

24. Zur Stabilität und Struktur der Cu^I-Komplexe des Imidazols und Histamins

Chemie des einwertigen Kupfers in homogener, polarer Lösung

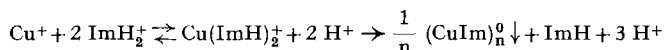
1. Mitteilung

von C. Sigwart¹⁾, P. Kroneck und P. Hemmerich

Fachbereich Biologie der Universität Konstanz

(6. X. 69)

Summary. Univalent copper is stabilized in aqueous medium by the non-protophilic ligand CH₃CN, allowing ligand displacement reactions to be investigated as if a stable Cu^I-hydrate did exist. Under these conditions the formation of Cu^I-complexes with imidazole and its derivatives has been studied in polar solution in the absence of Cu^{II}. Imidazole (ImH) acts upon Cu^I as a bidentate ligand forming polynuclear chains according to the equation



Histamine reacts in the same way, *i.e.* the coordination number of Cu^I does not exceed 2; by comparison of the complexes of Cu^I with histamine and its N-methyl-derivatives it is shown that no six-membered chelate – which sterically would be possible – is built up. Trigonal as well as tetrahedral coordination of Cu^I – *i.e.* chelate formation – in dilute polar solutions are confined to π - or d -acceptor ligands, *e.g.* bipyridine or methionine. Conclusions are drawn from this on the requirements for redox-active copper in proteins.

Einleitung. – Hemmerich & Sigwart [1] haben gezeigt, dass das Kupfer des leicht erhältlichen, in Substanz stabilen Komplexes Cu(CH₃CN)₄ClO₄ in verdünnter wässriger, CH₃CN-haltiger Lösung in Form von Cu(CH₃CN)₂⁺-Ionen vorliegt, welche je nach Acetonitril-Konzentration gegen Disproportionierung und in Abwesenheit von Luftsauerstoff bis zu einem kritischen pH auch gegen Hydrolyse stabil sind. Fig. 1 zeigt typische Cu^I-Hydrolysenkurven in Abhängigkeit von der Acetonitril-Konzentration; der Beginn der Hydrolysenreaktion wird durch die gelbe Farbe des ausfallenden Cu^I-Oxides deutlich angezeigt. Disproportionierung (2 Cu^I → Cu^{II} + Cu⁰) tritt erst ein bei längerem Erwärmen der Lösung unter Luftausschluss unterhalb des Hydrolysen-pH. In derartigen Lösungen können Substitutionsreaktionen an Cu^I in Abwesenheit von Cu^{II} in homogener polarer Lösung untersucht werden dank der Tatsache, dass der Hilfsligand Acetonitril in Wasser beliebig löslich ist, in den anzuwendenden Konzentrationen die Wasser-Aktivität nicht beeinflusst und selbst keine Protonen-Affinität besitzt.

Das erste Cu^I-Ligand-System, welches wir mit Hilfe dieser neuen Methode strukturellchemisch zu analysieren versuchten, ist das des Imidazols und des Histamins, bzw. seiner N-Methyl-derivate. Hierüber lagen nur Gleichgewichtsuntersuchungen für die

¹⁾ Diese Arbeit enthält Auszüge der Dissertation von C. Sigwart, Institut für Anorg. Chemie der Universität Basel, 1967.

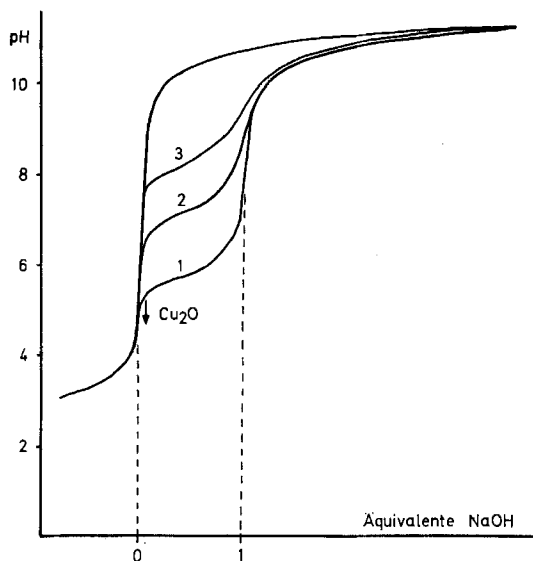


Fig. 1. pH-Titrationen der Hydrolyse von $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_2^+$ in Abhängigkeit von der Acetonitrilkonzentration

Alle Lösungen sind 10^{-3}M an HClO_4 , 10^{-1}M an NaClO_4 und 10^{-3}M an Cu^{I} ; die Acetonitrilkonzentrationen bei den Kurven 1, 2 und 3 sind jeweils 0,2, 1 und 2M.

erste Komplexbildungsstufe vor [2], so dass insbesondere die folgenden Strukturfragen noch nicht geklärt waren:

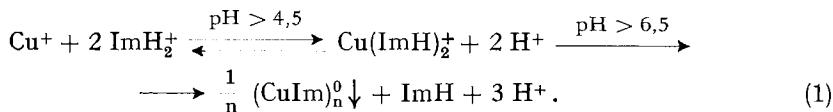
1. Welches ist die maximale Cu^{I} -Koordinationszahl im wässrigen System Cu^{I} -Imidazol²⁾?

2. Wie verhält sich Cu^{I} gegenüber dem gleichzeitigen Angebot von ImH - bzw. Im^{\ominus} - und RNH_2 -Liganden?

3. Ist die Ausbildung von Sechsring-Chelaten – und damit trigonale bis tetraedrische Koordination am Cu^{I} – im Falle geeigneter zweizähliger Liganden des Typs $\text{HIm}-\text{NH}_2$, also des Histamins, möglich?

Diese Fragen sind zur Diskussion der Struktur redoxaktiver Cu-Proteine von grundlegender Wichtigkeit [3].

Ergebnisse. – Wie aus Fig. 2 hervorgeht, werden bei der alkalimetrischen Titration von Cu^{I} in Gegenwart von zwei Äquivalenten ImH drei Protonen frei, wobei sich die beiden ersten Puffergebiete deutlich vom dritten abheben. Mit beginnender Freisetzung des dritten Protons bei pH 6,5 tritt ein farbloser, in den üblichen Lösungsmitteln unlöslicher Niederschlag auf. Dieses Verhalten wird erklärt durch Gleichung (1).



²⁾ Abkürzungen: Imidazol = ImH , Imidazol-Anion = Im^{\ominus} , N-Methyl-Imidazol = ImR , Histamin = $\text{HIm}-\text{NH}_2$, N-Methyl-Histamin = $(\text{CH}_3)\text{Im}-\text{NH}_2$.

Zur Erhärtung dieses Reaktionsverlaufes haben wir zum Vergleich N-Methylimidazol (ImR) (Fig. 2, Kurve 1) herangezogen, bei dessen Reaktion mit Cu^{I} erwartungsgemäss die Freisetzung des dritten Protons ausbleibt. Der farblose Niederschlag aus

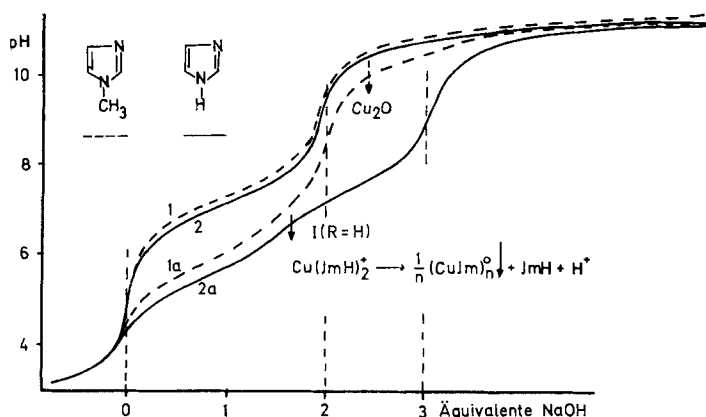
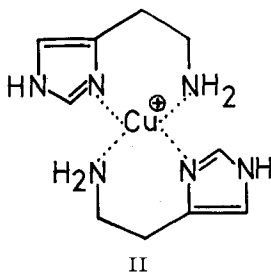
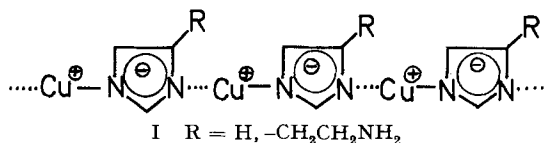


Fig. 2. pH-Titrationen der 2:1-Komplexbildung von Cu^{I} mit Imidazol und N-Methylimidazol
 Alle Lösungen sind 10^{-3}M an HClO_4 , 10^{-1}M an NaClO_4 , $2 \times 10^{-3}\text{M}$ an Ligand und $0,2\text{M}$ an CH_3CN
 Kurve: 1. N-Methylimidazol; 1a N-Methylimidazol mit 10^{-3}M Cu^{I} . 2. Imidazol; 2a. Imidazol mit 10^{-3}M Cu^{I}

der Imidazol-Titration wurde ferner nach vollständiger Neutralisation des dritten Protons unter strengem Sauerstoffausschluss bei pH 10 abfiltriert, wonach im Filtrat – wie durch Gleichung (1) verlangt – ein Äquivalent freies ImH nachweisbar war. Der amorphe, bei strengem Luftausschluss farblose Niederschlag muss also aus dem Kettenpolymeren der Struktur I ($\text{R} = \text{H}$) bestehen.



Überraschenderweise ergibt die Titration von Cu^{I} mit zwei Äquivalenten Histamin (Fig. 3) ein sehr ähnliches Bild. Pro Cu^{I} werden unter keinen Bedingungen mehr als 3,3 Protonenäquivalente freigesetzt, was die stöchiometrische Bildung eines – sterisch an sich möglichen – 2:1-Chelates der Struktur II schon ausschliesst, welche ja

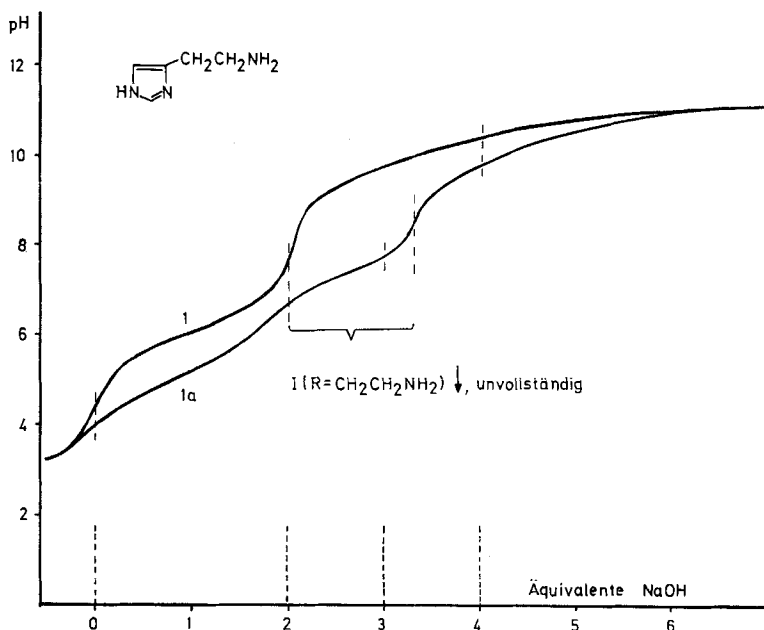


Fig. 3. pH-Titration der 2:1-Komplexbildung von Cu^{I} mit Histamin

Die Standardbedingungen sind wie in Fig. 2.

Kurve: 1. Histamin; 1 a. Histamin mit 10^{-3}M Cu^{I}

Freisetzung von 4 Protonen pro Cu^{I} verlangt. Es war nun zu klären, ob eine Chelatbildung auch nicht partiell eintritt und ob die Aminogruppe intermolekular in die Koordinationssphäre eines vorgebildeten $\text{HIm-Cu}^{\text{I-ImH}}$ -Zentrums eintritt, sei es unter Verdrängung einer HIm -Gruppe oder unter Erhöhung der Koordinationszahl des Metall-Ions. Ebenso könnte das dritte freigesetzte Proton aus dem Imidazolkern stammen, wie es ja im Falle des Imidazols selbst bewiesen wird. Eine weitere Möglichkeit wäre eine Erniedrigung des $\text{p}K_a$ der Ammoniumgruppe ohne Koordination, allein durch die Wirkung der positiven Ladung des im Abstand von drei C-Atomen am Iminostickstoff gebundenen Cu^{I} . Daher haben wir noch die beiden am Imidazolkern methylierten Histamin-Isomeren III und IV (Fig. 4) zum Vergleich herangezogen. Bei beiden treten bei den analogen Titrationen keine Niederschläge auf. Daraus folgt, dass der beim unsubstituierten Histamin auftretende Niederschlag durch Bildung des polymeren Komplexes $(\text{CuL})_n^0$ des Typs I ($\text{R} = -\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$) zu erklären ist. Der Strukturvergleich der beiden Histaminderivate zeigt deutlich, dass 1-Methyl-4-Histamin (III) «chelatifähig» ist, 1-Methyl-5-Histamin (IV) dagegen nicht. Der Unterschied der Imidazol- $\text{p}K_a$ -Werte (Fig. 4) beweist schon, dass monoprotoniertes Methylhistamin III als H-Chelat vorliegt im Gegensatz zu IV. Ähnliches gilt für die Cu^{I} -Komplexe von III und IV, deren Stabilität infolge Chelatbildung im Falle von III (jedoch nicht von IV) stark verschieden ist (Fig. 5). Im Gegensatz dazu sind die Cu^{I} -Titrationsskurven ($\text{L}:\text{Cu}^{\text{I}} = 2:1$) der beiden Methylhistamine (III, IV) kaum voneinander unterscheidbar und zeigen Freisetzung von präzise drei Protonen pro Cu^{I} , davon das dritte Proton wieder deutlich abgesetzt von den beiden ersten. Es werden also – wie im Falle

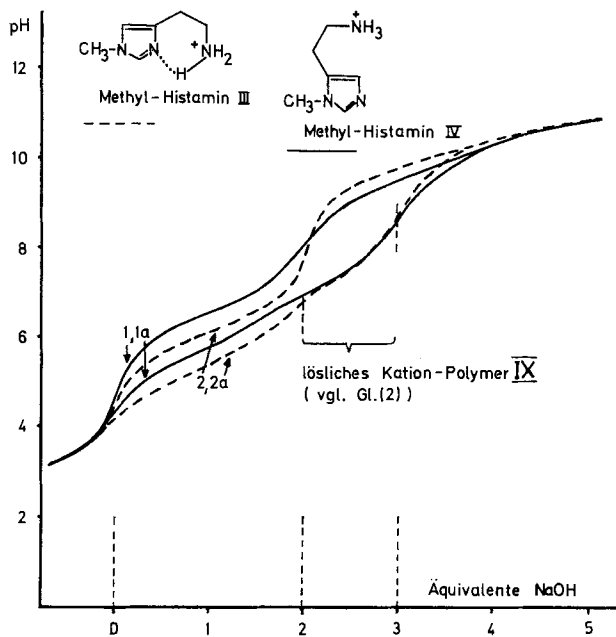


Fig. 4. pH-Titration der 2:1-Komplexbildung von Cu^{I} mit 1-Methyl-4-histamin und 1-Methyl-5-histamin

Die Standardbedingungen sind wie in Fig. 2. Kurve: 1. 1-Methyl-5-histamin; 1a. 1-Methyl-5-histamin mit 10^{-3}M Cu^{I} . 2. 1-Methyl-4-histamin; 2a. 1-Methyl-4-histamin mit 10^{-3}M Cu^{I}

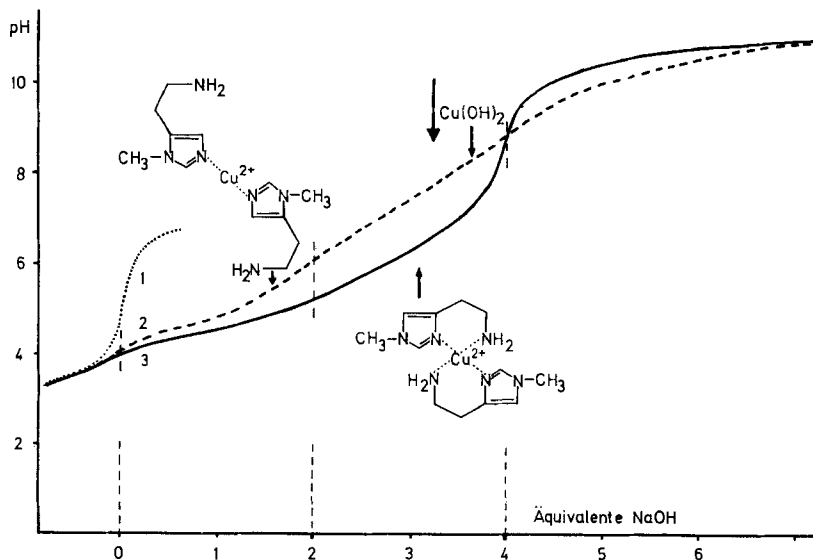
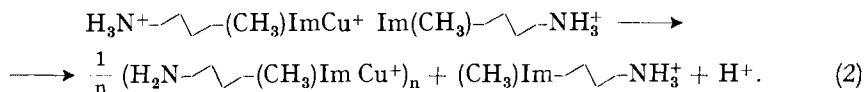


Fig. 5. pH-Titration der 2:1-Komplexbildung von Cu^{II} mit 1-Methyl-4-histamin und 1-Methyl-5-histamin

Die Standardbedingungen sind wie in Fig. 2. Kurve: 1. Hydrolyse von Cu^{II} 10^{-3}M ; 2. 1-Methyl-5-histamin mit Cu^{II} 10^{-3}M ; 3. 1-Methyl-4-histamin mit Cu^{II} 10^{-3}M

des Imidazols, nur ohne Fällung - 75 Prozent der angebotenen Protonen aus $\text{H}^+\text{Im}(\text{CH}_3)\text{-}\text{NH}_3^+$ durch Cu^{I} verdrängt. In der Stabilität beider Komplexe zeigt sich kein Unterschied und damit kein wesentlicher Chelateffekt (Fig. 4). Die NH_2 -Gruppe kann also nur dann am Metall koordiniert sein, wenn sie eine $(\text{CH}_3)\text{Im}$ -Gruppe verdrängt, sie muss jedoch am Metall koordiniert sein, weil nur so die ausbleibende Freisetzung des 4. Protons zu verstehen ist gemäss Gleichung (2):



Ähnlich wie bei der Imidazolreaktion (vgl. Gleichung 1) wird bei dieser Umlagerung ein Äquivalent Ligand wieder frei, dessen Ammoniumgruppe bei pH 6-8 noch nicht neutralisiert ist. Man könnte denken, dass Chelatbildung am Cu^{I} keinen wesentlichen Entropiegewinn mit sich bringe und allein deshalb ungünstig sei, denn Cu^{I} -Chelatbildung muss ja mit Erhöhung der Koordinationszahl einhergehen. Dass dies nicht der Fall ist, beweisen die Cu^{I} -Titrations des S-Benzylcysteins und des Methionins, welche normale 2:1-Chelate (V und VI, Fig. 6) aufweisen mit Freisetzung von

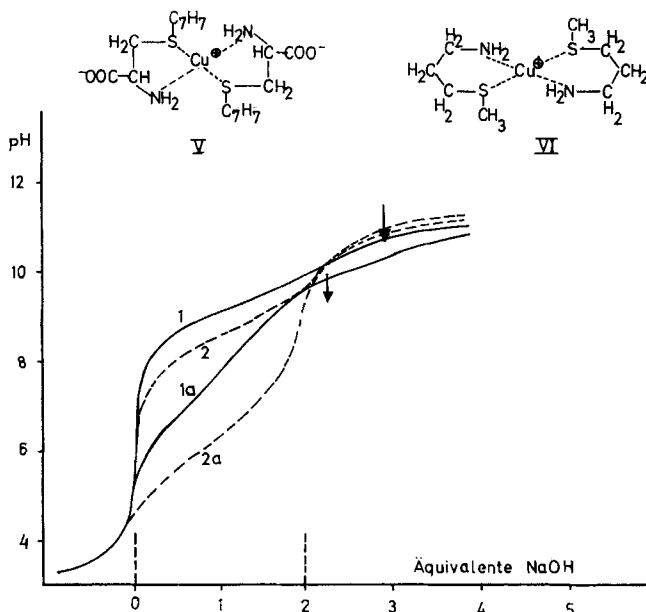


Fig. 6. pH-Titration der 2:1-Komplexbildung von Cu^{I} mit Methionin und mit S-Benzylcystein

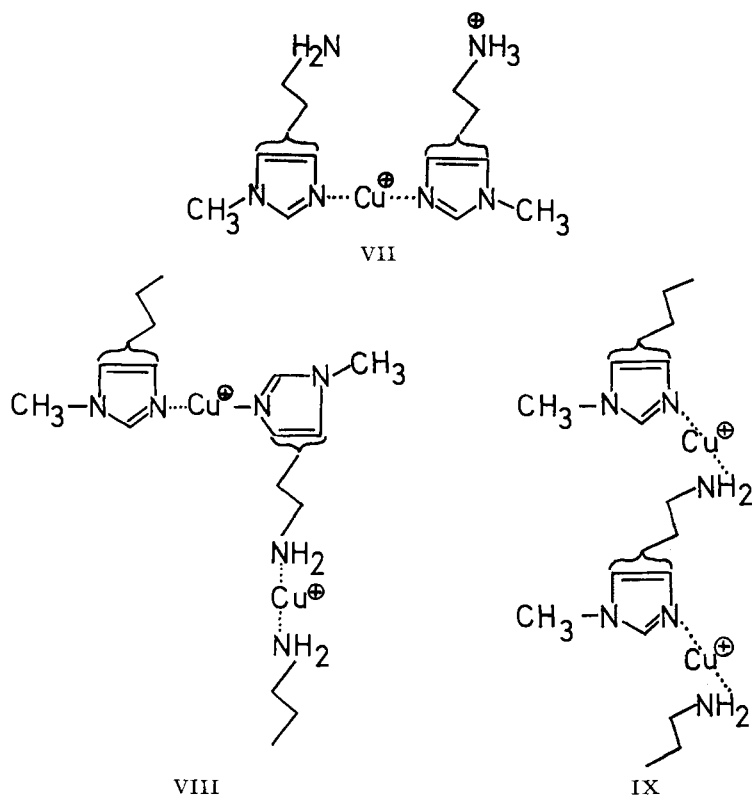
Die Standardbedingungen sind wie in Fig. 2.

Kurve: 1. Methionin; 1a. Methionin mit 10^{-3}M Cu^{I} . 2. S-Benzylcystein; 2a. S-Benzylcystein mit 10^{-3}M Cu^{I}

zwei Protonen pro Cu^{I} . Die Beteiligung der Sulfidgruppe an der Koordination ergibt sich zwingend daraus, dass Cu^{I} -Komplexe mit einzähnigen Aminen RNH_2 unter denselben Bedingungen gegen Hydrolyse nicht stabil sind. Das Ausbleiben der Chelatbildung bei den Imidazolderivaten ist also im wesentlichen ein Enthalpie-Effekt. Die

Voraussetzung für die Bildung eines stabilen tetraedrischen Cu^{I} -Chelates ist hinlängliche Weichheit wenigstens einer Ligandhaftstelle, bzw. Befähigung zur Ausbildung einer d_{π} -Akzeptorbindung, welche die Elektronendichte am Metall herabsetzt.

Eine strenge Differenzierung der nun noch möglichen Komplexstrukturen VII, VIII und IX lässt sich aus den 1:1-Titrationen der Methylhistamine herleiten. Zu beachten ist, dass die Isomeren III und IV sich hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Ausbildung dieser Strukturen nicht unterscheiden. Hierbei wird das gesamte Cu^{I} von beiden



Methylhistaminen (III bzw. IV) gebunden unter Freisetzung von je zwei Protonen pro Cu^{I} , d. h. 100 Prozent der verfügbaren Protonen des Liganden $\text{H}^+\text{Im}(\text{CH}_3)\text{---}\text{---}\text{NH}_3^{\oplus}$. Es bleibt also nur die Wahl zwischen den Polymerkomplexen der Struktur VIII und IX. Titrationen von primären Aminen mit Cu^{I} zeigen jedoch, wie schon erwähnt, dass $\text{RNH}_2\text{---}\text{Cu}^{\text{I}}\text{---}\text{NH}_2\text{R}$ -Zentren nur bei hohem Überschuss an freiem Ligand gegen Hydrolyse stabil sind. Bei den 2:1-Titrationen der Methylhistamine wird jedoch keine Inhomogenität beobachtet und die 1:1-Titrationen ergeben einen Hydrolysenbeginn erst bei pH 10–11 je nach Acetonitril-Konzentration.

Damit deutet alles auf die Bildung des Polymeren der Struktur IX hin, welches infolge seiner Ladung im Gegensatz zu den neutralen Polymeren I des Imidazols und Histamins in Lösung bleibt. Bei der Komplexbildung des Histamins mit Cu^{I} – die 2:1-Titration ergibt 0,3 freigesetzte Protonenäquivalente mehr als die entsprechende Ti-

tration der Methylderivate – ist somit ein Gleichgewicht zwischen dem Polymeren des Typs IX und dem Polymeren des Typs I ($R = -CH_2CH_2NH_2$) zu fordern.

Zusammenfassend kann die Frage der Cu^I -Komplexbildung mit Histamin und analogen Verbindungen dahin entschieden werden, dass die Imidazolgruppe zwei Cu^I koordinieren kann ($-Cu^IImCu^I-$) in Konkurrenz zu der Beteiligung freier Aminogruppen ($-H_2NCu^IIm-$); Cu^I koordiniert keinesfalls mehr als zwei dieser Liganden und zwar einzähnig im Winkel von annähernd 180° .

Experimentelles. – In Form von Handelsprodukten wurden eingesetzt: Imidazol, N-Methylimidazol und Histamin $\times 2 HCl$ [*Fluka AG* (Buchs, St. Gallen)]; Methionin [*E. Merck AG* (Darmstadt)]; S-Benzylcystein [*Schuchard* (München)].

Die beiden N-Methylhistamine wurden nach *Rothschild & Schayer* [4] hergestellt. Zur Trennung der Isomeren wurden die N-Methylhistamin-dipikrate aus einem 1:1-Äthanol-Wasser-Gemisch fraktioniert kristallisiert. Während das schwerer lösliche 1-Methyl-4-histamin (III)-dipikrat rein isoliert wurde (Smp. $217-218^\circ$, Lit.-Smp. $216,5-217,5^\circ$), blieb das leichter lösliche IV-Dipikrat stets mit dem Isomeren verunreinigt (Smp. $193-204^\circ$, Lit.-Smp. 201° [5]). Die Ligandlösungen für

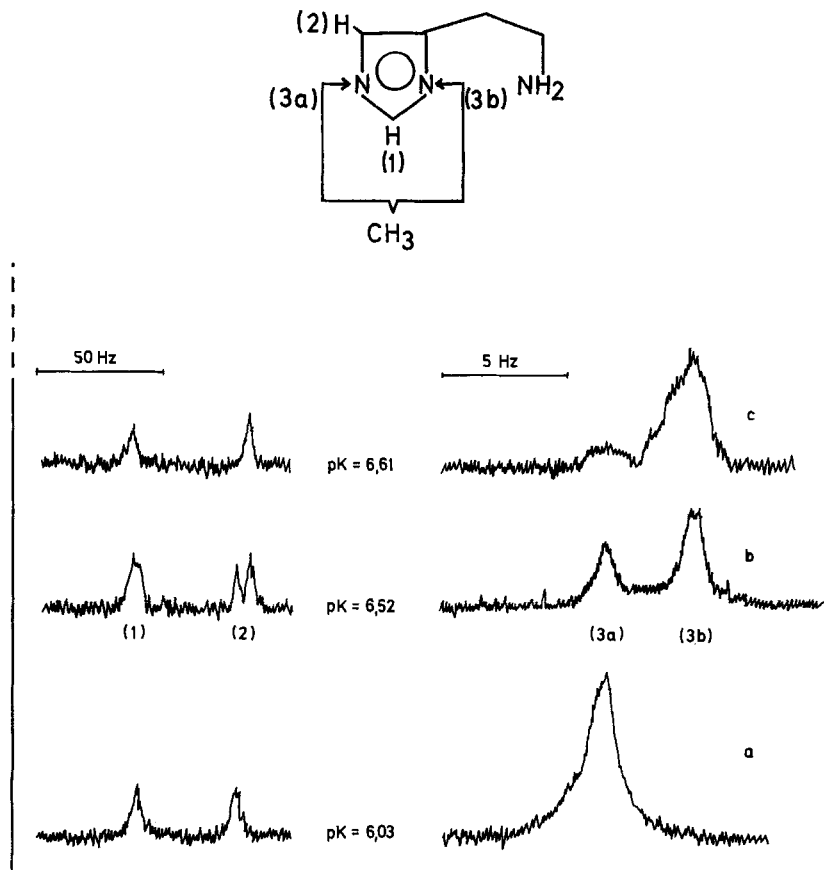


Fig. 7. NMR.-Spektrum der N-Methylhistamin-Isomeren

Alle Lösungen sind $10^{-1}M$ an N-Methylhistamin in $0,5N NaOD$.

a) 1-Methyl-4-histamin (III) reinst; b) 1-Methyl-5-histamin (IV) 66-proz.; c) 1-Methyl-5-histamin (IV) 84-proz.

die pH-Titrationen wurden hergestellt durch Auflösen der Dipikrate in 2N NaOH, Verdünnen der Lösung mit Wasser und Einstellen des pH mit 0,1N HClO₄ auf 3; die Pikrinsäure hatte keinen Einfluss auf die Komplexbildung des Cu^I mit den Histaminderivaten. Sie konnte aus einer Lösung des Dipikrates in 1N HClO₄ durch Extraktion mit einem 2:1-Chloroform-Dimethylformamid-Gemisch entfernt werden.

Für den Imidazolstickstoff des rein erhaltenen Isomeren III berechneten wir einen pK_a-Wert von 6,03 bei 25° in 0,1M NaClO₄.

Im Falle der « unreinen » Präparate des Isomeren IV konnte das Verhältnis der beiden Methylhistamine mit Hilfe des NMR.-Spektrums des Dipikrates in 0,5N NaOD bestimmt werden. Die Signale der N-CH₃-Protonen der beiden Verbindungen (Fig. 7) sind um 0,05 ppm gegeneinander verschoben. Die prozentuale Zusammensetzung des Isomerengemisches wurde durch Integration der beiden Absorptionssignale über einen Bereich von 50 Hz berechnet. Die Tabelle zeigt den Anstieg des Imidazol-pK_a im Verlauf der fraktionierten Dipikrat-Kristallisation in Abhängigkeit vom Isomerenverhältnis.

pK_a-Werte von Histamin und seinen N-Methyl-Isomeren

Ligand	pK _a	Prozentgehalt an Isomerem III nach Fig. 7
1-Methyl-4-histamin	6,03	100
1-Methyl-5-histamin	6,52 ^{a)} b)	33 ± 5
1-Methyl-5-histamin	6,61 ^{a)} c)	16 ± 4
Histamin	6,02 [6]	–

a) Diese « Misch-pK_a-Werte » sind Halbneutralisationswerte.

b) Nach 4-facher Fraktionierung.

c) Nach 6-facher Fraktionierung.

Mit Hilfe der Titrationskurven der Isomerengemische und der Prozentgehalte aus der Tabelle berechneten wir den pK_a-Wert von 1-Methyl-5-histamin (IV) zu 6,74 ± 0,02 bei 25° in 0,1M NaClO₄. Die nach 6-facher Fraktionierung noch verbleibende 16-proz. Verunreinigung des Isomeren IV durch III erwies sich für die Untersuchung der Komplexstrukturen als ohne Belang, so dass wir auf weitere Reinigung verzichteten.

Acetonitril (*Fluka AG, purum*) wurde nach Schütteln mit K₂CO₃ über P₂O₅ fraktioniert destilliert.

Cu(CH₃CN)₄ClO₄ wurde nach *Hemmerich & Sigwart* [1] hergestellt; eine 0,1M Cu^I-Lösung in Acetonitril erhält man durch Lösen des Komplexes in sauerstofffreiem Acetonitril.

Als Cu^{II}-Salz wurde Cu(ClO₄)₂ · 6H₂O (*Fluka AG, purum*) benutzt.

Die pH-Titrationen wurden mit Hilfe des Potentiographen E 336 A, des Titrierstandes E 436 E und der Elektrode EA-125 X der Firma *Metrohm* bei Zimmertemperatur unter sauerstofffreiem Argon vorgenommen.

Die NMR.-Spektren wurden mit einem A-60-A-Gerät der Firma *Varian* aufgezeichnet.

Die Smp. wurden auf einem *Kofler*-Block bestimmt.

Für finanzielle Unterstützung danken wir dem *Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung* und der *Deutschen Forschungsgemeinschaft*.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *P. Hemmerich & C. Sigwart*, *Experientia* 19, 488 (1963).
- [2] *N. C. Li, J. M. White & E. Doody*, *J. Amer. chem. Soc.* 76, 6219 (1954); *A. Zuberbühler*, *Helv.* 50, 467 (1967); *Th. Kaden & A. Zuberhübler*, *Helv.* 49, 2189 (1966).
- [3] *P. Hemmerich* in "The Biochemistry of Copper", edited by *P. Aisen, W. Blumberg & J. Peisach*, Academic Press, New York, London 1966.
- [4] *Z. Rothschild & R. W. Schayer*, *Biochim. biophysica Acta* 30, 24 (1958).
- [5] *F. L. Pyman*, *J. chem. Soc.* 99, 2172 (1911).
- [6] *M. A. Dormann, S. Chaberek & A. E. Martell*, *J. Amer. chem. Soc.* 86, 2129 (1964).