

Beiträge zur Chemie der Pyrrolpigmente, 44. Mitt.¹: Gallenfarbstoffe als Ionophore

Dieter Eichinger und Heinz Falk*

Institut für Analytische, Organische und Physikalische Chemie,
Johannes-Kepler-Universität Linz, A-4040 Linz, Österreich

(Eingegangen 21. September 1981. Angenommen 7. Oktober 1981)

On the Chemistry of Pyrrole Pigments, XLIV: Bile Pigments as Ionophores

The carrier mediated transport of cations using model compounds of the verdinoid and rubinoid bile pigment structural type as ionophores is studied. Verdinoid bile pigments turn out to be very effective carriers for cations exhibiting a pronounced selectivity for certain transition metal ions like Cr^{+++} , Fe^{++} , Cu^{++} and Zn^{++} . The scope of this behaviour of verdinoid bile pigments is compared to [18]-crown-6 and meso-tetraphenylporphyrin and is discussed with regard to structural, biological, analytical and technical implications.

(*Keywords: Bile pigments; Carrier mediated transport; Ionophores; Selectivity*)

Einleitung

Die Entdeckung der Kronenether durch *Pedersen*² hat eine stürmische Entwicklung auf dem Gebiete der synthetischen und natürlichen Ionophore ausgelöst. Die Anwendung und Bedeutung von Verbindungen, die anorganische und organische Ionen komplexieren und auf diese Weise deren lipophobe und lipophile Eigenschaften ändern können, reicht von der Biochemie des Ionentransports über die analytische Chemie und die präparativ organische Chemie bis zu medizinischen Interessen³.

Ionophore bestehen aus einem mit apolaren Gruppen ausreichend substituierten „Rückgrat“ und einem auf diesem „Rückgrat“ befindlichen Satz von Donorzentren (zumeist Heteroatome), die auf Grund ihrer strukturellen Merkmale (Makrocyclus, konformativ entsprechend bewegliches Molekül) im Raume eine „Höhle“ oder einen Ring bilden. Diese Zentren können beispielsweise ein

Kation komplexieren, wobei durch die „außen“ angebrachten apolaren Substituenten die Eigenschaften des Ions „invertiert“ werden. Dies führt zu den oben erwähnten Möglichkeiten der Verwendung von Ionophoren.

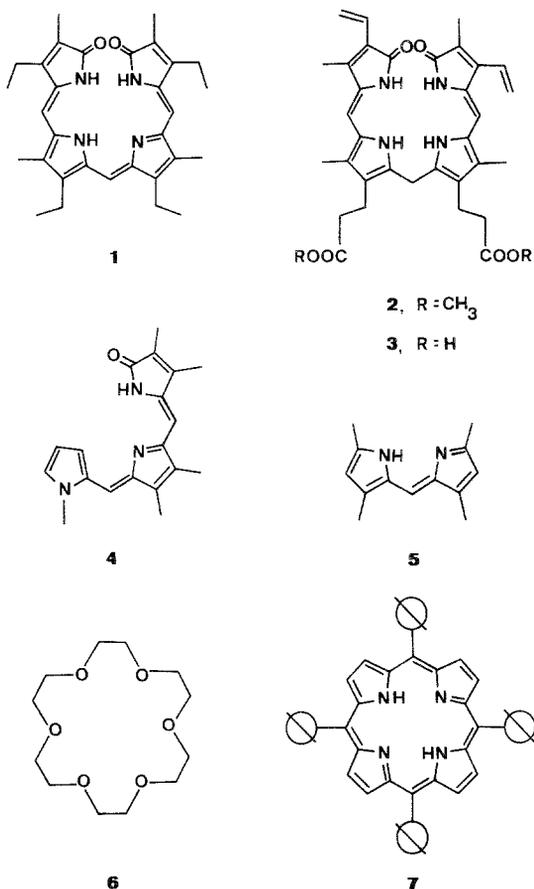
Gallenfarbstoffe, insbesondere vom verdinoiden Strukturtyp, zeigen die für Ionophore zu fordernden beiden Merkmale: in der in Lösungen vorherrschenden helikalen Konformation⁴ gewährleistet die apolare Peripherie die Lipophilie — die zum Zentrum der Struktur gerichteten pyrrolischen bzw. pyridinartigen Stickstoffe stellen geradezu ideale Chelatbildner dar. Solche Komplexe von Gallenfarbstoffen und auch von daraus abgeleiteten Partialstruktursystemen mit einer Reihe von Kationen sind in der Literatur beschrieben⁵.

Die vorliegende Mitteilung ist durch die Bedeutung, die Transporteigenschaften von Gallenfarbstoffen für biologische Systeme und analytische Anwendungen haben könnten, motiviert — sie hat das Studium der Transportparameter verdinoider und rubinoider Gallenpigmente zum Ziele.

Methodik — Experimentelle Details

Für die Transportstudien verwendete man die in der Formelübersicht zusammengestellten Verbindungen Aetiobiliverdin-IV- γ (1)⁶, Bilirubindimethylester (2)⁷, Bilirubin (3)⁸, (*Z,Z*)-3,4-Dimethyl-5-[5-(1-methylpyrrolyl-2-methylen)-3,4-dimethyl-5*H*-pyrrolyl-2-methylen]-3-pyrrolin-2-on (4)⁹ und 3,3',5,5'-tetramethyl-2,2'-dipyromethen (5)¹⁰ als Gallenfarbstoffmodelle und [18]-Crown-6 (6)¹¹ bzw. meso-Tetraphenylporphin (7)¹² als Vergleichsmaterial. Ihre Identität und Reinheit überprüfte man mit spektroskopischen Methoden (Varian FT-80-A NMR, Perkin-Elmer UV-VIS-330 Spektrophotometer, Knauer Differentialosmometer). Die Ionenflußdichten bestimmte man unter Verwendung einer Schulman Brücke¹³ (U-Rohr von 4,91 cm² Querschnitt) mit 30 ml einer Salzlösung der Aktivität 1,0 als Spenderphase, Chloroformlösungen von 1—7 (0,01 mmol/45 ml Chloroform, frisch über Al₂O₃ filtriert) als Flüssigmembrane und 30 ml Leitfähigkeitswasser als Empfängerphase. Das System wurde extern thermostatiert (20,00 \pm 0,02 °C), die Messungen erfolgten in einer Dunkelkammer. Jede der drei Phasen rührte man gesondert (Magnetrührer; Rührgeschwindigkeit: 150 U/min — in Vorversuchen überzeugte man sich davon, daß eine Änderung derselben in diesem Bereich die Meßergebnisse nicht beeinflußt. Die Menge des transportierten Ions bestimmte man kontinuierlich durch Leitfähigkeitsmessung (Konduktometer E 518 mit einer Zelle EA 608-C, Fa. Metrohm, Servogor-310 Schreiber) während 8 bis 20 Stunden. Dabei wurde in jedem Experiment zunächst ein Transportleerwert (Chloroformphase ohne Zusatz des Ionophors) über 4—6 Stunden ermittelt und dann erst der Ionophor injiziert. Aus den gemessenen Leitfähigkeiten hat man die transportierten Mengen errechnet¹⁴. Der Zeitverlauf war in jedem Fall linear, die ermittelten Flußdichten (mol m⁻² s⁻¹) in den jeweils angegebenen Grenzen reproduzierbar. Einige Experimente wurden auch durch naßchemische Analysenverfahren und AAS kontrolliert. UV-VIS-spektroskopische Messungen erfolgten auf einem

Perkin-Elmer-330-Spektrometer. Die Beurteilung hinsichtlich einer Komplexbildung (s. Tab. 1) erfolgte nach den spektroskopischen Veränderungen, die man nach Äquilibrieren mit etwas Donorphase in einer 1-mm-Küvette, die mit



der Membranphase beschickt war, erhielt. Die dafür nötigen spektroskopischen Eigenschaften der Komplexe ermittelte man in einem Parallelexperiment durch Einbringen des Metallsalzes in die Donorphase, allenfalls unter Zusatz von etwas *Hünig*base.

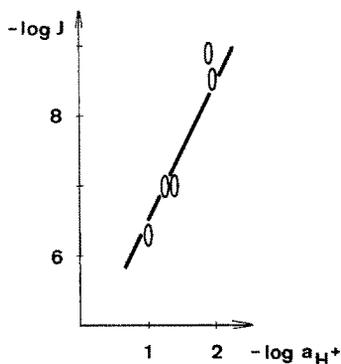
Ergebnisse

In Tabelle 1 sind die für die jeweiligen Chloride gemessenen Flußdichten zusammengestellt. Abb. 1 gibt für das Proton die Abhängigkeit der Flußdichte von der Aktivität. Da die Aktivität des

Tabelle 1. *Flußdichten* J ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) für die jeweiligen Chloride; Ionophor: **1** ($c_1 = 0,222 \text{ mmol l}^{-1}$)

Kation	Konz. (mol l^{-1}) ¹⁵ so daß $a = 1,0$	$J \cdot 10^9$	Komplex- bildung*
H ⁺	1,24	830 ± 160	++
Li ⁺	1,29	2,6 ± 0,8	—
Na ⁺	1,52	2,5 ± 0,8	—
K ⁺	1,66	2,2 ± 0,7	—
Mg ⁺⁺	1,32	2,2 ± 0,7	—
Ca ⁺⁺	1,58	14,0 ± 4	—
Ba ⁺⁺	2,11	0,6 ± 0,2	—
La ⁺⁺⁺	1,54	47 ± 14	+
Cr ⁺⁺⁺	1,49	830 ± 240	++
Mn ⁺⁺	1,64	1,1 ± 0,3	—
Fe ⁺⁺	1,35	830 ± 240	++
Co ⁺⁺	1,35	0,8 ± 0,2	—
Ni ⁺⁺	1,46	5,6 ± 2,3	—
Cu ⁺⁺	2,11	630 ± 140	++
Zn ⁺⁺	3,39	420 ± 130	+
Cd ⁺⁺	3,3	10 ± 3	—

* UV-VIS-spektroskopische Abschätzung; (—) keine, (+) deutliche Anzeichen, (++) fast vollständige Komplexierung; vgl. Exp. Teil.

Abb. 1. Abhängigkeit der Flußdichte J von $a(\text{H}^+)$ für **1**

Protons quadratisch in die Transportraten eingeht, wurde auf die Korrektur für die Hydrolyse einzelner Salze in Tabelle 1 verzichtet — sie liegt weit unterhalb der Meßgenauigkeit. Abb. 2. zeigt die Abhängigkeit der Flußdichte von der Konzentration von **1** in der Flüssigmembran bei einer Aktivität von 1,0 an Salzsäure in der Donorphase.

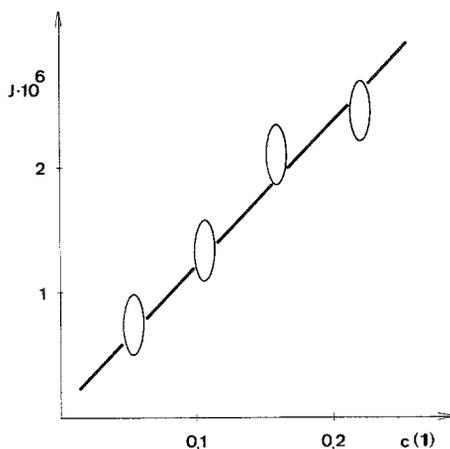


Abb. 2. Abhängigkeit der Flußdichte J ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) von $c(1)$ (mmol l^{-1}) bei $a(\text{HCl}) = 1,0$

Tabelle 2. Variation des Anions für die Fälle H^+ und Zn^{2+} , jeweils der Aktivität 1,0 in der Donorphase und **1** ($c_1 = 0,222 \text{ mmol l}^{-1}$) als Ionophor

Donorphase ($a = 1,0$)	$J \cdot 10^9$ ($\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-1}$)
HCl	830 ± 160
HNO_3	830 ± 160
H_2SO_4	1400 ± 400
ZnCl_2	420 ± 130
$\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$	5 ± 1
$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	27 ± 7
ZnSO_4	22 ± 6
ZnI_2	197 ± 60

Tabelle 3. $J \cdot 10^9$ ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) mit **1—6** für ausgewählte Kationen ($a = 1$), $c_1 = 0,222 \text{ mmol l}^{-1}$

Ionophor	H^+	Na^+	K^+	Zn^{2+}
1	830 ± 160	$2,5 \pm 0,8$	$2,2 \pm 0,7$	420 ± 130
2	890 ± 160	11 ± 3		111 ± 33
3	14 ± 4	13 ± 4		$8,3 \pm 2$
4	2780 ± 830	$0,0 \pm 0,1$		$2 \cdot 10^5 \pm 5 \cdot 10^4$
5	890 ± 270	50 ± 15	39 ± 13	611 ± 180
6		$1,9 \pm 0,6$	44 ± 13	

Tabelle 2 enthält die Daten für eine Variation des Anions im Falle des Protons und des Zinkions für **1**, in Tabelle 3 und 4 werden die Flußdichten für einige Kationen im Falle der Verbindungen **1**—**7** einander gegenübergestellt.

Tabelle 4. J (mol m⁻² s⁻¹) mit **7** für ausgewählte Kationen ($a=1$), $c_7=0,222$ mmol l⁻¹

Kation	$J \cdot 10^9$	Stabilitätsklasse ¹⁶
Cu ⁺⁺	180 ± 40	II
Zn ⁺⁺	107 ± 20	III
Mg ⁺⁺	2,1 ± 0,4	IV
Ca ⁺⁺	2,0 ± 0,4	V

Diskussion

1. Zum Transportphänomen

Nimmt man zunächst **1** als eine typische Modellverbindung für apolar substituierte, verdinoide Gallenfarbstoffe, so werden die einleitend skizzierten Erwartungen erfüllt, daß Vertreter dieser Verbindungsklasse befähigt sind, Kationen zu transportieren. Die Kinetik des Transports zeigt eine lineare Abhängigkeit des transportierten Kations von der Zeit. Ebenso ergibt sich ein linearer Zusammenhang zwischen den Größenordnungen von Flußdichte und Aktivität in der Donorphase. Ein Anstieg von etwa 2, wie er aus Abb. 1 folgt und auch die lineare Abhängigkeit der Flußdichte von der Konzentration an **1** (Abb. 2) weisen darauf hin, daß es sich beim beobachteten Phänomen um einen durch einen Ionophor katalysierten Transport eines Kations durch eine Flüssigkeitsmembrane handelt. Die vorliegenden Ergebnisse sind jenen bei Kronenethern erhaltenen¹⁷ analog. Wie zu erwarten, zeichnet sich eine Selektivität des Ionophors für bestimmte Ionen ab, die wie Tab. 1 zeigt, etwa einen Bereich von drei bis vier Größenordnungen umfaßt. Abgesehen vom Proton, das auf Grund der mäßigen Basizität von **1** ausgezeichnet transportiert wird, werden Alkali- und Erdalkalimetallkationen nur in geringfügigem Maße transportiert — etwa in dem Ausmaß, wie Na⁺ vom Kronenether **6** (s. Tab. 3, bzw. vgl.¹⁷). In der Reihe der Übergangsmetallkationen treten dramatische Bevorzugungen von z. B. Fe⁺⁺, Cr⁺⁺⁺, Cu⁺⁺ und Zn⁺⁺ gegenüber Mn⁺⁺, Co⁺⁺, Ni⁺⁺ und Cd⁺⁺ auf.

2. Zum Transportmechanismus

Zunächst geben die durch Abb. 1 und 2 dokumentierten Abhängigkeiten den Hinweis, daß sich der Transport von Kationen mit Hilfe von **1** durch die einfache Beziehung (1)^{17,18}

$$J = D \cdot k \cdot K \cdot c_I \cdot a_D^2 \cdot l^{-1} \quad (1)$$

mit J = Flußdichte, D = Diffusionskonstante, k = Verteilungskoeffizient des Komplexes zwischen den Phasen, K = Gleichgewichtskonstante für die Komplexbildung, c_I = Ionophorkonzentration, l = Länge der Diffusionsschicht und a_D = Aktivität des Kations in der Donorphase, beschreiben läßt. Dieser Beziehung liegt die Vorstellung zugrunde, daß das Kation (bzw. ein Ionenpaar) mit dem Ionophor zu einem Komplex reagiert, der durch die apolare Phase transportiert und an der Grenzfläche zur Empfängerphase wieder zerlegt wird¹⁸. Diese Beziehung weist aber ihrerseits darauf hin, daß eine Proportionalität zur Leichtigkeit, mit der die Komplexbildungsreaktion eintritt, vorliegen sollte. Die Korrelation der Flußdichten mit dem Grad der Komplexbildung zwischen den Kationen und **1** im vorgegebenen Zweiphasensystem der Tab. 1 bestätigt dies. Für eine quantitative Korrelation von Flußdichten und Komplexbildungskonstanten liegen keine ausreichenden Daten vor — offensichtlich sind letztere aber noch gering genug, um die direkte Proportionalität zwischen beiden zu gewährleisten — in Bereichen sehr großer Komplexstabilität wäre ja mit einer Verringerung der Flußdichten zu rechnen, wie dies für Kronenetherkomplexe dokumentiert ist¹⁹. Wie Tab. 4 zeigt, sind aber auch die enormen Unterschiede in der Komplexstabilität von **7** mit Kationen nicht ausreichend, um dieses Phänomen zu veranlassen — auch hier beobachtet man nur die einfache Proportionalität.

Im Falle des Protons besteht über die Struktur des Transportkomplexes, wie das UV-VIS-Spektrum der Membranphase und der Anstieg von **2** in Abb. 1 zeigen, kein Zweifel: es handelt sich dabei um $\mathbf{1} \cdot \text{H}^+ \cdot \text{A}^-$. Die Flußdichten im Falle von HCl, H_2SO_4 und HNO_3 stimmen innerhalb der Meßgenauigkeit überein. Im Falle des Zn^{++} -Kations wird, wie Tabelle 2 zeigt, Chlorid um etwa zwei Größenordnungen besser transportiert als das Nitrat (vgl.¹⁷). Diese unterschiedlichen Transportraten haben ein Gegenstück in der spektroskopisch ableitbaren Komplexbildungstendenz analog Spalte vier, Tab. 1: sie geht völlig parallel, d. h. mit ZnCl_2 in der Donorphase ist die Komplexbildung vollständig, mit $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ oder ZnSO_4 eben erst zu erkennen. Einen Hinweis auf die Struktur des Transportkomplexes vermittelt auch der Vergleich der UV-VIS-Spektren des in der Lit.² dokumentierten $\mathbf{1} \cdot \text{Zn}$ und der Spektren, die man bei „Titration“ der

Membranphase von **1** mit Donorphasen steigenden Zn^{++} -Aktivität erhält (s. Abb. 3): offenbar sind im „Primärkomplex“ noch Anionen als Extraganden vorhanden.

3. Ionophorstruktur und Transporteigenschaften

Wie aus den Daten der Tabellen 1 und 3 folgt, ist es in erster Linie die verdinoide Struktur, die für den Transport von Übergangsmetallionen wesentlich ist. Die chelatbildende Eigenschaft²¹ der Partial-

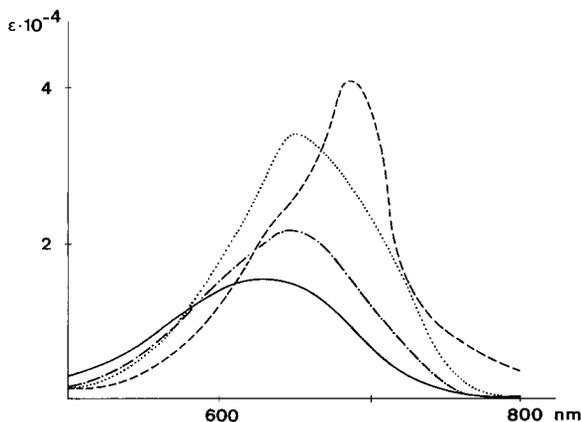


Abb. 3. UV-VIS-Spektrum von **1** (—), **1**·Zn(---) in $CHCl_3$ und „Titration“ der $CHCl_3$ -Donorphase mit Lösungen von $ZnCl_2$ der Aktivitäten 0,5(— · —) und 1,0(···)

struktursysteme Pyromethen und 5-[5*H*-Pyrrol-2-methylen]-3-pyrrolin-2-on — wie sie durch **5** und **4** repräsentiert werden — scheint dabei die dominierende Rolle zu spielen. Wohl sind bei rubinoiden Systemen, wie **2** und **3**, noch nennenswerte Effekte gegeben, sie sind jedoch den verdinoiden Strukturen in dieser Eigenschaft deutlich unterlegen.

Daß im Detail Abstufungen vorliegen, wie sie aus unterschiedlichen Basizitäten oder sterischen Erfordernissen resultieren können, zeigt der Vergleich von **2** und **3** bzw. **1** und **5** (Tab. 3). Bemerkenswert ist hier auch, daß die Transporteigenschaften der Gallenpigment-Ionophore in vielen Fällen in derselben Größenordnung liegen, wie für Kronenether (z. B. **6**), z. T. aber sogar wesentlich ausgeprägter sind. Ein Extremfall dürfte hier das Tripyrrin **4** sein, das offenbar ein Optimum an Chelatbildungseigenschaften mit einem Optimum an sterischer Anpassungsfähigkeit vereinigt.

4. Ausblick

Die in der vorliegenden Studie gewonnenen Ergebnisse lassen Zielsetzungen bzw. Hypothesen in drei Richtungen zu:

a) Die unterschiedlichen Transportcharakteristika von verdinoiden und rubinoiden Pigmenten für biologisch wichtige Spurenelemente der Übergangsmetallreihe verleiten zur Spekulation, daß hierin ein Grund für die Entwicklung des physiologischen Verdin-Rubin-Reduktionssystems²² im Laufe der Evolution vorliegen könnte. Die hohen Transportraten dieser Kationen mit verdinoiden Pigmenten könnten zu einer relativ raschen Verarmung des Organismus an Spurenelementen führen — ein Vorgang, der durch die Reduktion zum rubinoiden Strukturssystem wirkungsvoll unterdrückt werden kann. Umgekehrt könnte man auch an eine Nutzung dieser Eigenschaft für Entgiftungen (Co, Cu) denken — verdinoide Gallenfarbstoffe sind ja nicht toxisch⁷.

b) Die hohen Transportraten von verdinoiden Pigmenten im Falle von biologisch relevanten Übergangsmetallkationen und auch eine z. T. beträchtliche Selektivität lassen an die Entwicklung ionenselektiver Elektroden denken. Wie die Tabelle 3 zeigt, ist hier offenbar durchaus die Möglichkeit gegeben, Liganden den Anforderungen strukturell anzupassen. Orientierende Experimente haben gezeigt, daß z. B. durch Einbettung von **4** in Polyethylenfolien²³ brauchbare Elektroden hoher Selektivität für Zn erhalten werden können.

c) Wie *Plieninger* im Falle von Tripyrrinderivaten eindrucksvoll dokumentiert hat²⁴, können diese Liganden für die Extraktion seltener Übergangsmetallionen, z. B. aus Meerwasser eingesetzt werden. Verdinoide- bzw. tripyrrinische Systeme könnten aber durchaus auch geeignete Liganden für entsprechende Membranseparationsanlagen abgeben.

Dank

Für die Bereitstellung von Mitteln für den Ankauf von CA-Registerbänden sei der Oesterreichischen Nationalbank gedankt. Für Diskussionen und Ratschläge sind wir den Herren Prof. Dr. K. *Winsauer* und Doz. Dr. R. *Sobczak*, Universität Linz, sehr verbunden.

Literatur

- ¹ 43. Mitt.: *Falk H., Müller N.*, Mh. Chem. **113**, 111 (1982).
- ² *Pedersen C. J.*, J. Amer. Chem. Soc. **89**, 2495, 7017 (1967).
- ³ Siehe z. B. die Übersichten: *DeJong F., Reinhardt D. N.*, Adv. Phys. Org. Chem. **17**, 279 (1980); *Vögtle F., Weber E.*, Kontakte **1977** (1), 11; *Weber E., Vögtle F.*, Kontakte **1977** (3), 36; **1978** (2), 16; *Vögtle F., Weber E., Elben U.*, Kontakte **1978** (3), 32; **1980** (2), 36; *Weber E., Vögtle F.*, Kontakte **1981** (1), 24.

- ⁴ Falk H., Grubmayr K., Haslinger E., Schlederer T., Thirring K., Mh. Chem. **109**, 1451 (1978).
- ⁵ Übersicht: Subramanian J., Fuhrhop J.-H., in: The Porphyrins, II, 255 (Dolphin D., Hrsg.). New York: Academic Press. 1978.
- ⁶ Falk H., Grubmayr K., Synthesis **1977**, 614.
- ⁷ McDonagh A. F., The Porphyrins, VI, 446.
- ⁸ p. A., Merck.
- ⁹ Falk H., Grubmayr K., Mh. Chem. **108**, 625 (1977).
- ¹⁰ Falk H., Gergely S., Hofer O., Mh. Chem. **105**, 853 (1974).
- ¹¹ „Merck“.
- ¹² Barnett G. H., Hudson M. F., Smith K. M., J. Chem. Soc. Perkin Trans. I **1975**, 1401.
- ¹³ Rosano H. L., Schulmann J. H., Weisbuch J. B., Ann. N. Y. Acad. Sci. **92**, 457 (1961).
- ¹⁴ Shedlovsky T., Shedlovsky L., in: Physical Methods of Chemistry, II A, 163 (Weissberger A., Rossiter B., Hrsg.). New York: Wiley-Interscience. 1971.
- ¹⁵ Die Aktivitätskoeffizienten stammen aus den einschlägigen „Gmelin“-Bänden, sie wurden in einzelnen Fällen für hohe Konzentrationsbereiche extrapoliert.
- ¹⁶ Buchler J. W., Porphyrins and Metalloporphyrins (Smith K. M., Hrsg.), S. 157. Amsterdam: Elsevier. 1975.
- ¹⁷ Lamb J. D., Christensen J. J., Izatt S. R., Bedke K., Astin M. S., Izatt R. M., J. Amer. Chem. Soc. **102**, 3399 (1980).
- ¹⁸ Reusch C. F., Cussler E. L., AIChE J. **19**, 736 (1973).
- ¹⁹ Lamb J. D., Christensen J. J., Oscarson J. L., Nielsen B. L., Asay B. W., Izatt R. M., J. Amer. Chem. Soc. **102**, 6820 (1980).
- ²⁰ Falk H., Schlederer T., Ann. Chem. **1979**, 1560.
- ²¹ Fischer H., Orth H., Die Chemie des Pyrrols, II/1, 1. New York: Johnson Reprint Corp. 1968.
- ²² McDonagh A. F., Palma L. A., Schmid R., Biochem. J. **194**, 273 (1981).
- ²³ Z. B.: Erne D., Schenker K. V., Ammann D., Pretsch E., Simon W., Chimia **35**, 178 (1981).
- ²⁴ Plieninger H., Stumpf K., Chem. Ber. **103**, 2562 (1970); Plieninger H., Khan S. A., Chem. Ber. **108**, 2475 (1975); Munder S., Pfaff E., Plieninger H., Sander W., Ann. Chem. **1980**, 2031.