

Les «beurres» obtenus en 1944 (N° 7) et en 1960 (N° 8) à partir du résinoïde préparé à partir de rhizomes d'iris de Florence récoltés à trois ans de culture.

Les rhizomes ont été emmagasinés avant traitement durant 2 à 3 ans, sauf ceux relatifs aux N°s 4 et 5 (six mois à un an seulement après épluchage) et au N° 7 (six ans)¹⁰⁾. Les «beurres» N°s 4, 5 et 7 n'entrent pas dans la catégorie des produits usuellement marchands.

Les acides ont été extraits des beurres N°s 1, 3, 4, 5, 7 au moyen de la lessive d'hydroxyde de potassium, et des beurres N°s 2, 6 et 8, par l'intermédiaire de leurs sels de lithium.

Le chromatographe utilisé est le modèle 300 de la F & M SCIENTIFIC CORPORATION. La charge de colonne a été constituée par 5 parties en poids d'apiezone L déposée sur 95 parties en poids de Haloport F (ég. F & M SCIENTIFIC CORPORATION). La colonne de verre avait 0,45 cm de diamètre intérieur et 190 cm de longueur.

Le gaz porteur a été l'hydrogène effluant au débit de 60 ml/min à la pression atmosphérique. La température à l'injecteur a été de 265°, et dans la colonne, de 200°. Dans ces conditions, les temps de rétention ont été d'environ 3 min (C₁₀), 6,5 min (C₁₂) et 16 min (C₁₄). Nous nous sommes assurés que l'incorporation aux mélanges des acides de 0,25% d'acide C₁₁ ou C₁₃ était décelée, la sensibilité étant voisine de 0,1%.

SUMMARY

The mixtures of fatty acids removed from eight batches of orris butter, analysed by gas chromatography, contain neither undecanoic nor tridecanoic acids.

Laboratoire de recherches de L. Givaudan & Cie
Vernier-Genève

- ¹⁰⁾ Voy. E. S. GUENTHER, *The essential oils*, vol. 6, p. 82, Van Nostrand, New York 1952; E. GILDEMEISTER & F. HOFFMANN, *Die ätherischen Öle*, 4e édition par W. TREIBS & K. BOURNOT, vol. 4, p. 462 (Akademie Verlag, Berlin 1956).

119. Farbe und Konstitution der Isoalloxazin-Silber-Komplexe¹⁾

Zum Verhalten des Riboflavins gegen Metallionen II²⁾

von P. Bamberg³⁾ und P. Hemmerich

(11. IV. 61)

Wie in der ersten Arbeit dieser Reihe²⁾ gezeigt wurde, lässt sich – im Gegensatz zu den Annahmen anderer Autoren⁴⁾ – keine Wechselwirkung des chinoiden Isoalloxazin-Systems LH mit den zweiwertigen Metallionen der ersten Übergangsreihe feststellen.

Dieser Befund wurde inzwischen auch durch BAARDA & METZLER⁵⁾ erhärtet. In eingehenden Untersuchungen an Modells-substanzen⁶⁾ konnten wir ferner die Unbeständigkeit «Oxinat»-analoger Flavochinon-Chelate IIa auf den anomal hohen proto-

¹⁾ Die Bezeichnungen Isoalloxazin und Flavin werden synonym gebraucht.

²⁾ P. HEMMERICH & S. FALLAB, *Helv.* 41, 498 (1958).

³⁾ Auszug aus der Dissertation P. BAMBERG, Basel 1961.

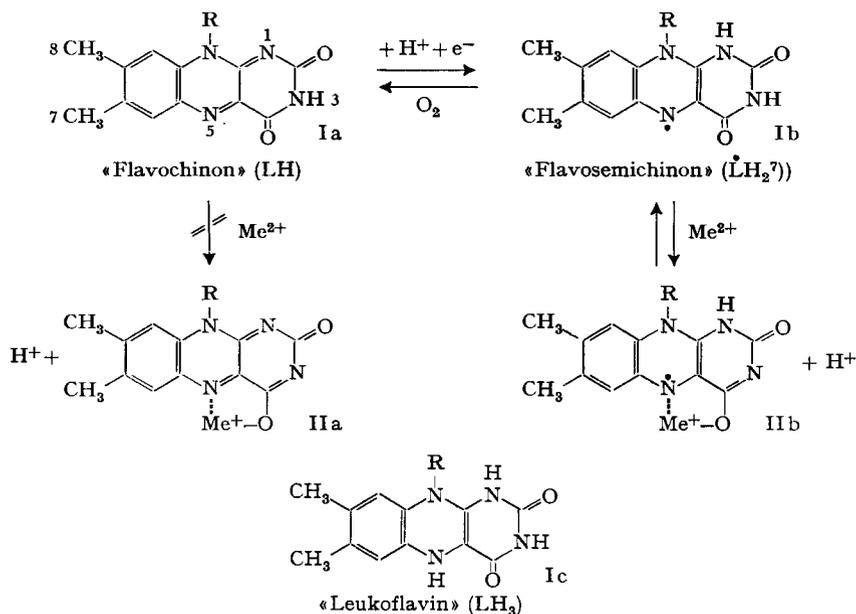
⁴⁾ A. ALBERT, *Biochem. J.* 47, xxvii (1950); T. R. HARKINS & H. FREISER, *J. phys. Chemistry* 63, 309 (1959).

⁵⁾ I. F. BAARDA & D. F. METZLER, *Biochim. biophysica Acta*, im Druck.

⁶⁾ P. BAMBERG, P. HEMMERICH & H. ERLLENMEYER, *Helv.* 43, 395 (1960).

tropen Arbeitsaufwand für die Iminolisierung in 3,4-Stellung des azachinoiden Systems als Hauptursache zurückführen.

Umso schwerer zu verstehen war die Existenz der stabilen roten Isoalloxazin-Ag-Komplexe, welche schon in den klassischen Arbeiten RICHARD KUHN's⁸⁾ zur Isolierung von natürlichen Flavinen Verwendung fanden. Diese «anormalen» Metallkomplexe des Isoalloxazins haben seither – mit Ausnahme einer Erwähnung durch



WEBER⁹⁾ – keine weitere Beachtung gefunden. Zur Erklärung der spezifischen Ag-Affinität des Flavochinons erschien daher eine eingehende Studie wünschenswert, durch welche Spektren und Bindungsverhältnisse vor dem biochemischen Hintergrund der Flavoenzym-Metall-Wechselwirkung in Übereinstimmung mit den bisher bekannten Daten gedeutet werden könnten.

Zugleich und unabhängig von uns haben BAARDA & METZLER⁵⁾ dieses Problem in Angriff genommen. Die Ergebnisse der Arbeit dieser Autoren stimmen mit den unsrigen in allen wesentlichen Punkten überein. Wir gehen daher im folgenden nur auf den Teil unserer Resultate näher ein, welcher den Rahmen der Studie dieser Autoren überschreitet.

Wir haben zunächst die Spektren vom protonisierten Flavosemichinon LH_3^+ (vgl. auch¹⁰⁾, KUHN'sches «Rhodoriboflavin»¹¹⁾ und vom Flavosemichinon-Chelat $LH-Me^{2+}$ des valenzstabilen Ions Ni^{2+} (vgl. II b)¹²⁾, sowie das Riboflavin-Ag-Spektrum auf-

7) \dot{L} soll die Radikalform des Liganden andeuten.

8) R. KUHN, T. GYÖRGY & T. WAGNER-JAUREGG, Ber. deutsch. chem. Ges. 66, 576 (1933).

9) G. WEBER, Biochem. J. 47, 114 (1950).

10) H. BELNERT, J. Amer. chem. Soc. 78, 5323 (1956).

11) R. KUHN & R. STRÖBELE, Ber. deutsch. chem. Ges. 70, 753 (1937).

12) P. HEMMERICH, Experientia 16, 534 (1960).

genommen. Aus Fig. 1 ist ersichtlich, dass in allen diesen Fällen die energieärmste Absorptionsbande bei 490–500 m μ liegt, was eine bathochrome Verschiebung von 50 m μ gegenüber dem Flavochinon-Spektrum bedeutet. Die Vermutung war daher naheliegend, es müssten nicht nur $\dot{L}H_3^+$ und $\dot{L}H^-Me^{2+}$, sondern auch $AgLH^+$ untereinander isoelektronisch sein, also $AgLH^+ \leftarrow \dot{L}H^-Ag^{2+}$.

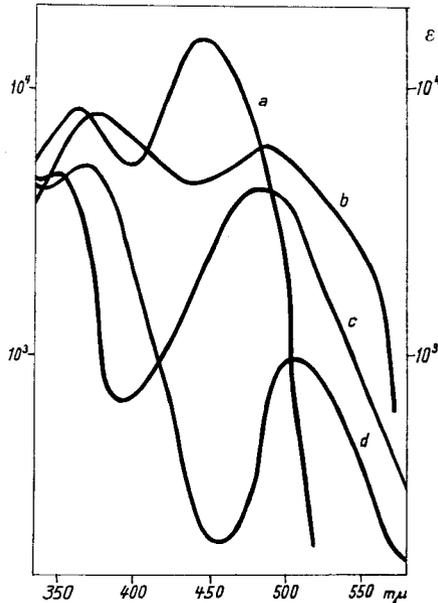
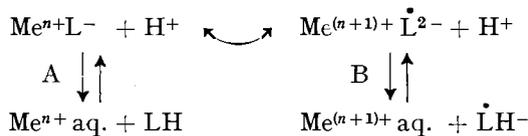


Fig. 1. Elektronenspektren

- a) Riboflavin in 90-proz. Äthanol, pH ca. 8.
- b) Riboflavin-Ag-1:1-Komplex unter gleichen Bedingungen. Ausbildungsgrad 100%.
- c) «Rhodoriboflavin» ($\dot{L}H_3^+$) in 90-proz. HCOOH aq., 0,01 N an SnCl₂ (Redoxpuffer). Übereinstimmend mit BEINERT¹⁰), Kurve 2, Fig. 6.
- d) Riboflavosemichinon-Ni²⁺-Komplex, $\dot{L}H^-Me^{2+}$, in 1:1-äthanolisch-wässrigem Veronalpuffer, pH 7,4. – Der Komplex ist unter diesen Bedingungen nicht vollständig ausgebildet und steht mit LH und LH₃ im Gleichgewicht. Der LH-Anteil ($\lambda_{max} = 445\text{ m}\mu$) wurde abgezogen.

Die bathochrome Verschiebung des Flavochinon-Spektrums durch Metallionen ist – wie wir fanden – nicht auf Ag⁺ beschränkt, vielmehr charakteristisch für d¹⁰-Ionen mit geringem Energieunterschied zwischen d⁹s- und d¹⁰-Term. Sie findet sich demgemäss beim Cu⁺ 5), beim Ag⁺ und beim Hg²⁺. Hierauf kommen wir später zurück.

Im Komplex mit Isoalloxazin kann für alle diese Ionen eine Valenzmesomerie in Rechnung gestellt werden in Anbetracht der Akzeptor-Eigenschaften des chinoiden Liganden LH, woraus zwei Dissoziations-Gleichgewichte A, B abzuleiten sind, von welchen A in der Chinonstufe, B in der Semichinonstufe $\dot{L}H_2$ liegt:



Die Dissoziation gemäss A spielt im Falle $Me^{n+} = Cu^+$ wegen der Unbeständigkeit des hydratisierten Cu^+ -Ions keine Rolle, wohl aber die Dissoziation B, durch welche autoxydables $\dot{L}H^-$ -Radikalanion freigesetzt und damit die Unbeständigkeit des CuL gegen O_2 herbeigeführt wird.

Wegen der Unbeständigkeit der hydratisierten Ag^{2+} - und Hg^{3+} -Ionen spielt umgekehrt in diesen Fällen die Dissoziation gemäss B keine Rolle. Die Systeme sind daher an der Luft stabil.

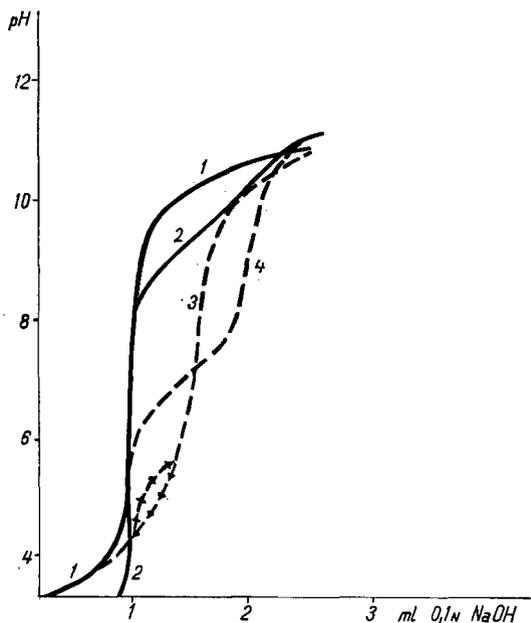


Fig. 2. BJERRUM Titrationsen, $t = 20^\circ$

1. Titration von 150 ml $6,67 \cdot 10^{-4}M$ Riboflavin in 50-proz. Äthanol aq., 0,1N an $NaClO_4$.
2. Titration von 20 ml $5 \cdot 10^{-3}M$ Succinimid in H_2O , 0,1N an $NaClO_4$.
3. Wie 1., in Gegenwart von $\frac{1}{2}$ Äquivalent $AgNO_3$.
4. Wie 2., in Gegenwart von $\frac{1}{2}$ Äquivalent $AgNO_3$.

Die Pfeile deuten die Titrationsrichtung an.

Zur weiteren koordinationschemischen Strukturanalyse der «anormalen» Komplexe MeL eignet sich der Ag -Komplex am besten, da der Cu^+ -Komplex, wie erwähnt, autoxydabel und der Hg^{2+} -Komplex infolge der hohen Acidität des hydratisierten Hg^{2+} -Ions nur unterhalb pH 3 nachweisbar ist.

pH-metrisch findet man bei $pH \geq 4$ beim System Riboflavin- Ag^+ die Ausbildung eines «Acido-Komplexes» nach Gleichung (1).



Die Hysteresis der in Fig. 2 wiedergegebenen BJERRUM-Kurve zeigt, dass dieser Komplex sich langsam autassoziert. In verschiedensten Lösungsmitteln (Fig. 2, Tab. 1) fanden wir unterhalb pH 9 fast ausschliesslich 1:1-Komplex, dessen Stabilität offenbar mit dem Assoziationsgrad anwächst. Es treten jedoch keine Niederschläge

auf bei Einhaltung genügend kleiner Konzentrationen – im besten Lösungsmittel (Dimethylsulfoxid-Wasser 1:1) bis hinauf zu Flavin-Konzentrationen von $5 \cdot 10^{-3} M$. Der störende Assoziations-Effekt, welcher mit Farbtintensivierung und Viskositäts-erhöhung einhergeht, wird bei Temperaturen über 50° vernachlässigbar klein. Der Einfluss dieses Effekts lässt sich am Beispiel des Tetra-O-acetyl-riboflavins (III) abschätzen, dessen BJERRUM-Kurve schon bei Raumtemperatur keine Hysteresis mehr zeigt: Der resultierende AgL-Komplex ist um ca. 1,5 Zehnerpotenzen weniger stabil

Tab. 1. Beständigkeitskonstanten der Ag-Komplexe von Flavinen und Modellverbindungen

Verbindung	Nr.	Ligand- Typ	Lösungsmittel*)	Me- thode	t	pK _a	log K ₁ **)	log K ₂
Riboflavin	I	L ⁻	H ₂ O	pot.	20°	10,0	8,0	
Riboflavin	I	L ⁻	H ₂ O	spektr.	20°	10,0	8,0	
Riboflavin	I	L ⁻	H ₂ O	pot.	60°	8,9	6,2	
Riboflavin	I	L ⁻	H ₂ O	spektr.	60°	8,9	5,7	
Riboflavin	I	L ⁻	C ₂ H ₅ OH/H ₂ O 1:1	pot.	20°	10,4	8,5	4,2
Riboflavin	I	L ⁻	C ₂ H ₅ OH/H ₂ O 1:1	spektr.	20°	10,4	8,4	
Riboflavin	I	L ⁻	C ₂ H ₅ OH/H ₂ O 1:1	pot.	60°	9,4	6,7	
Riboflavin	I	L ⁻	(CH ₃) ₂ SO/H ₂ O 3:2	pot.	20°	11,2	8,6	
Riboflavin	I	L ⁻	(CH ₃) ₂ SO/H ₂ O 3:2	pot.	60°	10,3	7,3	
Riboflavin	I	LH	0,1 N HClO ₄	spektr.	20°		1,3 §)	—
3-Methylumiflavin	VIII	LH	H ₂ O	spektr.	20°		1,3 §)	—
Tetraacetylriboflavin	III	L ⁻	C ₂ H ₅ OH/H ₂ O 1:1	pot.	20°	10,2	6,3	3,7
Tetraacetylriboflavin	III	L ⁻	C ₂ H ₅ OH/H ₂ O 1:1	spektr.	20°	10,2	6,6	
Peracetyl-leukoribo- flavin	VII	L ⁻	C ₂ H ₅ OH/H ₂ O 1:1	pot.	20°	5,2	—	—
Uracil	IV	L ⁻	H ₂ O	pot.	20°	9,3	4,6	3,8
Succinimid	V	L ⁻	H ₂ O	pot.	20°	9,6	5,2	4,4
Hydantoin	VI	L ⁻	H ₂ O	pot.	20°	9,0	4,9	4,0

*) Alle Lösungen 0,1 N an NaClO₄

**)

$$\frac{1}{K_i} = \frac{[L^-]_i [Ag^+]}{[AgL_i]} \quad i = 1, 2 \quad \S) \quad \frac{1}{K} = \frac{[LH] [Ag^+]}{[AgLH^+]}$$

als der des Riboflavins (vgl. Tab. 1). Die Assoziationstendenz findet sich auch beim Lumiflavin-Ag und dürfte somit auf einem Zusammenwirken von «Self-charge-transfer»-Tendenz des heteroaromatischen Systems und H-Brückenverknüpfung in der Seitenkette beruhen¹³⁾.

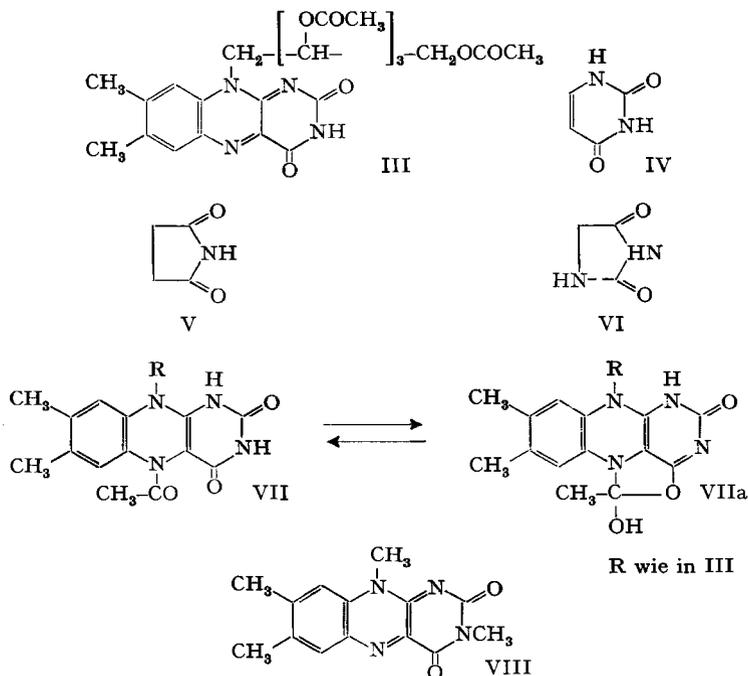
Auch nach Abstrich des Assoziationseffekts liegt die Stabilität der Acidokomplexe AgL immer noch mehr als eine Zehnerpotenz über derjenigen vergleichbarer –CO–NH–CO–Liganden, als welche wir Uracil (IV), Succinimid (V), Hydantoin (VI) sowie Pentaacetyl-leukoriboflavin (VII) herangezogen haben (vgl. Tabelle 1). Auch zeigt keiner dieser Liganden die hohe Stabilitätsdifferenz zwischen dem 1:1- und dem 2:1-Komplex, welche sich bei den Isoalloxazinen auf mindestens 2, maximal 4 Zehnerpotenzen beläuft.

Bezeichnend ist die bei VII gänzlich fehlende Ag-Affinität und das für ein cyclisches Imid abnorm hohe pK von 5,2. Diese Befunde dürfen als weiterer Beweis dafür

¹³⁾ Vgl. H. A. STAAB, Einführung in die theoretische organische Chemie, Weinheim 1959, p. 388f.

angesehen werden, dass Acetyl-leukoflavin-Anion nicht als dissoziiertes Imid, sondern gänzlich in der ψ -Form VIIa¹⁴⁾ vorliegt.

Der pH-metrisch erfassbaren «Acido-Komplexbildung» nach Gleichung (1) geht in saurem Milieu eine schwächere Ag-Flavin-Wechselwirkung gemäss Gleichung (2)



voraus, die sich in einer geringfügigen Verschiebung der energieärmsten Riboflavin-Bande von 445 auf 450 $m\mu$ zu erkennen gibt.



Dieser spektrale Effekt entspricht in Qualität und Grössenordnung den «Ladungs-Transfer»-Effekten zwischen Riboflavin und heteroaromatischen Donor-Partikeln wie Tryptophan, Adenin und Caffein¹⁵⁾. Das Maximum der Differenzspektren von Riboflavin in Gegenwart von überschüssigem Ag^+ gegen Riboflavin allein bei pH 1 ist 494 $m\mu$, dasselbe für Hg^{2+} 498 $m\mu$. Wir vergleichen diese Spektren in Fig. 3 mit dem Differenzspektrum von Riboflavin und Adenosin, $\lambda_{max} = 486 m\mu$ ¹⁶⁾ (vgl. auch ^{9) 17)}). BENESI-HILDEBRAND-Diagramme^{18) 19)} (Fig. 4) ergeben bei 494 $m\mu$ ein $\text{pK}_{\text{AgLH}}^+$

¹⁴⁾ P. HEMMERICH, B. PRIJS & H. ERLNMEYER, *Helv.* **43**, 372 (1960).

¹⁵⁾ H. A. HARBURY und Mitarb., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **44**, 662 (1958); **46**, 1708 (1960); I. ISENBERG & A. SZENT-GYÖRGY, *ibid.* **44**, 857 (1958).

¹⁶⁾ H. BRINTZINGER, *Diss.* Basel 1960.

¹⁷⁾ L. G. WHITBY, *Biochem. J.* **54**, 437 (1953).

¹⁸⁾ J. A. A. KETELAAR, C. VAN DE STOLPE, A. GOUDSMIT & W. DZCUBAS, *Rec. Trav. chim. Pays-Bas* **71**, 1104 (1952).

¹⁹⁾ H. A. BENESI & J. A. HILDEBRAND, *J. Amer. chem. Soc.* **71**, 2703 (1949).

²⁰⁾ R. S. MULLIKEN, *Rec. Trav. chim. Pays-Bas* **75**, 845 (1956).

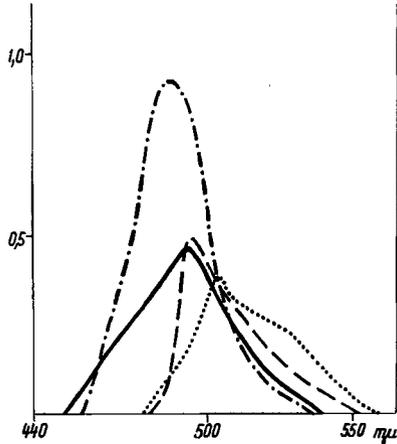


Fig. 3. Differenzspektren von 10^{-4} M Flavin-Lösungen mit und ohne Ag^+ , relative Maximalextinktionen nach BENESI-HILDEBRAND^{18) 19)} für vollständige Komplexbildung extrapoliert (vgl. Fig. 4)

- Riboflavin, pH 1.
- - - - 3-Methylumiflavin, pH 5,5.
- · · · · Riboflavin, Hg^{2+} anstelle von Ag^+ , pH 1.
- · - · - Riboflavin, Adenosin anstelle von Ag^+ ¹⁸⁾, pH 5,5.

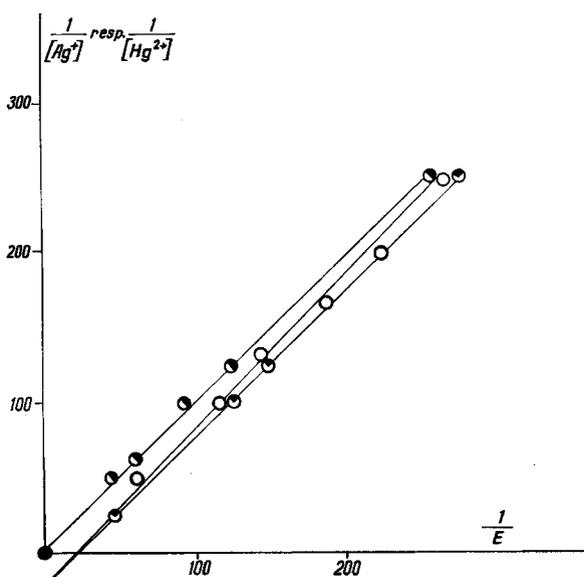


Fig. 4. BENESI-HILDEBRAND-Diagramme^{18) 19)} für 10^{-4} M Flavin-Lösungen in Gegenwart steigender $[Ag^+]$ resp. $[Hg^{2+}]$

Der Abszissenabschnitt liefert die molare Differenzextinktion des voll ausgebildeten Komplexes, der Ordinatenabschnitt die Komplex-Beständigkeitskonstante.

- Riboflavin- Ag^+ , pH 1.
- 3-Methylumiflavin- Ag^+ , pH 5,5.
- Riboflavin- Hg^{2+} , pH 1.

von 1,3, wodurch das Vorliegen eines diskreten Ion-Dipol-Komplexes mit Ladungs-Transfer-Eigenschaften bewiesen ist. Verhindert man die Dissoziation des Flavin-Liganden LH durch Methylierung in 3-Stellung, so bleibt für $(\text{AgLCH}_3)^+$ pK 1,3 (vgl. Tab. 1) auch in neutralem Milieu erhalten, so z. B. beim 3-Methylumiflavin (VIII), Fig. 3.

Der Riboflavin- Hg^{2+} -Wechselwirkung, die bei pH 1 ein Differenzmaximum von $498 \text{ m}\mu$ ergibt, liegt hingegen kein stabiles Assoziat zugrunde, da die BENESIHILDEBRAND-Gerade durch den Nullpunkt verläuft (Fig. 4). Es handelt sich hier, der MULLIKEN²⁰) eingeführten Terminologie zufolge, um einen «Kontakt-Ladungs-Transfer».

Gibt man zu einer gesättigten, wässrigen Riboflavin-Lösung Ag^+ im Molverhältnis 1:2, so erhält man bei Einhaltung eines pH von 9–10 nicht den roten, löslichen AgL-Komplex, sondern einen orangegelben Niederschlag, welchem auf Grund von Verbrennungsanalyse, potentiometrischer Ag-Bestimmung und spektrophotometrischer Riboflavin-Abschätzung die Zusammensetzung $(\text{AgL}_2)\text{Na}$ zukommt. Dieser Komplex ist ohne Zersetzung nur in Dimethylsulfoxid löslich und zeigt darin dieselben spektralen Eigenschaften wie freies Riboflavin (Fig. 5). Zwischen dem «anomal stabilen» 1:1-Komplex AgL und diesem erst bei $\text{pH} \geq 9$ beständigen 1:2-Komplex müssen daher grundlegende strukturelle Unterschiede bestehen.

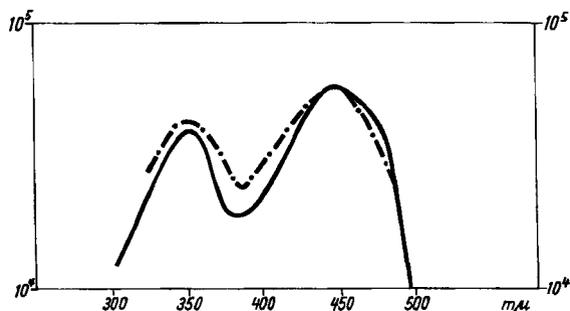


Fig. 5. Elektronenspektren von Riboflavin-Ag-2:1-Komplex (—) und freiem Riboflavin (----) in Dimethylsulfoxid unter Zusatz von 0,01 N Triäthylamin

Auf Grund dieser Ergebnisse müssen die roten Silber-Isoalloxazine als Valenzmesomere gedeutet werden, in welchen das Metall über eine «normale» $(\text{Ag}_{4s} \leftarrow \text{N})_{\sigma}$ Akzeptorbindung sowie eine zusätzliche $(\text{Ag}_{3d} \rightarrow \text{N})_{\pi}$ -Donorbindung am Liganden haftet, wodurch ein Ag_{3d} -Elektron am π -Elektronensystem des Liganden anteilig wird. Dieser gekoppelte Donor-Akzeptor-Effekt ist für Ag^+ und Cu^+ schon von DEWAR²¹) zur Erklärung der Stabilitätsverhältnisse bei Metall-Olefin- π -Komplexen postuliert worden. Bemerkenswert ist, dass auch in diesen Fällen, so z. B. beim Äthylen-Silber, in wässriger Lösung 1:1-Komplexe bevorzugt sind²²).

Die Ag-Isoalloxazine sind unseres Wissens die ersten bekannten Komplexe des Silbers, denen sich – in Bestätigung der DEWAR'schen Theorie – ein d_{π} -Ladungs-Transfer-Spektrum zuordnen lässt.

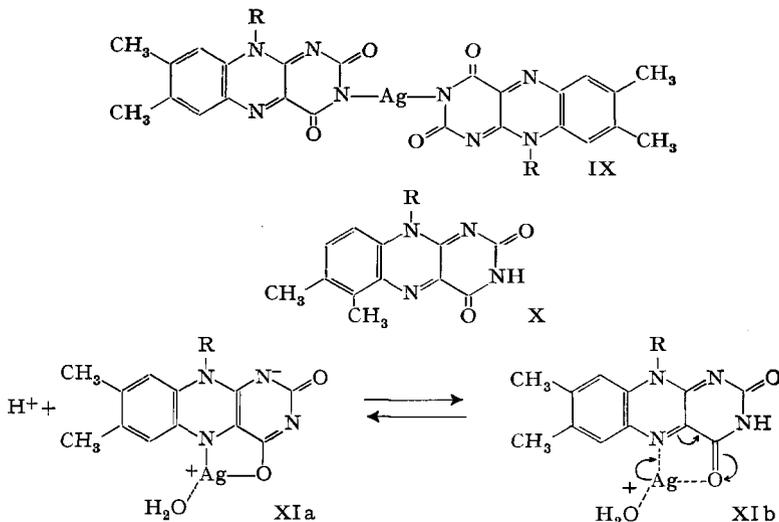
Es erhebt sich nun die Frage, an welchem Ligand-N des Isoalloxazins das Ag-Ion haftet: N(3) scheidet für die roten 1:1-Komplexe aus, da N(3) keine Akzeptorfunktion haben kann: Wie schon erwähnt (vgl. auch ⁶)), sind die freien Elektronen

des Flavochinon-N(3) nur wenig an der Molekelresonanz beteiligt. Der 2:1-Komplex (AgL₂)Na hingegen, in welchem das Isoalloxazin-Spektrum unverändert ist, muss als N(3)-Ag-N(3)-Komplex IX formuliert werden.

Beim Übergang $2 >NH \rightarrow >N-Ag-N <$ ändern sich die UV.-Ligand-Spektren nicht wesentlich, wie wir am Modell des Uracils (IV) nachprüften.

N(1) ist für die Ag-Koordination aus sterischen Gründen ebenfalls ausser Betracht zu lassen, da die periständige, voluminöse Seitenkette im Riboflavin die Assoziation von Partikeln von grösserer Raumerfüllung als H⁺ unwahrscheinlich macht.

Den direkten Beweis für den Angriff von Ag⁺ am verbleibenden N(5) des Isoalloxazin-Systems liefert die Beobachtung von BAARDA & METZLER⁵⁾, dass Isoriboflavin (X, R = Ribityl) keine roten Ag-Komplexe ausbildet. Da die Flavine ihren Isologen X elektronisch völlig gleichwertig sind, muss der Unterschied einer sterischen Hemmung



der Ag-Koordination am N(5) durch die nunmehr 6ständige Methylgruppe zuzuschreiben sein. Wir fanden dies beim Isolumiflavin (X, R = CH₃) bestätigt.

Die Annahme von 4,5-Chelatstrukturen XIa, b für AgL und AgLH⁺, wobei XIa für Me²⁺ = Ag²⁺ identisch ist mit XIb, ist damit zwingend.

Aus dem bisher Gesagten lassen sich nun alle weiteren Eigenschaften von AgL ableiten:

1. Die anomale Stabilität des 1:1-Komplexes: Trigonale Koordination ist für Ag-Komplexe mit d_π-elektrophilen Liganden (Arsine, Phosphine) als bevorzugte räumliche Form bekannt²³⁾. Ein trigonales 4,5-Chelat XI erlaubt spannungsfreie Koordination einer kleinen Solvatmolekel in der dritten Koordinationsstelle, jedoch keine weitere Anlagerung eines voluminösen Isoalloxazin-Liganden.

2. Die für das Chelat AgL (XI) vorauszusetzende, im Flavochinon (Ia \rightleftharpoons IIa) erschwerte 3,4-Prototropie wird durch die Hereingabe des Ag_d-Elektrons in das

²¹⁾ M. J. S. DEWAR, Bull. Soc. chim. France 1951, doc. C 71.

²²⁾ P. BRANDT, Acta chem. scand. 13, 1639 (1959).

²³⁾ S. AHRLAND und Mitarb., J. chem. Soc. 1958, 276.

Isoalloxazin-System ermöglicht. Es liegt nunmehr ein Oxinat-analoger Flavosemichinon- Ag^{2+} -Komplex vor (XIa \equiv IIb).

3. Die Ausnahmestellung der Ionen Ag^+ , Cu^+ und Hg^{2+} fügt sich zwanglos den Vorstellungen ORGEL's²⁴⁾ über die Bedeutung der *d*,*s*-Hybridisierung ein, welche diesen Ionen auf Grund der geringen Aufspaltung zwischen ihren $d^{10}s^0$ - und d^9s^1 -Termen eigen ist.

Während beim Übergang vom protonisierten Semichinon $\dot{\text{L}}\text{H}_3^+$ (λ_{max} 486 $m\mu$) zum freien Semichinon $\dot{\text{L}}\text{H}_2$ (λ_{max} 565 $m\mu$)¹⁹⁾ eine Verschiebung von 77 $m\mu$ eintritt, erhält man beim Übergang $\text{Ag}^{2+}\dot{\text{L}}\text{H}^- \rightarrow \text{Ag}^{2+}\dot{\text{L}}^{2-}$ keine Bathochromie, da im ersteren Fall N(5)H, im zweiten N(3)H dissoziiert, letzteres ohne Einfluss auf den Chromophor.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind ein weiterer Beweis für die von uns¹²⁾ aufgezeigte Tatsache, dass von den drei Redoxstufen des Isoalloxazins (Ia, b, c) nur die semichinoide (Ib) ausgeprägte Metallionenaffinität besitzt. Diese Modellstudien bestärken damit die Hypothese von MAHLER & GREEN²⁵⁾, derzufolge nicht an Hämin gebundene Metallionen im Flavin-Bereich der Atmungskette als Regulativ zwischen Hydrid-Übertragung (DPNH \rightarrow Flavin) und Radikal-Oxydoreduktion (Flavin \rightarrow Cytochrom-Fe) benötigt werden.

Ferner wird ersichtlich, dass das Flavochinon-System Ia im Ladungs-Transfer-Zustand chemische Eigenschaften des Leukoflavins Ic annehmen kann. Wenn – was anzunehmen ist – die «aktiven Komplexe» der metallfreien Flavoenzyme mit ihren Substraten sich im Ladungs-Transfer-Zustand befinden, ist dieser Umstand auch für den Mechanismus des Flavin-gekoppelten Anteils der oxydativen Phosphorylierung²⁶⁾ in Rechnung zu stellen.

Flavin-Metall- und Flavin-Substrat-Ladungstransfer sind äusserst schnell ablaufende, vermutlich gekoppelte Prozesse, welchen offenbar eine Schlüsselstellung bei der Umwandlung kovalenter Bindungsenergie in bioelektrische Energie zukommt. Weitere Modellstudien sollen ein tieferes Eindringen in die damit umrissene Problematik ermöglichen.

Experimentelles. – Lumiflavin (I, R = CH_3)²⁷⁾, Isolumiflavin (X, R = CH_3)²⁸⁾, 3-Methyl-lumiflavin (VIII)¹⁴⁾, Tetra-O-acetylriboflavin (III)¹⁴⁾ und Pentaacetyl-leukoriboflavin (VII)¹⁴⁾ waren nach früher von uns gegebenen Vorschriften hergestellt. Riboflavin (Ia, R = Ribityl) war ein papierchromatographisch und optisch¹⁷⁾ reines Präparat der FLUKA A.G., Buchs.

Die potentiometrischen Titrations wurden mit Glaselektrode und einem Instrument Typ E 187 der Firma METROHM, Herisau ausgeführt, die spektrophotometrischen Messungen mit einem Gerät Unicam SP 500.

Die Aciditätskonstanten wurden aus den Titrations-Halbwerten ermittelt und stimmen befriedigend mit den von BAARDA & METZLER⁶⁾ gefundenen Werten überein.

Komplexbeständigkeitskonstanten wurden *pH-metrisch* nach BJERRUM²⁹⁾ durch Auswertung der Bildungsfunktion \bar{n} , *spektrophotometrisch* im Bereich geringen Ausbildungsgrades nach der KETELAAR-Modifikation¹⁸⁾ der graphischen Methode von BENESI-HILDEBRAND¹⁹⁾ ermittelt. Die meist befriedigende Übereinstimmung der nach diesen beiden völlig unabhängigen Methoden ermittelten Komplexstabilitätskonstanten diente uns als Fehlerkriterium (vgl. Tab. 1).

²⁴⁾ J. E. ORGEL, Introduction to Ligand Field Theory, London und New York 1960, p. 66f.

²⁵⁾ H. R. MAHLER & D. E. GREEN, Science 120, 7 (1954).

²⁶⁾ Vgl. z. B. P. E. GLAHN & S. O. NIELSEN, Nature 183, 1578 (1959).

²⁷⁾ P. HEMMERICH, S. FALLAB & H. ERLIENMEYER, Helv. 39, 1242 (1956).

²⁸⁾ P. HEMMERICH, Helv. 41, 540 (1958).

²⁹⁾ J. BJERRUM, Metal Ammine Formation in aqueous Solution, Kopenhagen 1941.

Für diese Untersuchung standen Mittel des SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG zur Verfügung, für die wir auch an dieser Stelle herzlich danken möchten.

Herrn Prof. Dr. E. METZLER, Iowa State University, Ames, U.S.A., schulden wir Dank für die frühzeitige Überlassung seiner Resultate.

Wir danken weiter den Herren Prof. Dr. H. ERLLENMEYER und Dr. H. BRINTZINGER für fruchtbare Anregungen und Diskussionen.

SUMMARY

The strong bathochromic shift of the flavin spectra occurring by interaction with Ag^+ can also be obtained with Cu^+ and Hg^{2+} , but not with any other metal ions. Two kinds of metal-isoalloxazin-interaction must be discerned, a loose one with the free ligand and a very strong one with the ligand anion. 1:1-Complexes are preferably built up, which are shown to be trigonal chelates of oxinate type and whose colour is due to electron transfer from Ag^+ to flavoquinone giving rise to a Ag^{2+} -flavosemiquinone mesomeric state responsible for the specific chelating qualities.

The consequences of these results as relying upon metal interaction, charge-transfer and oxydative phosphorylation in flavoenzymes are outlined.

Institut für anorganische Chemie der Universität Basel.

120. Sekundäre Wasserstoff-Isotopeneffekte bei der Nitrierung von Toluol

von H. Suhr¹⁾ und Hch. Zollinger

(12. IV. 61)

Die Ursachen der primären kinetischen Isotopeneffekte sind durch die Arbeiten von BIGELEISEN u. a.²⁾ weitgehend aufgeklärt worden. Über die sogenannten *sekundären Isotopeneffekte*, bei denen in den geschwindigkeitsbestimmenden Schritten einer Reaktion die Bindung zu isotonen Atomen der beteiligten Molekeln nicht gelöst wird, werden zur Zeit noch verschiedene Grundlagen diskutiert. Die vorliegende Arbeit bezweckt einerseits, das Auftreten sekundärer Isotopeneffekte bei einer elektrophilen aromatischen Substitution zu prüfen, andererseits einen experimentellen Beitrag zur Erkennung ihrer Ursachen zu geben.

Die sekundären Isotopeneffekte wurden von LEWIS³⁾ und SHINER⁴⁾ bei nukleophilen aliphatischen Substitutionen gefunden. Sie haben festgestellt, dass z. B. Alkylbromide, welche in β -Stellung durch Deuterium substituiert sind, ihr Bromatom langsamer solvolytisch austauschen als die Grundverbindung (Protium am β -Kohlenstoff).

¹⁾ Neue Adresse: Chemisches Institut der Universität Tübingen, Deutschland.

²⁾ Vgl. J. BIGELEISEN & M. WOLFSBERG, *Advances in Chemical Physics* 7, 15 (1958); L. MELANDER, *Isotope Effects of Reaction Rates*, New York 1960.

³⁾ E. S. LEWIS & C. E. BOOZER, *J. Amer. chem. Soc.* 74, 6306 (1952); 76, 791, 794 (1954).

⁴⁾ V. S. SHINER, *J. Amer. chem. Soc.* 75, 2925 (1953); 76, 1603 (1954), und folgende Arbeiten.