

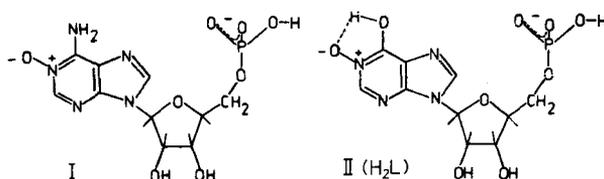
164. Inosin-N(1)-oxid-Nucleotide als Komplexbildner

III. Komplexchemische Untersuchungen von Inosin-N(1)-oxid und von dessen 5'-Monophosphat

von Helmut Sigel

(10. VII. 65)

1. Einleitung. – Desaminiert man Adenosin-5'-monophosphat-N(1)-oxid (I) [1], so erhält man Inosin-5'-monophosphat-N(1)-oxid (H_2L) (II), ein ebenfalls «ambivalentes» Ligandensystem [2], das sich von I jedoch durch die niedrigere Basizität der heterocyclischen Koordinationsstelle unterscheidet.



Der Phosphat-Gruppe im Adenosin-5'-monophosphat-N(1)-oxid (I) entspricht ein $pK_A = 6,13^{1)}$; für die Abspaltung eines Protons von der *o*-Amino-N-oxid-Gruppe findet man $pK_{A'} = 12,49$ [2]; die beiden Koordinationsstellen unterscheiden sich also sehr stark in ihrer Basizität. Hier vermag nur Cu^{2+} die $NH_2(6)$ -Gruppe genügend zu acidifizieren und im gesamten pH-Bereich gegen die Konkurrenz des Protons Cu^{2+} -*o*-Amino-N-oxid-Komplexe auszubilden; alle anderen untersuchten Metall-Ionen treten erst bei höheren pH-Werten von der Phosphat- an die *o*-Amino-N-oxid-Gruppe über.

Für Inosin-5'-monophosphat-N(1)-oxid (II) ergab sich die Aciditätskonstante der *o*-Hydroxy-N-oxid-Gruppe zu $pK_{H_2L}^H = 5,43$, die der Phosphat-Gruppe zu $pK_{HL}^H = 6,31^{2)}$ [3]. Dieses Ligandensystem weist also im Gegensatz zum vorhergehenden zwei Koordinationsstellen vergleichbarer Basizität auf, so dass auch für weniger stark acidifizierende Metall-Ionen eine messbare «Verteilung» auf beide Haftstellen zu erwarten ist³⁾. Zum Vergleich wurde auch das entsprechende, als einzähniger Ligand wirkende Nucleosid – Inosin-N(1)-oxid (HL') – komplexchemisch untersucht⁴⁾.

2. Ergebnisse. – Die starke Extinktionszunahme des Absorptionsminimums bei 226 nm, durch die sich die Abspaltung eines Protons⁵⁾ von der *o*-Hydroxy-N-oxid-Gruppierung sowohl beim Inosin-N(1)-oxid als auch bei dessen 5'-Monophosphat (II)

1) Adenosin-5'-monophosphat: $pK_A = 6,14$ [2].

2) Diese beiden Werte wurden potentiometrisch bestimmt; die spektrophotometrische Bestimmung von $pK_{H_2L}^H$ ergab 5,53 [3].

3) Die gleichzeitige Koordination eines Metall-Ions an die Phosphat- und die *o*-Hydroxy-N-oxid-Gruppierung ist hier ebenso wie im Adenosin-5'-monophosphat-N(1)-oxid (I) sterisch unmöglich (Kalottenmodell).

4) Die Aciditätskonstante wurde spektrophotometrisch bestimmt: $pK_{HL'}^H = 5,40$ [3].

5) Vgl. bei [3], Fig. 2.

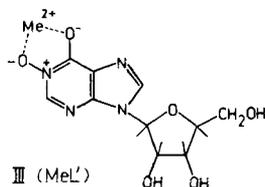
bemerkbar macht, findet in Gegenwart der untersuchten Metall-Ionen bereits bei tieferen pH-Werten statt (vgl. Fig. 2a). Das Metall-Ion verdrängt offenbar durch Ausbildung von *o*-Hydroxy-N-oxid-Komplexen das Proton der OH(6)-Gruppe. Aus der Zunahme der 226-nm-Absorption bei bestimmtem pH⁶⁾ und bestimmter Metallionen-Konzentration wurden die Komplexstabilitätskonstanten (s. Tabelle) bestimmt.

Komplexstabilitätskonstanten ($\log K_{\text{MeL}'}^{\text{Me}}$, und $\log K_{\text{MeHL}}^{\text{Me}}$) *verschiedener zweiwertiger Kationen für Inosin-N(1)-oxid (L') bzw. Inosin-5'-monophosphat-N(1)-oxid (H₂L) (I = 0,1; t = 25°), sowie zum Vergleich die Stabilitätskonstanten* ($\log K_{\text{MeL}'}^{\text{Me}}$) *für Adenosin-5'-monophosphat (HL*) [2]*

Me ²⁺	$\log K_{\text{MeL}'}^{\text{Me}}$	$\log K_{\text{MeHL}}^{\text{Me}}$ ^{a)}	$\log K_{\text{MeL}'}^{\text{Me}}$	$\log K_1$ ⁷⁾
Mn ²⁺	2,54 ± 0,20	2,85 ± 0,09	2,14	0,7
Co ²⁺	3,46 ± 0,05	3,73 ± 0,05	2,19	1,5
Ni ²⁺	3,50 ± 0,05	3,90 ± 0,05	2,62	1,3
Cu ²⁺	5,27 ± 0,05	5,46 ± 0,09	3,04	2,4
Zn ²⁺	3,60 ± 0,05	3,83 ± 0,05	2,23	1,6
Mg ²⁺	1,7 ± 0,2	2,1 ± 0,2	1,63	0,5
Ca ²⁺	1,5 ± 0,2	2,0 ± 0,2	1,39	0,6
Ba ²⁺	1,2 ± 0,2	1,6 ± 0,2	1,14	0,5

a) Vgl. Abschnitt 3.1

3. Diskussion. – 3.1. *Struktur und Protonierungsgrad der Inosin-5'-monophosphat-N(1)-oxid-Komplexe:* Die zum Vergleich untersuchten Inosin-N(1)-oxid-Komplexe besitzen Struktur III; damit gilt für die Stabilitätskonstanten $K_{\text{MeL}'}^{\text{Me}} = [\text{MeL}'] /$

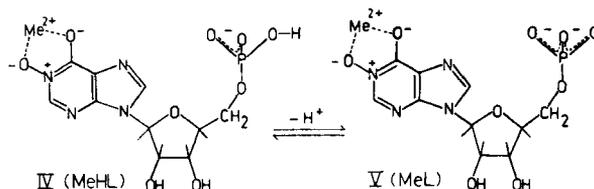


$[\text{Me}^{2+}] \cdot [\text{L}']$. Im Falle derjenigen Komplexe von Inosin-5'-monophosphat-N(1)-oxid (II), bei denen das Metall-Ion an die *o*-Hydroxy-N-oxid-Gruppe gebunden ist, stellt sich jedoch die Frage, ob die in der Tabelle angegebenen Stabilitätskonstanten für die protonierten oder die deprotonierten Komplexe gelten. Die Phosphat-Gruppe kann nämlich in diesen Komplexen je nach pH als $-\text{PO}_3\text{H}^-$ (IV) oder als $-\text{PO}_3^{2-}$ -Gruppe (V) vorliegen. Ausserdem ist abzuklären, ob Inosin-5'-monophosphat-N(1)-oxid (II)

⁶⁾ Der Protonierungsgrad der OH(6)-Gruppe bei den entsprechenden pH-Werten wurde im Falle von Inosin-5'-monophosphat-N(1)-oxid ebenfalls mit Hilfe der spektrophotometrisch bestimmten Aciditätskonstanten berechnet (vgl. ²⁾).

⁷⁾ Für den pH-Bereich > 8 , in dem der Ligand vollkommen deprotoniert vorliegt und die Konkurrenz mit dem Proton folglich wegfällt, lassen sich die Gleichgewichtskonstanten $K_1 = [\text{MeO} \cdots \text{PO}_3] / [\text{O} \cdots \text{PO}_3\text{Me}]$ für den intramolekularen Übergang eines Metall-Ions von der Phosphat- auf die *o*-Hydroxy-N-oxid-Gruppe abschätzen: $K_1 \cong K_{\text{MeHL}}^{\text{Me}} / K_{\text{MeL}'}^{\text{Me}}$ (vgl. ¹¹⁾). Die hier angegebenen Werte für $\log K_1$ sind so geschätzt worden.

neben den untersuchten *o*-Hydroxy-N-oxid-Komplexen bei unseren Messbedingungen auch Me^{2+} -Phosphat-Komplexe bildet, bzw. ob eventuell sogar Partikel Me_2L vorliegen, bei denen je ein Metall-Ion an die *o*-Hydroxy-N-oxid- und an die Phosphat-Gruppe gebunden wäre. Die Summe der Konzentrationen der Me^{2+} -Phosphat- und Me_2L -Komplexe kann mit Hilfe der Aciditäts- und Komplexstabilitäts-Konstanten



von Adenosin-5'-monophosphat (HL^*) ($K_{\text{MeL}^*}^{\text{Me}}$, vgl. [2] und Tab.; $\text{p}K_{\text{HL}^*}^{\text{H}} = 6,14$) nach folgender Gleichung abgeschätzt werden⁸⁾:

$$\frac{[\text{L}_{\text{tot}}^*]}{[\text{MeL}^*]} = 1 + \frac{1}{[\text{Me}^{2+}] \cdot K_{\text{MeL}^*}^{\text{Me}}} \cdot \left(1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_{\text{HL}^*}^{\text{H}}} \right).$$

Bei unseren Messbedingungen (vgl. exp. Teil) liegen bei den $3d$ -Elementen bis maximal 4% des Liganden – bezogen auf L_{tot} – als Phosphat-Komplexe vor, bei den Erdalkalien steigt deren Anteil bis auf ca. 7% (Ba^{2+}). Die angegebenen Prozentzahlen für die Summe der Konzentrationen der beiden Phosphat-Komplexe sind für Inosin-5'-monophosphat-N(1)-oxid eher zu gross, da die Komplexbildungstendenz der *o*-Hydroxy-N-oxid-Gruppe grösser ist als diejenige der Phosphat-Gruppe, so dass letztere bei den pH-Werten der Messlösungen kaum «zum Zuge» kommt (vgl. auch Fig. 1). In einem Komplex MeL mit *o*-Hydroxy-N-oxid-Koordination wird die Komplexbildungstendenz der Phosphat-Gruppe noch geringer sein, so dass die Ausbildung von Me_2L -Komplexen vernachlässigt werden kann.

Zur Frage, ob unter unseren Messbedingungen Komplexe der Zusammensetzung MeL oder MeHL vorliegen, lassen sich folgende Abschätzungen machen: Ebenso wie die Ausbildung von Komplexen mit *o*-Hydroxy-N-oxid-Koordination die Komplexbildungstendenz der Phosphat-Gruppe senkt, fördert sie auch deren Deprotonierung ($\text{IV} \rightleftharpoons \text{V}$) (vgl. auch [2]). Beim Cu^{2+} -Komplex von Inosin-5'-monophosphat-N(1)-oxid (II) ist eine ähnliche Acidifizierung der Phosphat-Gruppe zu erwarten wie beim Cu^{2+} -Komplex von Adenosin-5'-monophosphat-N(1)-oxid (I), nämlich um ca. 0,7 pK-Einheiten; bei den übrigen MeHL-Komplexen werden die Werte ähnlich bzw. kleiner sein. Hieraus lässt sich $\text{p}K_{\text{MeHL}}^{\text{H}}$ zu $\sim 6,31 - 0,7 \cong 5,6$ abschätzen. Bei den pH-Werten der Messlösungen⁹⁾ sind folgende Anteile an MeL-Komplexen zu erwarten¹⁰⁾:

⁸⁾ Die Verwendung der Konstanten von Adenosin-5'-monophosphat gibt sicherlich eine richtige Grössenordnung, da sich die Einführung der N-Oxid-Gruppe und der Austausch der $\text{NH}_2(6)$ -gegen eine OH-Gruppe auf die Aciditäts- und Komplexstabilitäts-Konstanten der $-\text{PO}_3\text{H}^-$ -Gruppe wohl kaum auswirkt (vgl. [2] [3]).

⁹⁾ pH 3,0 (Cu^{2+}); pH 4,0 (Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}); pH 4,8 (Mg^{2+} , Ca^{2+}); pH 5,5 (Ba^{2+}).

¹⁰⁾ Nimmt man an, dass $[\text{L}_{\text{tot}}] \cong [\text{MeHL}] + [\text{MeL}]$ ist, so erhält man aus $[\text{L}_{\text{tot}}]/[\text{MeL}] = 1 + [\text{H}^+]/K_{\text{MeHL}}^{\text{H}}$, und unter Verwendung der pH-Werte der Messlösungen⁹⁾ die maximal möglichen Prozente des deprotonierten Komplexes MeL. Da $[\text{L}]$ und $[\text{HL}]$ vernachlässigt werden und $\text{p}K_{\text{MeHL}}^{\text{H}}$ für die meisten Metall-Ionen zu tief geschätzt ist, sind die angegebenen Werte eher zu gross.

Bei den untersuchten Komplexen der 3*d*-Elemente ist die maximale MeL-Konzentration $\leq 3\%$, so dass die Stabilitätskonstanten der Tabelle für die protonierten Komplexe IV gelten: $K_{\text{MeHL}}^{\text{Me}} = [\text{MeHL}]/[\text{Me}^{2+}] \cdot [\text{HL}]$. Auch die bei höheren pH-Werten untersuchten Mg^{2+} -, Ca^{2+} - ($\leq 14\%$) und Ba^{2+} -Komplexe (ca. 44%) liegen überwiegend noch als MeHL-Komplexe vor¹¹⁾.

Die geringe Differenz von 0,2 bis maximal 0,5 log Einheiten zwischen den Stabilitätskonstanten der Komplexe von Inosin-5'-monophosphat-N(1)-oxid (II) und Inosin-N(1)-oxid stimmt hiermit überein, da für eine zusätzliche negative Ladung in dieser Distanz kein grösserer Stabilitätszuwachs der Komplexe zu erwarten ist¹²⁾.

3.2. *Verteilung der Metall-Ionen auf die beiden Koordinationsstellen*: Ein «ambivalentes» Ligandsystem mit zwei Haftstellen von ungefähr gleicher Koordinations-tendenz bildet in wässriger Lösung mit Metall-Ionen zwei miteinander im Gleichgewicht stehende 1:1-Komplexspezies aus. Im Falle von Inosin-5'-monophosphat-N(1)-oxid (II) wären dies *o*-Hydroxy-N-oxid- und Phosphat-Komplexe. Für erstere kennen wir die Komplexstabilitätskonstanten¹³⁾ (s. Tab. S. 1520); für die Me^{2+} -Phosphat-Komplexe darf in erster Näherung wiederum angenommen werden, dass ihre Konstanten von derselben Grössenordnung sind wie diejenigen von Adenosin-5'-monophosphat [2]⁸⁾.

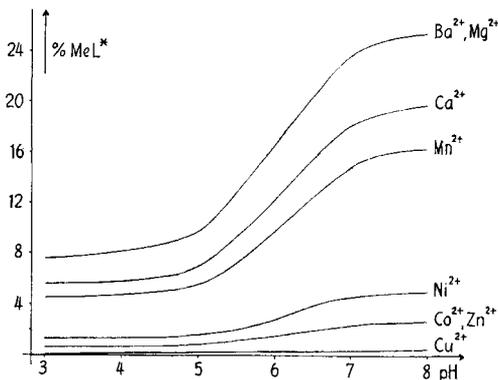


Fig. 1. *Metallionen-Verteilung auf die beiden Koordinationsstellen von Inosin-5'-monophosphat-N(1)-oxid (II): prozentualer Anteil des Phosphat-Komplexes (MeL*) an totaler komplexgebundener Metallmenge in Abhängigkeit vom pH*

¹¹⁾ Die Stabilitätskonstanten der MeL- und MeHL-Komplexe dürften sich maximal um 0,7 log Einheiten unterscheiden, analog den Cu^{2+} -Komplexen von Adenosin-5'-monophosphat-N(1)-oxid (I) (vgl. [2]).

¹²⁾ Eine ähnliche Grössenordnung ist für das Proton zu beobachten, wie ein Vergleich der Aciditätskonstanten von Adenosin-5'-monophosphat-N(1)-oxid (I) und Inosin-5'-monophosphat-N(1)-oxid (II) zeigt: Die Einführung einer negativen Ladung an der OH(6)-Gruppe in derselben Entfernung bedingt eine Zunahme der Basizität der $-\text{PO}_3\text{H}-$ Gruppe von ebenfalls 0,2 *pK*-Einheiten [3].

¹³⁾ Wir nehmen bei der folgenden Diskussion an, der Protonierungsgrad der Phosphat-Gruppe hätte auf die Komplexbildungstendenz der *o*-Hydroxy-N-oxid-Gruppe keinen Einfluss, so dass $K_{\text{MeHL}}^{\text{Me}} = K_{\text{MeL}}^{\text{Me}}$ gesetzt werden kann (vgl. auch ¹¹⁾).

Da bei der Verteilung der Metall-Ionen auf die beiden Koordinationsstellen die Konkurrenz mit dem Proton eine wesentliche Rolle spielt, müssen für einen Vergleich der Metall-Ionen-Affinität der beiden Haftstellen die für diese Konkurrenz mit dem Proton korrigierten FALLAB'schen Masszahlen [4] $X_{\text{MeL}}^{\text{Me}} = K_{\text{MeL}}^{\text{Me}} \cdot K_{\text{HL}}^{\text{H}} / ([\text{H}^+] + K_{\text{HL}}^{\text{H}})$ herangezogen werden (vgl. auch [2]); die in Fig. 1 angegebene prozentuale Verteilung der komplexgebundenen Metallmenge auf die beiden möglichen Komplexspezies mit *o*-Hydroxy-N-oxid- (MeL) bzw. Phosphat-Bindung (MeL*) wurde so nach $[\text{MeL}^*] / [\text{MeL}] = X_{\text{MeL}^*}^{\text{Me}} / X_{\text{MeL}}^{\text{Me}}$ abgeschätzt¹⁴⁾.

Die Werte zeigen bei steigendem pH zunächst alle denselben Gang, d. h. bei allen Metall-Ionen überwiegt – wie erwartet – die Komplexbildung an der *o*-Hydroxy-N-oxid-Gruppe; Cu^{2+} ist sogar im gesamten pH-Bereich, in dem es Komplexe bildet, zu mehr als 99,5% an diese Gruppe gebunden, so dass hier kaum mehr ein Gleichgewicht zwischen den beiden Komplexspezies vorliegt. Auch die anderen 3*d*-Metall-Ionen bilden noch überwiegend *o*-Hydroxy-N-oxid-Komplexe, während bei den Erdalkali-Ionen tatsächlich ein echtes Gleichgewicht besteht⁷⁾, liegen doch beim «physiologischen» pH 7,4 [5] vom komplexgebundenen Magnesium bzw. Barium 25% als Phosphat- und nur 75% als *o*-Hydroxy-N-oxid-Komplex vor. Interessant wäre es zu untersuchen, ob bzw. wie sich diese Verteilung bei enzymatischen Reaktionen auswirkt.

Experimenteller Teil

1. *Reagenzien und Apparate*: Synthesen der Liganden s. [1]. Metallperchlorate: Firma FLUKA AG, Buchs. UV.-Absorptionsspektren: BECKMAN-Spektrophotometer DB. pH Messungen: METROHM-pH-Meter E 353.

2. *Bestimmung der Komplexstabilitätskonstanten der Me^{2+} -1:1-Komplexe*: Die in Gegenwart von Metall-Ionen schon bei tieferen pII-Werten stattfindende Verdrängung des Protons der OH(6)-Gruppe im Inosin-N(1)-oxid (HL') und in dessen 5'-Monophosphat (II) (H_2L) äussert sich im UV.-Spektrum durch eine Zunahme der Extinktion bei 226 nm (Fig. 2a), die ein Mass für die Ausbildung der MeL'- bzw. MeHL-Komplexe ist. Es wurde deshalb die Differenz der Extinktionen von Lösungen der Liganden ($3 \cdot 10^{-5} \text{M}$), in denen die Me^{2+} -Konzentration von $6 \cdot 10^{-4} \text{M}$ bis max. $3 \cdot 10^{-2} \text{M}$ variierte, und von Ligand-freien Lösungen derselben Me^{2+} -Konzentrationen bei konstanter Ionenstärke ($I = 0,1$, NaClO_4 ; $t = 25^\circ$) gemessen¹⁵⁾. Die Extinktionsdifferenzen ΔE_{226} zwischen Me^{2+} -Lösungen mit und ohne Ligand-Zusatz bei 226 nm wurden durch Auftragen von $1/\Delta E_{226}$ gegen $1/[\text{Me}^{2+}]$ graphisch ausgewertet. Die so erhaltenen Punkte liegen auf Geraden, was das Vorliegen von 1:1-Komplexen bestätigt (Fig. 2b zeigt die Auswertung der Messungen von Fig. 2a). Aus den Schnittpunkten dieser Geraden mit den Ordinaten $1/[\text{Me}^{2+}]$ lassen sich die scheinbaren Stabilitätskonstanten der Komplexe bei den verwendeten pH-Werten⁹⁾ berechnen. Addiert man zu diesen Werten $\log (1 + [\text{H}^+] / K_{\text{HL}'}^{\text{H}})$ bei Inosin-N(1)-oxid – bzw. $\log (1 + [\text{H}^+] / K_{\text{H}_2\text{L}}^{\text{H}})$ bei dessen 5'-Monophosphat⁶⁾ – als Korrektur für die bei den pH-Werten der Messungen auftretende Verminderung der freien Ligand-Konzentration durch partielle Protonierung, so erhält man die in der Tabelle angegebenen Stabilitätskonstanten.

Herrn Prof. Dr. H. ERLNMEYER danke ich für seine Anteilnahme an der vorliegenden Arbeit. Herrn PD Dr. H. BRINTZINGER bin ich für wertvolle Anregungen dankbar. Des weiteren gilt mein Dank Herrn Dr. B. PRIJS für seine Hilfe bei der Abfassung dieser Publikation und Fr. K. RADICKE sowie Herrn stud. chem. W. DRITTENBASS für ihre Mitarbeit bei den analytischen Messungen.

¹⁴⁾ Diese Gleichung gilt nur, wenn $[\text{HL}] + [\text{L}] = [\text{HL}^*] + [\text{L}^*]$ ist, d. h. wenn entweder $[\text{MeL}] \cong [\text{MeL}^*]$ oder $[\text{MeL}]$ und $[\text{MeL}^*]$, verglichen mit $[\text{L}_{\text{tot}}]$ bzw. $[\text{L}_{\text{tot}}^*]$, vernachlässigbar klein sind.

¹⁵⁾ Bei der Bestimmung der Cu^{2+} -Komplexstabilitätskonstanten musste, wegen der starken Absorption der Vergleichslösung, der Spalt des Spektrophotometers geöffnet werden: Einstellung 2.

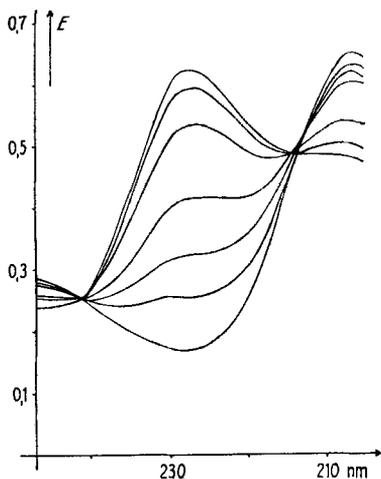


Fig. 2a. UV.-Absorption einer ca. $3 \cdot 10^{-5}$ M Lösung von Inosin-5'-monophosphat-N(1)-oxid (H_2L) bei pH 4,00, allein und in Gegenwart von $Ni(ClO_4)_2$ $7,5 \cdot 10^{-4}$ M; $1,5 \cdot 10^{-3}$ M; $3,0 \cdot 10^{-3}$ M; $6,0 \cdot 10^{-3}$ M; $9,0 \cdot 10^{-3}$ M und $1,2 \cdot 10^{-2}$ M, gemessen gegen die entsprechenden Metallionenlösungen (von unten nach oben) (1-cm-Quarzküvetten; $I = 0,1$; $t = 25^\circ$)

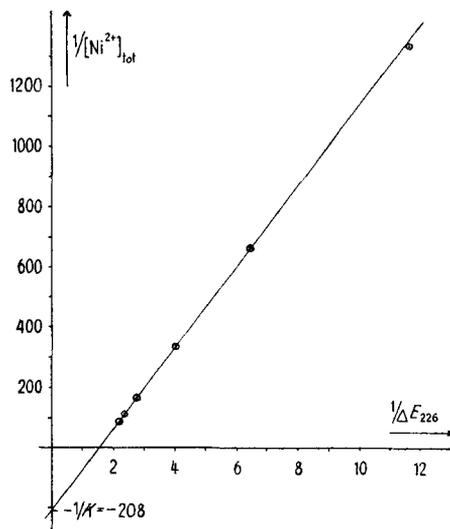


Fig. 2b. Graphische Ermittlung der scheinbaren Stabilitätskonstanten des NiHL-Komplexes bei pH 4,0. (Auswertung von Fig. 2a bei 226 nm)

SUMMARY

Stability constants of metal ion complexes, in which the metal ion is bonded to the *o*-hydroxy-N-oxide ligand group of inosine N(1)-oxide and inosine N(1)-oxide 5'-monophosphate, have been measured. The distribution of some bivalent metal ions between *o*-hydroxy-N-oxide and phosphate ligand groups of inosine N(1)-oxide 5'-monophosphate has been estimated: Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , and Zn^{2+} are mainly bonded to the *o*-hydroxy-N-oxide ligand group; with Mg^{2+} , Ca^{2+} , and Ba^{2+} an equilibrium between the two complexes has to be assumed.

Institut für Anorganische Chemie,
Universität Basel

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] H. SIGEL & H. BRINTZINGER, *Helv.* **48**, 433 (1965).
- [2] H. SIGEL & H. BRINTZINGER, *Helv.* **47**, 1701 (1964).
- [3] H. SIGEL, *Helv.* **48**, 1513 (1965).
- [4] S. FALLAB, *Helv.* **37**, 645 (1954); *Experientia* **10**, 190 (1954); S. FALLAB & H. ERLÉNMEYER, *Arch. exper. Path. Pharmacol.* **230**, 205 (1957); vgl. auch [2].
- [5] P. KARLSON, «*Biochemie*», Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1962, S. 318.