen Lösung in Gegenwart von $2 \cdot 10^{-3}$ M CuSO_4 bzw. von $2 \cdot 10^{-3}$ M NiSO_4 , mit 0,1 N NaOH ($f = 0,95$), jeweils in 0,1 M KCl als Lösungsmittel bei 20° , ist in Fig. 2 dargestellt⁴⁾. Bei analogen Titrationsen in Gegenwart von $2 \cdot 10^{-3}$ M CoSO_4 trat, nach nur geringfügiger Abweichung der Titrationskurve von der des Liganden, bei pH 8,2 ein Niederschlag, offenbar von basischen Co-Salzen, auf⁵⁾. Eine Titrationskurve in Gegenwart von 10^{-2} M MgSO_4 war bis pH > 9 mit derjenigen des Liganden allein praktisch identisch.

²⁾ Zur Verwendung gelangte bei unseren Versuchen ein Polymyxin-B-Präparat der Firma PFIZER & Co., Inc., New York, das uns von der Fa. HOFFMANN-LA ROCHE freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde. Das Präparat stellt möglicherweise eine Mischung der Polymyxine B1 und B2 dar, die sich jedoch in ihrem Koordinationsverhalten nicht unterscheiden sollten^{3 a)}.

^{3 a)} W. HAUSMANN & L. C. CRAIG, J. Amer. chem. Soc. 76, 4892 (1954); W. HAUSMANN, *ibid.* 78, 3663 (1956); G. BISERTE & M. DAUTREVAUX, Bull. Soc. Chim. biol. 39, 795 (1957). – b) K. VOGLER, P. LANZ & W. LERGIER, Experientia 15, 334 (1959); K. VOGLER, R. O. STUDER, W. LERGIER & P. LANZ, Helv. 43, 1751 (1960); R. O. STUDER, K. VOGLER & W. LERGIER, Helv. 44, 131 (1961).

⁴⁾ Bei der Ausführung der potentiometrischen Messungen und der Gewinnung der Berechnungsansätze verfahren wir wie früher angegeben: H. BRINTZINGER & S. FALLAB, Helv. 43, 43 (1960).

⁵⁾ Beim Stehenlassen an der Luft löste sich der Niederschlag und die alkalische Lösung färbte sich rot: es wird offenbar ein stabiler Co^{3+} -Komplex ausgebildet.

Die Titrationskurve des Liganden zeigt, dass die Puffergebiete aller fünf γ -Aminogruppen – wie zu erwarten – im alkalischen Bereich zwischen pH 7,5 und pH 9,5 liegen. Der Versuch, den Verlauf der Titrationskurve für eine genaue Bestimmung der fünf pK-Werte des Liganden heranzuziehen, ergab jedoch, dass der beobachtete Ver-

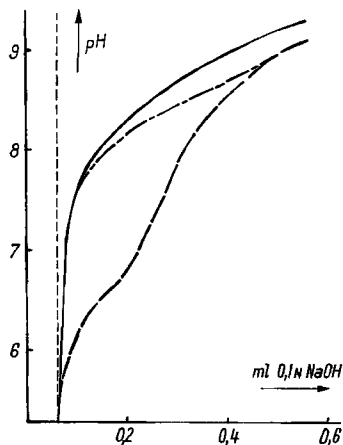


Fig. 2. Titration von je 2,5 ml $5,7 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ Polymyxiniumsulfat allein (—), in Gegenwart von $2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ NiSO_4 (---) und von $2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ CuSO_4 (- · - · -), jeweils in 0,1 M KCl

lauf allein durch die Annahme von Gleichgewichten zwischen verschieden stark protonisierten Ligandmolekeln nicht zu erklären ist. Die Ursache hierfür dürfte wohl vor allem in drei Umständen zu suchen sein:

1. Man muss vermuten, dass das fünffach geladene Polymyxinium-Kation H_5L^- – wie dies auch bei anderen höhergeladenen Ammonium-Kationen bekannt ist⁶⁾ – mit den in der Lösung vorhandenen Sulfat-Ionen Ionenpaar-Assoziate bildet, durch welche vor allem die hochgeladenen Ionenspezies erheblich stabilisiert werden.

2. Sehr wahrscheinlich hängt die Sekundärstruktur des Peptides vom jeweiligen Protonisierungsgrad desselben ab. Die durch diese Abhängigkeit bewirkte Überlagerung von Protonisierungs-Gleichgewichten und Sekundärstruktur-Umwandlungsgleichgewichten muss den Verlauf der Titrationskurve ebenfalls verzerren.

3. Von etwa pH 9,3 ab fällt das freie Polymyxin L sichtbar aus. Bilden nun die Polymyxinmolekeln schon vor dem Auftreten eines sichtbaren Niederschlages kolloidale Assoziate, so muss auch hierdurch der Verlauf der Titrationskurve gestört werden.

Immerhin lässt sich der durch den letzten Faktor vermutlich am wenigsten gestörte Bereich der Titrationskurve zwischen pH 5 und pH 8 noch befriedigend auswerten und ergibt ein $\text{pK}_{\text{H}_4\text{L}}^{\text{H}} = 7,98 \pm 0,05$; drei weitere pK-Werte lassen sich zu

$$\text{pK}_{\text{H}_3\text{L}}^{\text{H}} = 8,6, \quad \text{pK}_{\text{H}_2\text{L}}^{\text{H}} = 9,0 \quad \text{und} \quad \text{pK}_{\text{H}_1\text{L}}^{\text{H}} = 9,3 \quad \text{abschätzen}^7).$$

⁶⁾ G. SCHWARZENBACH & P. MOSER, *Helv.* 36, 581 (1953).

⁷⁾ Alle diese Konstanten (Bezeichnung nach J. BJERRUM, G. SCHWARZENBACH & L. G. SILLÉN, *Stability Constants*, London 1958) sind natürlich weit davon entfernt, thermodynamische Konstanten zu sein. Sie gelten vielmehr nur in Lösungen des angegebenen Anionengehaltes, und auch das nur unter der zwar wahrscheinlichen, von uns jedoch nicht weiter geprüften Annahme, dass jeweils nur ein bestimmter, und nicht eine Reihe verschiedener konfigurationsisomerer Komplexe gebildet wird.

Wir werteten deshalb nur die – im Wesentlichen unterhalb von pH 8 liegende – Komplexbildungsreaktion des Cu^{2+} zur Bestimmung von Gleichgewichtskonstanten aus. Um von den weder gut messbaren noch gut definierten Aciditätskonstanten möglichst unabhängig zu sein, verfahren wir dabei folgendermassen: Von dem Verbrauch an OH^- durch den Liganden in Gegenwart von Metallion M wurde ein Korrekturglied subtrahiert, das einen bestimmten Bruchteil des OH^- -Verbrauchs des Liganden allein beträgt. Dieser Bruchteil hängt so vom Ausbildungsgrad eines Cu-Polymyxin-Chelats ab, dass für den Ausbildungsgrad 0 dieser Bruchteil gleich 1 und für den Ausbildungsgrad 1 gleich $([\text{L}]_{\text{tot}} - [\text{M}]_{\text{tot}})/[\text{L}]_{\text{tot}} = 0,65$ wird ($[\text{L}]_{\text{tot}} =$ Gesamtkonzentration an Ligand, $[\text{M}]_{\text{tot}} =$ Gesamtkonzentration an Metallion⁸⁾). Der so korrigierte OH^- -Verbrauch in Gegenwart des Metallions wird mit $[\Delta\text{H}]$ bezeichnet und stellt die Anzahl der bei dem betreffenden pH durch das Cu^{2+} vom Liganden verdrängten Protonen dar.

Die Figur 3a zeigt die Abhängigkeit der Grösse $[\Delta\text{H}]/[\text{M}]_{\text{tot}}$ vom pH: Es werden maximal 4 Protonen durch ein Cu^{2+} verdrängt. Die Steilheit der Kurve entspricht zwischen pH 6 und pH 7 recht genau einer Verdrängung von «drei Protonen in einem Schritt»⁹⁾, unterhalb und oberhalb dieses Bereiches ist die Steilheit jedoch nur etwa die von «einem Proton in einem Schritt». Der flache Beginn der Protonenverdrängung und die Tatsache, dass weitere zwei Protonen mit der Steilheit von «drei Protonen in einem Schritt» verdrängt werden, lässt sich nun einzig so verstehen, dass der OH^- -Verbrauch unterhalb pH 6 durch die Ausbildung einer $(\text{CuOH})^+$ -haltigen Partikel zustande kommt. Die Ausbildung solcher Hydroxykomplexe ist ja in der Tat in diesem pH-Bereich zu erwarten¹⁰⁾ und wird auch dadurch wahrscheinlich gemacht, dass bei der weiteren Titration tatsächlich basische Cu-Salze ausfallen, wenn der Ligandüberschuss nicht hinreichend gross ist. Unter den Bedingungen unserer Versuche wird die Bildung von Hydroxykomplexen des Cu^{2+} jedoch erfolgreich konkurrenziert durch die Ausbildung eines Komplexes MH_2L , in welchem das Cu^{2+} zunächst an drei Haftstellen der Polymyxinmolekel gebunden ist. Dieser Komplex verliert dann, wie der flache Anstieg von $[\Delta\text{H}]/[\text{M}]_{\text{tot}}$ gegen den Wert 4 zeigt, zwischen pH 6,5 und 8,5 ein weiteres Proton, wobei der Ligand sich vierzählig koordiniert.

Für die exakte rechnerische Auswertung wurde im pH-Bereich 5,6 bis 6,8 das gleichzeitige Auftreten von $(\text{MOH})^+$ und MH_2L in Rechnung gestellt und ausserdem die zusätzliche Stabilisierung des Chelats durch den Verlust eines Protons bei pH ca. 7,3 berücksichtigt⁴⁾.

Für die Bildung des Hydroxykomplexes erhält man so den plausiblen Wert von

$$\text{Die Grösse} \quad pK_{\text{M}(\text{H}_2\text{O})_x}^{\text{H}} = 6,35 \pm 0,05^7).$$

$$pK_{\text{MH}_2\text{L}}^{\text{M}} - p(K_{\text{H}_2\text{L}}^{\text{H}} \cdot K_{\text{H}_1\text{L}}^{\text{H}} \cdot K_{\text{H}_1\text{L}}^{\text{H}}) = -17,25 \pm 0,06^7)$$

⁸⁾ Zur Berechnung des Quotienten wurde angenommen, dass pro gebildetes Chelat 3 Protonen verdrängt werden. In dem Bereich, in dem der Ausbildungsgrad des Chelats < 1 ist, spielt – wegen des geringen Gewichts der Korrektur – die Grösse des Quotienten keine bedeutende Rolle.

⁹⁾ Wir schliessen uns hierin der Terminologie von G. SCHWARZENBACH an; s. z. B. ⁶⁾ und G. SCHWARZENBACH & R. SULZBERGER, *Helv.* 26, 453 (1943).

¹⁰⁾ Welche Struktur der $(\text{CuOH})^+$ -haltigen Partikel zukommt, kann nicht beurteilt werden. Es ist jedoch denkbar, dass z. B. basisches Cu^{2+} -Sulfat nicht als K^+ -Salz ausfällt, sondern als Polymyxiniumsalz in Lösung bleibt.

wird ebenfalls mit guter Konstanz erhalten. Durch Einsetzen der oben erhaltenen Aciditätskonstanten kann man hieraus berechnen:

$$pK_{MH_2L}^M = 8,47.$$

Wir ermittelten nun aus diesen Daten den theoretischen OH⁻-Verbrauch (in Fig. 3a gestrichelt dargestellt) für die Ausbildung von (MOH)⁺ und MH₂L. Aus der Differenz zwischen dem so berechneten und dem tatsächlichen OH⁻-Verbrauch ergibt sich schliesslich für die Dissoziation des vierten Protons aus dem Komplex:

$$pK_{MH_2L}^H = 7,37 \pm 0,06.$$

Hieraus und aus den oben angegebenen Konstanten lässt sich berechnen:

$$pK_{MHL}^M = 10,37).$$

Es gelang weiterhin, das so erhaltene komplexchemische Bild durch spektrophotometrische Untersuchungen weiter zu sichern. Es wurde hierzu die Extinktion einer Lösung von gleicher Zusammensetzung wie bei den pH-Titrationen bei 560 und 600 m μ in Abhängigkeit vom pH gemessen¹¹⁾. Die so erhaltenen Werte sind in Fig. 3b dargestellt. Es zeigt sich, dass die Zunahme der Extinktion mit steigendem pH der Zunahme von $[\Delta H]/[M]_{tot}$ recht gut parallel verläuft. Insbesondere zeigt es sich, dass die – durch die Ausbildung des Komplexes MHL bedingte – Divergenz der für MH₂L jeweils gleichen Extinktionswerte bei 560 und 600 m μ genau der gefundenen Verdrängung des vierten Protons in Fig. 3a entspricht. Aus der Abhängigkeit der Extinktionsdivergenz ΔE vom pH ergibt sich so in Übereinstimmung mit den Titrationsdaten:

$$pK_{MH_2L}^H = 7,4 \pm 0,1.$$

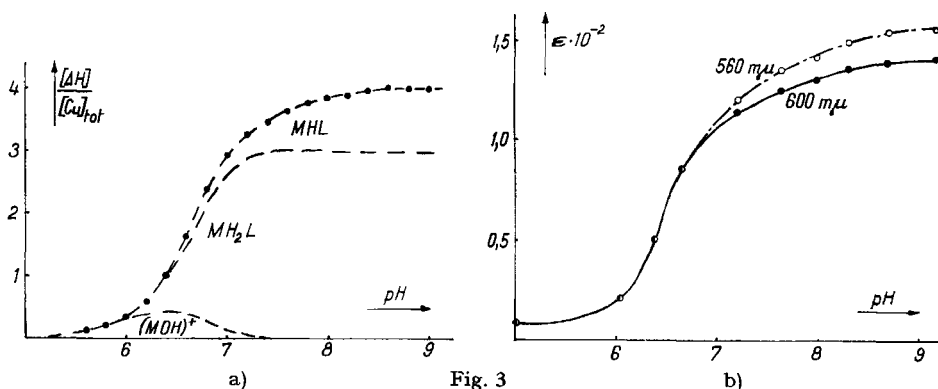


Fig. 3
 a) $[\Delta H]/[Cu]_{tot}$ in Abhängigkeit vom pH (--- theoretische Kurven für die Ausbildung der angegebenen Partikel; ● Messwerte).
 b) Extinktion bei 560 (---) und 600 (—) m μ in Abhängigkeit vom pH.

Wir versuchten nun im weiteren, zu Aussagen über die Struktur der gebildeten Komplexe zu gelangen. Von besonderem Interesse war uns hierfür das Absorptionsspektrum der Cu²⁺-Komplexe mit der Zusammensetzung MH₂L und MHL (in Fig. 4

¹¹⁾ Die jeweilige Einstellung des pH erfolgte jedoch hier mit 2 N NaOH, so dass die Vergrößerung des Volumens vernachlässigt werden kann.

dargestellt). Ähnlich kurzwellige Absorptionen mit etwa gleicher Intensität sind für die Komplexe des Cu^{2+} mit Diglycylglycin beschrieben worden¹²⁾, bei denen das Cu^{2+} ausser an einer $-\text{COO}^-$ - und einer $-\text{NH}_2$ -Gruppe an zwei Amid-Gruppierungen unter Verdrängung der Amid-Protonen koordiniert ist. Hierbei wird ebenfalls zunächst ein dreizähniges Chelat gebildet, aus welchem das zweite Amid-Proton bei pH 7,0 unter Ausbildung eines vierzähnigen Chelats eliminiert wird¹²⁾¹³⁾.

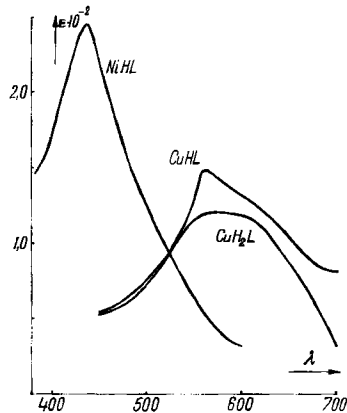


Fig. 4. Absorptionsspektren der Komplexe NiHL, CuHL, und CuH_2L

Auf Grund der ähnlichen potentiometrischen und spektrophotometrischen Daten drängt sich die Vermutung auf, dass auch im Cu^{2+} -Polymyxin- wie im Cu^{2+} -Diglycylglycin-Komplex Amid-Gruppierungen mindestens zwei der vier Haftstellen darstellen. Für diese Vermutung konnten wir noch einen weiteren Beleg finden: Polymyxin und Cu^{2+} bilden, wie das Ergebnis einer JOB-Reihe (Fig. 5) zeigt, ausser dem 1:1- auch einen bimetalischen 1:2-Komplex. Die Titration eines 1:2-Ansatzes kann nicht zur Konstantenbestimmung ausgewertet werden, da bis pH < 8 Niederschläge vorliegen. Bei pH > 9 wird die Lösung jedoch klar und es ergibt sich, dass für jede $(\text{Cu}^{2+})_2$ -Polymyxin-Partikel 8 Protonen freigesetzt werden. Da nicht mehr als 5 Ammonium-

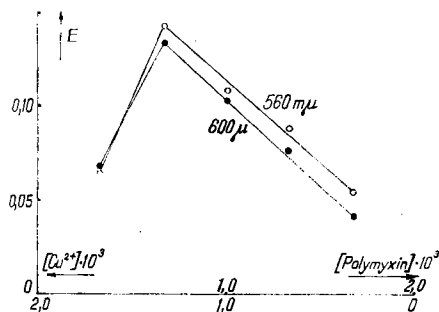


Fig. 5. JOB-Reihe für das System Cu^{2+} -Polymyxin bei pH 9

¹²⁾ H. DOBBIE & W. O. KERMACK, *Biochem. J.* 59, 257 (1955).

¹³⁾ S. P. DATTA & B. R. RABIN, *Biochim. Biophysica Acta* 19, 572 (1956); *Trans. Farad. Soc.* 52, 1123 (1956); B. R. RABIN, *ibid.* 52, 1130 (1956).

gruppen deprotonisiert werden können, muss mindestens das eine der beiden Cu^{2+} -Ionen an zwei Amid-Gruppierungen das Proton verdrängt haben.

Das Absorptionsspektrum des bei pH 9 ausgebildeten Ni^{2+} -Polymyxin-Komplexes, dem bei diesem pH die Zusammensetzung MHL zukommt, ist ebenfalls in Fig. 4 dargestellt. Dieser Komplex zeichnet sich durch eine intensive Gelbfärbung aus, hervorgerufen durch eine Bande bei $437 \text{ m}\mu$ mit einer für Ni^{2+} -Komplexe relativ hohen Intensität ($\log \epsilon = 2,4$; s. Fig. 4). Derartige Absorptionsbanden sind nun aber eindeutig nur tetragonal-planaren Ni^{2+} -Komplexen zuzuordnen¹⁴⁾, wie sie z. B. auch aus den – mit 2 H_2O sechsfach koordinierten – $\text{Ni}^{2+}(\text{en})_2$ -Komplexen gewonnen werden können¹⁵⁾, wenn man das Wasser aus zwei Koordinationsstellen des Ni^{2+} entfernt¹⁶⁾. Offenbar bewirken im Ni-Polymyxin-Komplex die besonderen sterischen Verhältnisse¹⁷⁾, dass eine Besetzung der letzten beiden Koordinationsstellen des Ni^{2+} nicht zustande kommen kann, und daher – wie dies beim Cu^{2+} sowieso der Fall sein dürfte¹⁸⁾

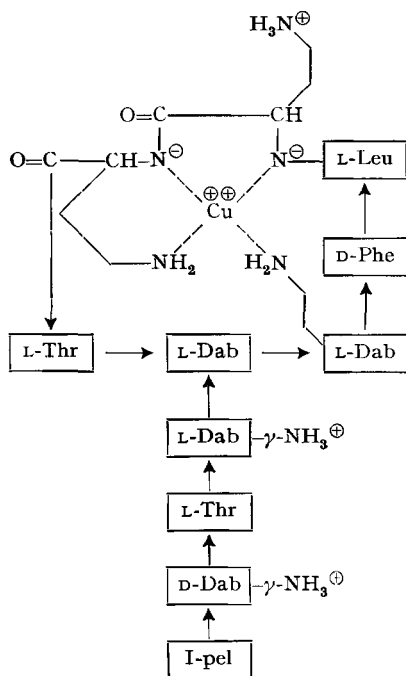


Fig. 6. Mögliche Konfiguration des Komplexes CuHL

¹⁴⁾ C. J. BALLHAUSEN & A. D. LIEHR, J. Amer. chem. Soc. *81*, 538 (1959).

¹⁵⁾ I. LIFSCHITZ, J. G. BOS & K. M. DIJKMA, Z. anorg. allg. Chem. *242*, 97 (1939); Rec. Trav. chim. Pays-Bas *59*, 407 (1940); *60*, 581 (1941); C. KLIXBÜLL JÖRGENSEN, Acta chem. scand. *11*, 399 (1957); A. K. S. AHMED & R. G. WILLIAMS, J. chem. Soc. *1960*, 2901.

¹⁶⁾ Dies kann man bewirken, indem man die Aktivität des Wassers, z. B. durch Salz- oder Alkohol-Zusatz, verringert.

¹⁷⁾ Das Kalottenmodell zeigt, dass schon die tetragonal-planaren Strukturen merklich behindert, oktaedrische jedoch sterisch unmöglich sind.

¹⁸⁾ Zur tetragonal-planaren Struktur von Cu^{2+} -Komplexen s. z. B. F. BASOLO & R. G. PEARSON in «Mechanisms of Inorganic Reactions», New York 1958, p. 59.

– ein tetragonal-planarer Komplex gebildet wird¹⁹⁾). Dies erklärt auch, warum z. B. beim Co^{2+} die Komplexbildung mit dem Polymyxin nicht hinreicht, um mit zunehmendem pH das Ausfallen von Hydrolyseprodukten zu konkurrenzieren: Die Stabilität der Komplexe solcher, bevorzugt mit Koordinationszahl 6 auftretender Metallionen muss dadurch stark reduziert werden, dass die sterischen Verhältnisse nur die Ausbildung tetragonal-planarer Komplexe zulassen.

Versucht man, unter Zugrundelegung der Polymyxinstrukturen der Fig. 1 einen tetragonal-planaren Komplex mit zwei Amid- und zwei Amino-Haftstellen zu konstruieren, so ergibt sich, dass es unmöglich ist, dies allein mit 5- oder 6-gliedrigen Chelatringen zu bewerkstelligen, sondern es muss zumindest von einer Haftstelle angenommen werden, dass ihre Koordinierung unter Ausbildung eines makrocyclischen Chelattrings erfolgt. Höchst wahrscheinlich werden hierbei durch zwei benachbarte Amid- und einer zu diesen benachbarten γ -Amino-Gruppe ein Chelat-5- und ein zu diesem «anellierter» Chelat-6-Ring gebildet, und eine weitere γ -Amino-Gruppe greift, z. B. über den Polypeptidring hinweg, als vierte Haftstelle in die Koordinationssphäre ein. Welche der fünf γ -Amino-Gruppen der Polymyxinmolekel den 6-gliedrigen und welche den makrocyclischen Chelatring ausbildet, kann wegen der Unübersichtlichkeit der die relative Stabilität der möglichen Konfiguration bedingenden Faktoren nicht angegeben werden. Zur Illustration der zu erwartenden Komplexstrukturen ist in Fig. 6 eine denkbare Konfiguration schematisch dargestellt worden.

Die koordinationschemische Relevanz unserer Untersuchungen sehen wir darin, dass es gelungen ist, an einer relativ übersichtlichen Modells substanz nachzuweisen, dass – wie dies vermutet worden war²⁰⁾ – die Sekundärstruktur von Polypeptiden und Proteinen tatsächlich zur Ausbildung makrocyclischer Chelatringe Anlass geben kann.

Da hinsichtlich der Tendenz zur Bildung solcher Komplexe mit dem Cu^{2+} cyclische Peptidstrukturen offenkettigen aus Entropiegründen überlegen sein müssen, erscheint es denkbar, dass die biogenetische Cyclisierung der offenkettigen Vorläufer durch eine Komplexbildung mit Cu^{2+} sowohl kinetisch begünstigt als auch in ihrer Richtung bestimmt werden könnte.

B. Komplexbildung mit Anionen

Da sich beim Mg^{2+} keinerlei Komplexbildung mit dem Polymyxin zu erkennen gab, versuchten wir im weiteren, Anhaltspunkte dafür zu finden, inwieweit die bakterio-statische Wirkung des Polypeptids durch eine Verdrängung des Mg^{2+} aus seinen – für den Ablauf essentieller Reaktionen notwendigen – Verbindungen zu verstehen ist. Und zwar dachten wir hierbei in erster Linie an eine Verdrängung des Mg^{2+} aus seinen möglicherweise ionenpaarartigen Verbindungen mit Polyphosphat-Nucleotiden durch das fünffach geladene Polymyxinium-Ion. Um die Stabilität allfälliger Komplexe zwischen Polymyxin und z. B. ATP zu bestimmen, führten wir – analog zu früher be-

¹⁹⁾ Ähnliche Absorptionsspektren sind im übrigen kürzlich auch für Komplexe zwischen Ni^{2+} und einigen einfacher gebauten Peptiden gefunden und im Sinne tetragonal-planarer Strukturen gedeutet worden (R. B. MARTIN, M. CHAMBERLIN & J. T. EDSALL, J. Amer. chem. Soc. 82, 495 (1960)).

²⁰⁾ Vgl. z. B. G. SCHWARZENBACH in «Chemical Specificity in biological Interactions», New York 1954, p. 164 ff; G. H. WOLFF & S. FALLAB, Helv. 39, 837 (1956).

schriebenen Versuchen⁴⁾ – eine Titration von ATP allein und in Gegenwart eines Unterschusses an Polymyxiniumsulfat in 0,1 M KCl bei 20° durch (Fig. 7). Das Auftreten eines Komplexes gibt sich einmal durch eine Senkung des ATP⁴⁻ \rightleftharpoons HATP³⁻-Puffergebietes, und zum anderen dadurch zu erkennen, dass die Deprotonisierung des Polymyxinium-Ions in Gegenwart des ATP⁴⁻ erst bei einem um ca. 0,4 höheren pH-Wert erfolgt als in Gegenwart von lediglich Chlorid- und Sulfat-Ionen. Die rechneri-

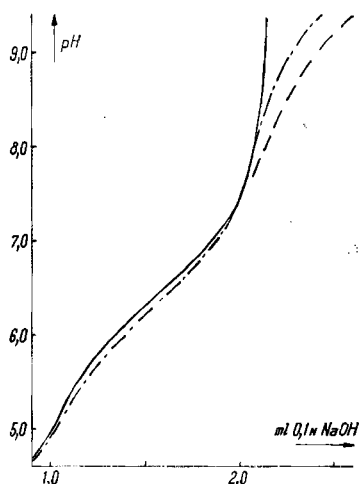


Fig. 7. Titration von 2,5 ml 0,1 M ATP allein (—) und in Gegenwart von 10^{-2} M Polymyxiniumsulfat (---), sowie dieselbe Kurve unter der Annahme, dass keine Wechselwirkung zwischen ATP und Polymyxin auftritt (-.-.-)

sche Auswertung der Senkung des ATP-Puffergebietes ergab für den ATP-Polymyxinium-Komplex

$$pK_{H_2L-ATP}^{H_2L} = 2,6 \pm 0,1^{10)}.$$

Dieser Komplex ist um einen Faktor von ca. 25 schwächer als der entsprechende Mg-ATP-Komplex, und es ist mithin nicht anzunehmen, dass eine Konkurrenz zwischen Polymyxin und Mg^{2+} um Polyphosphat-Nukleotide in wässriger Lösung den beobachteten Antagonismus erklären kann. Wahrscheinlich ist jedoch bei einer solchen Konkurrenz um anionische Phosphat-Verbindungen innerhalb oder an der Oberfläche lipidartiger Phasen das Polymyxin gegenüber dem Mg^{2+} durch seinen Fettsäure-Rest begünstigt²¹⁾.

Herrn Professor H. ERLNMEYER sei auch an dieser Stelle für sein Interesse an dieser Arbeit bestens gedankt. Herrn Professor S. FALLAB und den Herren Drs. K. VOGLER und B. PRIJS bin ich für wertvolle Anregungen sowie für Mithilfe bei der Abfassung des Manuskriptes zu Dank verpflichtet. Der Kommission für Atomwissenschaft des SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG sei für die Gewährung von Mitteln für diese Arbeit der beste Dank ausgesprochen.

²¹⁾ S. a. B. A. NEWTON, *Bacteriol. Rev.* 20, 14 (1956); A. V. FEW, *Biochim. Biophysica Acta* 76, 137 (1955).

SUMMARY

The interaction between polymyxin B and the ions Cu^{2+} and Ni^{2+} has been investigated by means of potentiometric and spectrophotometric studies. Stability constants and absorption spectra of the complexes formed suggest that proton removal from amide and γ -amino groups takes place with formation of two normal and one macrocyclic chelate rings. Mg^{2+} did not show any direct interaction with the polymyxin.

Adenosinetriphosphate on the other hand has been found to form a complex of moderate strength with polymyxinium cation.

Institut für Anorganische Chemie
der Universität Basel

87. Über Derivate des Iminodibenzyls

Iminostilben-Derivate

von W. Schindler und H. Blattner

(3. III. 61)

In einer ersten Mitteilung¹⁾ haben wir über basisch alkylierte und basisch acylierte Derivate des Iminodibenzyls (Ia)²⁾ berichtet. Einer dieser Stoffe, das 5- γ -Dimethylaminopropyl-iminodibenzyl-hydrochlorid, ist als Thymolepticum³⁾ in die Therapie eingeführt worden⁴⁾. Seither sind auch durch Substitution und Oxydation modifizierte Iminodibenzyle hergestellt und z. T. beschrieben worden⁵⁾. Im Rahmen unserer Arbeiten in der Iminodibenzylreihe gelang es vor längerer Zeit, dieses in den Grundkörper, das 5H-Dibenz[b,f]azepin (Va), das wir der Kürze halber als Iminostilben bezeichnen, überzuführen⁶⁾ und analog aus substituierten Iminodibenzylen substituierte Iminostilbene zu bereiten. Damit wurde eine Reihe neuer und nützlicher Zwischenprodukte für die Arzneimittelsynthese erschlossen. Nun haben vor kurzem HUISGEN *et. al.*⁷⁾ die Dehydrierung von Ia und dessen 5-Methylderivat zu Va resp. dem in 5-Stellung methylierten Derivat beschrieben und die physikalischen Eigenschaften dieser Stoffe zur Abschätzung der Bindungsverhältnisse in diesem System herangezogen. Ungefähr gleichzeitig berichteten BERGMANN & RABINOWITZ⁸⁾

¹⁾ W. SCHINDLER & F. HÄFLIGER, *Helv.* **37**, 472 (1954).

²⁾ J. THIELE & O. HOLZINGER, *Liebigs Ann. Chem.* **305**, 96 (1899); J. R. GEIGY A.G., US-Pat. 2764580.

³⁾ «Tofranil», geschützte Marke der J. R. GEIGY A.G.

⁴⁾ R. DOMENJOZ & W. THEOBALD, *Arch. int. Pharmacodyn. Thérap. CXX*, 450 (1959); R. KUHN, *Schweiz. med. Wschr.* **87**, 1136 (1957); R. KUHN, 2. Intern. Kongress Psych., Zürich 1957.

⁵⁾ J. R. GEIGY A.G., US-Pat. 2800470; W. SCHINDLER, *Helv.* **43**, 35 (1960); H. J. TEUBER, *Angew. Chem.* **70** 607 (1958).

⁶⁾ J. R. GEIGY A.G., Belg. Pat. 562302, 12. 11. 1957.

⁷⁾ R. HUISGEN, E. LASCHTUVKA & F. BAYERLEIN, *Chem. Ber.* **93**, 392 (1960).

⁸⁾ E. D. BERGMANN & M. RABINOVITZ, *J. org. Chemistry* **25**, 827 (1960).