

Durch quantitative Verfolgung dieser Umlagerungs- und Kondensationsreaktionen beim Erhitzen im Hochvakuum konnte gezeigt werden, daß die unter Abspaltung von Essigsäureanhydrid verlaufende Kondensation den Vorrang vor der Umlagerung hatte. Durch vorsichtiges stufenweises Erhitzen — vorsichtiges Erhitzen war notwendig, weil die Umlagerung manchmal explosionsartig unter Zertrüm-

merung der Apparatur vor sich ging — bis auf 400° C wurde ein elfenbein-farbenes Pulver gewonnen, das keine —Si—O—COCH₃-, wohl aber —Si—O—Si- und —Si—COCH₃-Gruppen enthielt. Bei diesem Produkt war das Verhältnis von Silicium zu H_{NaOH} immer noch 1 : 1, es waren also noch Si—Si-Bindungen vorhanden. Bevor aber alle Si—Si-Bindungen durch Umlagerung gespalten worden waren, waren die gesamten Acetatgruppen als Essigsäureanhydrid entwichen.

Weitere Reaktionen des [SiBr₂]_x, insbesondere mit Alkoholen und Phenolen, werden z. Z. eingehend untersucht.

Einschließungs-Erscheinungen in Lösungen¹

Von W. LAUTSCH, W. BANDEL und W. BROSER

Aus dem Institut für Organische Chemie der Freien Universität Berlin, Berlin-Dahlem

(Z. Naturforschg. **11 b**, 282—291 [1956]; eingegangen am 29. Februar 1956)

Folgende Stoffpaare wurden im Hinblick auf ihre Fähigkeit zur Bildung von Einschlußverbindungen und Einschlußsystemen spektrophotometrisch untersucht:

1. α -Dextrin-Tetrachlorsalizil, 2. Rinderserum-Albumin-Tetrachlorsalizil, 3. Globin-Tetrachlorsalizil, 4. Globin-Methylorange, 5. α -Dextrin-Buttergelb, 6. Na-Desoxycholat-Buttergelb, 7. Na-Desoxycholat-Methylorange, 8. α -Dextrin-Methylorange-Adrenalin.

Dabei zeigte sich, daß die Stoffpaare (1) und (5) Einschlußverbindungen im Molverhältnis 1 : 1, die Stoffpaare (3) und (4) solche im Molverhältnis 1 : 2 und die Stoffpaare (6) und (7) Einschlußverbindungen im Molverhältnis 2 : 1 bilden, während das Stoffpaar (2) ein Einschlußsystem liefert. Im Beispiel (8) wurde eine indirekte Methode zur Ermittlung von Einschlußgleichgewichten ungefärbter Verbindungen aufgezeigt; es ergab sich dabei, daß auch das Adrenalin mit dem α -Dextrin eine Einschlußverbindung im Molverhältnis 1 : 1 bildet.

In einer Reihe von Arbeiten²⁻⁵ konnte gezeigt werden, daß es nicht nur sinnvoll ist, auch in Lösungen von Einschluß-Verbindungen zu reden, sondern daß die bisher untersuchten Einschluß-Verbindungen in Lösung aus *einem* Molekül Cyclodextrin (Wirt) und *einem* Gastmolekül zusammengesetzt sind. Weiter konnte gezeigt werden, daß die Wechselwirkung zwischen Wirt und Gast auf die hohe elektrische Feldstärke im Hohlraum des Cyclodextrins zurückzuführen ist, was zur Folge hat, daß dort polare und polarisierbare Moleküle gebunden werden und daß chemische Gleichgewichte durch Bildung von Einschluß-Verbindungen auf die Seite der stärker polaren bzw. leichter polarisierbaren Reaktionsteilnehmer verschoben werden. Ferner ergaben die Untersuchungen an

dem Stoffpaar Rinderserum-Albumin-Methylorange, daß es sich hierbei um ein System handelt, welches sich ähnlich verhält wie die Einschluß-Verbindungen, aber nicht einem einfachen MWG. folgt, weshalb wir es als ein „Einschluß-System“ bezeichneten und annahmen, daß im Albuminmolekül konzentrationsabhängige „Einschlußbezirke“ vorhanden sind, die von dem Gast aufgesucht werden.

Im Rahmen unserer Untersuchungen über Fermentmodelle interessierte es uns, festzustellen, ob es natürliche Eiweißstoffe gibt, die nicht nur zur Bildung von Einschlußsystemen, sondern auch von stöchiometrisch definierten Einschluß-Verbindungen befähigt sind. Ferner wollten wir prüfen, ob auch die Desoxycholsäure bzw. ihr Anion Einschluß-Verbin-

¹ W. Lautsch u. Mitarbb., 23. Mitt. über Fermentmodelle. 22. Mitt. s. W. Broser u. W. Lautsch, Z. Naturforschg., im Druck.

² W. Broser u. W. Lautsch, Naturwissenschaften **40**, 220 [1953].

³ W. Broser u. W. Lautsch, Z. Naturforschg. **8 b**, 711 [1953].

⁴ W. Broser, Z. Naturforschg. **8 b**, 722 [1953].

⁵ W. Broser u. Ch. Bahr, Z. Naturforschg. **10 b**, 121 [1955].

dungen in Lösung zu bilden vermag, und drittens galt es, eine Methode auszuarbeiten, die es erlaubt, auch bei ungefärbten Verbindungen Einschließungs-Effekte nachzuweisen.

A. Einschluß-Verbindungen des Globins

Kuhn und Birkofer⁶ fanden durch Dialyseversuche, daß ein Mol. Globin zwei Mol. Tetrachlorsalizil bindet. Dies deutet darauf hin, daß das Globin zur Bildung von stöchiometrisch definierten Molekül-Verbindungen befähigt ist. Deshalb wurden die Systeme Globin-Tetrachlorsalizil und Globin-Methylorange spektrophotometrisch untersucht. Zuvor wurde aber — um den Anschluß an die früheren Versuche zu gewinnen — das Verhalten des Tetrachlorsalizils gegenüber α -Dextrin und Rinderserum-Albumin untersucht.

1. α -Cyclodextrin-Tetrachlorsalizil

Auf die bereits früher beschriebene Weise³ wurde das System α -Dextrin-Tetrachlorsalizil untersucht. Abb. 1 gibt das Spektrum von Tetrachlorsalizil ohne und mit Cyclodextrin wieder. Man erkennt die Blauverschiebung. In Abb. 2 ist die Abhängigkeit der Extinktion bei 426 m μ von Logarithmus der Cyclodextrin-Konzentration dargestellt. Man kann aus dem Kurvenverlauf entnehmen, daß α -Dextrin- und Tetrachlorsalizil eine Einschlußverbindung im Mol.-Verhältnis 1:1 mit $p_K = 3,9$ bilden. Tetrachlorsalizil verhält sich also gegenüber Cyclodextrin genau so, wie die bisher untersuchten anderen Farbstoffe.

2. Rinderserum-Albumin-Tetrachlorsalizil

In gleicher Weise wurde das System Rinderserum-Albumin-Tetrachlorsalizil untersucht. Aus Abb. 3

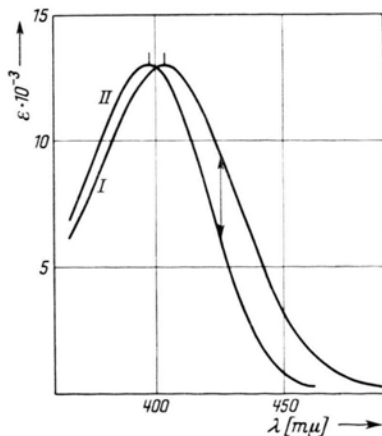


Abb. 1. Spektrum von Tetrachlorsalizil ohne (I) und mit α -Dextrin (II). $c_F = 4 \cdot 10^{-5}$; $c_D = 0,01$; $p_H 9,0$.

⁶ R. Kuhn u. L. Birkofer, Chem. Ber. **84**, 658 [1951].

geht die Rotverschiebung des Spektrums bei Zusatz von Rinderserum-Albumin hervor. Abb. 4 zeigt, daß die gemessenen Werte (ausgezogene Kurve mit Kreisen) nicht mit einem einfachen MWG. (punktierter Kurve) verträglich sind. Tetrachlorsalizil verhält sich also gegenüber Rinderserum-Albumin genau so wie das bereits früher untersuchte Methylorange.

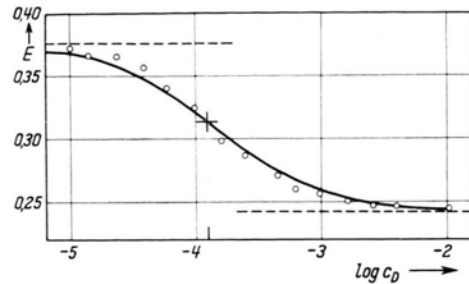


Abb. 2. Gleichgewicht α -Cyclodextrin-Tetrachlorsalizil $c_F = 4 \cdot 10^{-5}$; $p_H 9,0$; $\lambda = 425,6 \text{ m}\mu$; $d = 1 \text{ cm}$; 20° C . $p_K = 3,9$ entspr. $K_F = 1,3 \cdot 10^{-4}$.

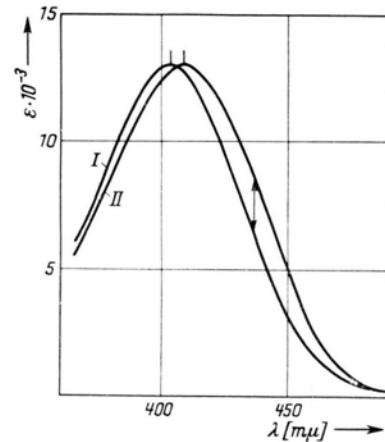


Abb. 3. Spektrum von Tetrachlorsalizil ohne (I) und mit Rinderserum-Albumin (II). $c_F = 4 \cdot 10^{-5}$, $p_H 9,0$, 1% Serumalbumin.

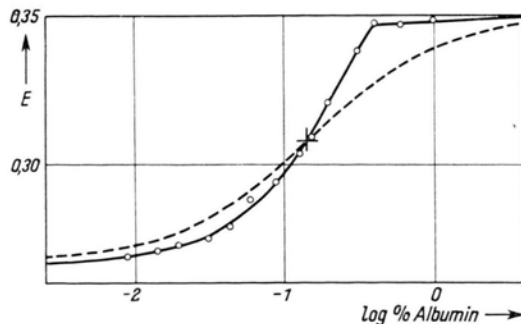


Abb. 4. Gleichgewicht Rinderserum-Albumin-Tetrachlorsalizil $c_F = 4 \cdot 10^{-5}$, $p_H 9,0$, $\lambda = 436 \text{ m}\mu$, $d = 1 \text{ cm}$, 20° C .

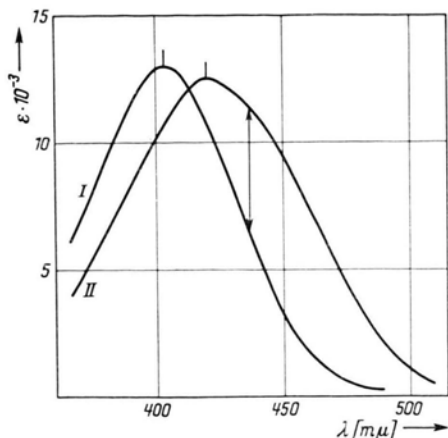


Abb. 5. Spektrum von Tetrachlorsalizil ohne (I) und mit Rinderglobin (II). $c_F = 4 \cdot 10^{-5}$, 1% Globin, p_H 9,0.

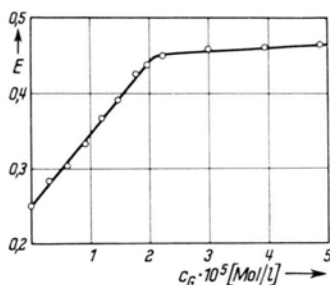


Abb. 6. System Rinderglobin-Tetrachlorsalizil. $c_F = 4 \cdot 10^{-5}$, p_H 9,0, $\lambda = 436,5$ m μ , $d = 1$ cm, 20° C.

3. Globin-Tetrachlorsalizil

Aus Abb. 5 erkennt man, daß die Absorptionsbande des Tetrachlorsalizils in Globinlösung um 17 m μ nach längeren Wellenlängen hin verschoben ist. Globin beeinflusst also das Spektrum des Tetrachlorsalizils in ähnlicher Weise wie Rinderserum-Albumin. Trägt man jedoch die Änderung der Extinktion bei 437 m μ gegen die Konzentration des Globins auf (Abb. 6), so erhält man einen völlig anderen Kurvenverlauf als beim Dextrin oder Albumin. Man erkennt, daß die Extinktion bis zu einer bestimmten Globinkonzentration linear ansteigt, um sich dann praktisch nicht mehr zu ändern. Dieser Verlauf beweist, daß das Gleichgewicht Globin-Farbstoff völlig auf seiten des Adduktes liegt; d. h., daß bei Zugabe von steigenden Mengen Globin jedes Globinmolekül solange die maximale Menge an Farbstoff aufnimmt, bis aller Farbstoff verbraucht ist; ein weiterer Zusatz von Globin kann dann zu keiner Extinktionsänderung führen. Am Knickpunkt der Kurve ist also die Äquivalenz zwischen Globin und Farbstoff gegeben. Aus

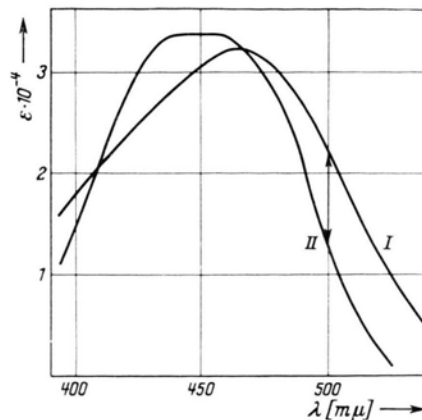


Abb. 7. Spektrum von Methylorange ohne (I) und mit Rinderglobin (II). $c_F = 2 \cdot 10^{-5}$, 1% Globin, p_H 7,3.

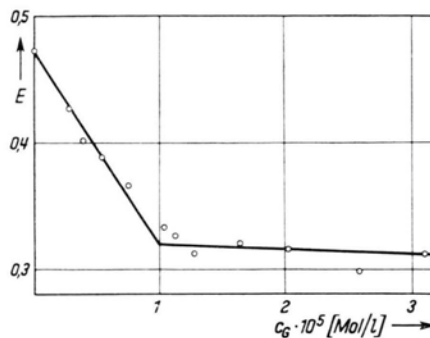


Abb. 8. System Rinderglobin-Methylorange. $c_F = 2 \cdot 10^{-5}$, p_H 7,3, $\lambda = 500$ m μ , $d = 1$ cm, 20° C.

der Abbildung entnimmt man daher, daß ein Mol. Globin ($M = 68\,000$) genau zwei Mol. Tetrachlorsalizil bindet.

4. Globin-Methylorange

Um sicherzustellen, daß es sich bei dem sehr stabilen Globin-Tetrachlorsalizil wirklich um eine Mol-Verbindung handelt und keine Verknüpfung über Atombindungen — etwa über die Ketogruppe des Farbstoffes — vorliegt, wurde zum Vergleich das System Globin-Methylorange (Anion) untersucht. Abb. 7 läßt erkennen, daß das Spektrum von Methylorange durch Globinzusatz in ähnlicher Weise verändert wird (Blauverschiebung!), wie wir es früher beim Zusatz von Cyclodextrinen und Rinderserum-Albumin beobachtet haben. Die Auftragung der Extinktion bei 500 m μ gegen die Globinkonzentration (Abb. 8) ergibt dagegen in Analogie zum System Globin-Tetrachlorsalizil einen geknickten Kurvenverlauf, aus dem man das Mol.-Verhältnis $1 : 2$ ablesen kann.

B. Einschluß-Verbindungen der Desoxycholsäure

Die Desoxycholsäure vermag mit einer großen Anzahl verschiedener Stoffe kristallisierte Einschlußverbindungen, die Choleinsäuren, zu liefern^{7, 8}. Nach den Befunden von Kratky und Mitarbb.^{9, 10} sowie von Giacomello und Caglioti^{11, 12} besitzen diese Choleinsäuren röhrenartige Hohlräume, die von den annähernd halbkreisförmigen Desoxycholsäure-Mol. in paarweiser Anordnung gebildet werden. In diese Hohlräume werden die Mol. der anderen Komponente eingeschlossen. Der Aufbau der Choleinsäuren ist also denen der kristallisierten Cyclodextrin-Einschlußverbindungen ähnlich, bei denen der Kanal durch geldrollen-artige Aufeinanderlagerung der bereits einen Hohlraum enthaltenden Cyclodextrin-Mol. gebildet wird. Ein Paar Desoxycholsäure-Mol. ist also einem Cyclodextrin-Mol. gleichzusetzen. Es ist deshalb zu erwarten, daß, wenn die Desoxycholsäure überhaupt Einschlußverbindungen in Lösung bildet, diese nicht das Mol.-Verhältnis 1:1, sondern das Verhältnis etwa 1:2 oder 1:4 besitzen. Das bedeutet aber, daß die Konzentrations-Abhängigkeit der Extinktion komplizierter als bei den bisher untersuchten Cyclodextrin-Addukten ist. Deshalb wählten wir als voraussichtliches Gast-Mol. nicht wie bisher einen leicht löslichen Farbstoff, sondern das in Wasser praktisch unlösliche Buttergelb (*p*-Dimethyl-amino-azobenzol), das — wie Vorversuche ergaben — durch Zusatz einer ganzen Reihe Substanzen (vgl. Tab. 1), darunter auch Desoxycholsäure und Cyclodextrin, in Lösung gebracht werden kann, da durch diese Wahl die Auswertung der Meßkurve wesentlich vereinfacht wird.

1. α -Dextrin-Buttergelb

Um den Anschluß an die bisher untersuchten Einschluß-Verbindungen in Lösung zu gewinnen, bei denen ausschließlich Cyclodextrine als Wirts-Mol. Verwendung fanden, wurde zunächst die Löslichkeitserhöhung, die das Buttergelb durch Zusatz von α -Dextrin erfährt, quantitativ untersucht.

Zu diesem Zweck wurde überschüssiges festes Buttergelb mit wäßrigen Lösungen steigender α -Dextrinkonzentration bis zur Gleichgewichts-Einstellung geschüttelt. Nach dem Abfiltrieren des ungelösten Farbstoffes wurden die jeweiligen Extinktionen bei 414 $m\mu$ als Maß für die in Lösung gegangene Menge Farbstoff gemessen. Wie man aus Abb. 9 erkennt, steigt die Extinktion und damit auch die Löslichkeit linear mit der Dextrinkonzentration an. Dies stimmt

⁷ H. Wieland u. H. Sorge, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **97**, 1 [1916].

⁸ H. Rheinbold, J. prakt. Chem. N. F. **153**, 313 [1939]; vgl. E. H. Huntress u. R. F. Phillips, J. Amer. chem. Soc. **71**, 458 [1949].

⁹ Y. Go u. O. Kratky, Z. Kristallogr. Mineralog.-Petrogr., Abt. A **92**, 310 [1935]; Z. physik. Chem. Abt. B

Substanz	Löslichkeitserhöhung von Buttergelb beobachtet (+) nicht beobachtet (—)
α -Cyclodextrin	++++
β -Cyclodextrin	++++
Glucose	—
Lösliche Stärke nach Zulkowsky (Merck) (erst oberhalb 10% merklich)	+
Serumalbumin (Rind)	+++
Globin (Rind)	+++++
γ -Serumglobulin (Rind)	—
Poly-DL (-Glutaminsäure — phenylalanin 3:2) Na-Salz	+++
Poly-DL-Glutaminsäure Na-Salz	—
Poly-L-Glutaminsäure Na-Salz	—
DL-Phenylalanin Na-Salz	—
Desoxycholsäure Na-Salz	+++++
Polyvinylalkohol	—

Tab. 1. Löslichkeitserhöhung von Buttergelb durch verschiedene Substanzen.

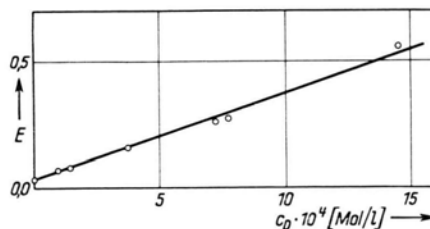
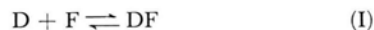


Abb. 9. Löslichkeit von Buttergelb in Abhängigkeit von der α -Cyclodextrin-Konzentration. $\lambda = 414 m\mu$, $d = 1 cm$, $20^\circ C$ (Wasser).

mit dem bereits früher³ für die Cyclodextrin-Einschlußverbindung ermittelten Gleichgewicht



überein ($D =$ Cyclodextrin, $F =$ Farbstoff, $DF =$ Einschluß-Verbindung), für das das MWG.

$$\frac{[D] \cdot [F]}{[DF]} = K_{DF} \quad (1)$$

gilt. Durch Einführung der Extinktionen folgt daraus

$$E = \frac{\epsilon_{DF} \cdot [F] \cdot C_D}{K_{DF}} + E_F \quad (2)$$

26, 439 [1934].

¹⁰ O. Kratky u. G. Giacomello, Mh. Chem. **69**, 427 [1936].

¹¹ G. Giacomello, Atti Reale Accad. naz. Lincei, Rend. VI, **27**, 101 [1938].

¹² V. Caglioti u. G. Giacomello, Gazz. chim. ital. **69**, 245 [1939].

E = Gesamtextinktion der Lösung, E_F = Extinktionsanteil des freien Farbstoffes, ε_{DF} = Extinktionskoeffizient der Einschluss-Verbindung, c_D = Dextrin-Bruttokonzentration.

Da $[F]$ als Sättigungskonzentration eine Konstante ist, folgt, daß E linear mit c_D ansteigt. Da andererseits $\varepsilon_{DF} [F] \approx E_F$ läßt sich nach entsprechender Umformung von Gl. (2) zu

$$K_{DF} = \frac{c_D \cdot E_F}{E - E_F}, \quad (3)$$

in der alle Größen bis auf K_{DF} meßbar sind, auch K_{DF} berechnen. Man erhält dabei $K_{DF} = 1,03 \cdot 10^{-4}$ Mol/l entspr. $pK_{DF} = 4,0$, also einen Wert, der durchaus mit dem entsprechenden Wert des Systems α -Dextrin-Methylorange ($pK_{DF} = 3,95$) vergleichbar ist. Damit ist bewiesen, daß die Löslichkeitserhöhung des Buttergelbs durch Cyclodextrin auf die Bildung einer Einschluss-Verbindung im Mol.-Verhältnis 1:1 zurückzuführen ist.

2. Na-Desoxycholat-Buttergelb

Die Löslichkeitserhöhung durch Desoxycholsäure in 0,5-n. Natriumcarbonatlösung wurde auf analoge Weise quantitativ untersucht. Wie man aus Abb. 10 erkennt, erhält man hier keine gerade Kurve, d. h. eine Einschluss-Verbindung im Mol.-Verhältnis 1:1 bildet sich nicht aus. Man gelangt aber zu einer befriedigenden Deutung des Kurvenverlaufes, wenn man annimmt, daß sich zunächst zwei Desoxycholsäure-Anionen D zusammenlagern und dann ein Farbstoffmolekül F einschließen.



Durch Kombination der hierfür geltenden MWGG.

$$\frac{[D]^2}{[D_2]} = K_{D_2} \quad (4) \quad \text{und} \quad \frac{[D_2] \cdot [F]}{[D_2F]} = K_{D_2F} \quad (5)$$

erhält man

$$\frac{[D]^2}{[D_2F]} = \frac{K_{D_2} \cdot K_{D_2F}}{[F]}. \quad (6)$$

Ersetzt man über die Stöchiometrie und Gl. (5) $[D]$ durch die Bruttokonzentration der Desoxycholsäure c_D , so ergibt sich

$$\frac{\left(c_D - \frac{2K_{D_2F}[D_2F]}{[F]}\right)^2}{[D_2F]} = \frac{K_{D_2} \cdot K_{D_2F}}{[F]}. \quad (7)$$

Drückt man $[D_2F]$ durch die Extinktion aus, so folgt unter Zusammenfassung der konstanten Glieder zu

$$a \equiv \frac{E_F}{K_{D_2} \cdot K_{D_2F}}, \quad (8)$$

$$b \equiv \frac{2K_{D_2F}}{E_F}, \quad (9)$$

$$E = a(c_D - bE)^2. \quad (10)$$

Aus a und b erhält man K_{D_2} nach

$$K_{D_2} = \frac{2}{ab}. \quad (11)$$

Durch Ansetzen von Gl. (10) für zwei Wertepaare von c_D und E läßt sich unter Eliminierung von a die Konstante b berechnen. Trägt man dann E gegen $(c_D - bE)^2$ auf, so sollte eine Gerade erhalten werden. Dies ist auch, wie Abb. 11 zeigt, der Fall.

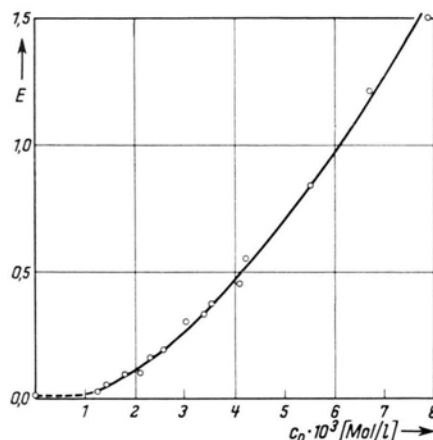


Abb. 10. Löslichkeit von Buttergelb in Abhängigkeit von der Desoxycholat-Konzentration. $\lambda = 414 \text{ m}\mu$, $d = 1 \text{ cm}$, 20° C , 0,5-n. Na_2CO_3 .

Aus der Steigung dieser Geraden erhält man un-
schwer a . Man gelangt auf diese Weise mit den er-
mittelten Werten $a = 4,0 \cdot 10^4 \text{ l}^2/\text{Mol}^2$; $b = 1,08 \cdot$
 10^{-3} Mol/l zu

$$K_{D_2} = 4,6 \cdot 10^{-2} \text{ Mol/l},$$

$$pK_{D_2} = 1,34.$$

Da zur Ermittlung von K_{D_2F} die Kenntnis von E_F erforderlich ist, dieses aber nur sehr ungenau gemessen werden kann, ist die Angabe eines exakten Wertes für K_{DF_2} nicht möglich, er liegt aber in der Größenordnung von etwa 10^{-5} Mol/l , was wiederum den Verhältnissen bei den Cyclodextrinen ähnelt.

Die experimentellen Ergebnisse stehen also im Einklang mit dem Ansatz nach Schema (II) und (III); sie sind jedoch noch kein eindeutiger Beweis, daß tatsächlich in Lösung das Addukt D_2F vorliegt, da sich zeigen läßt, daß sich die Meßpunkte innerhalb der Fehlergrenze auch unter Annahme z. B. einer Trimerisation zu D_3F deuten lassen.

3. Na-Desoxycholat-Methylorange

Das Spektrum von Methylorange in 0,5-n. Soda-lösung zeigt in Gegenwart von Desoxycholationen eine Blauverschiebung von $45\text{ m}\mu$ (vgl. Abb. 12). Die Messung des Gleichgewichts erfolgte in der üblichen Weise. Aus Abb. 13 erkennt man, daß die Kurvenform anders als bei den Cyclodextrinen ist, eine Einschluß-Verbindung im Mol.-Verhältnis 1 : 1 also nicht

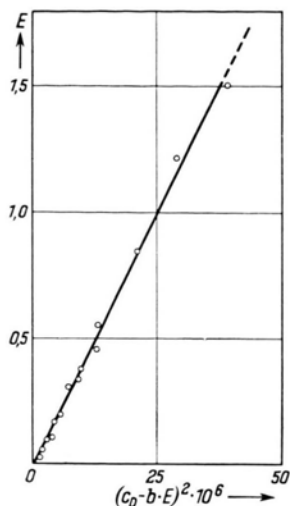


Abb. 11. System Na-Desoxycholat-Buttergelb. Überprüfung der Gl. (10). Punkte berechnet mit $b = 1,08 \cdot 10^{-3}$.

vorliegt. Macht man aber wie beim System Desoxycholat-Buttergelb den Ansatz, daß 2 Desoxycholat-Anionen ein Farbstoff-Mol. aufnehmen und rechnet man nach Gl. (4) unter Anwendung des im vorigen Abschnitt ermittelten Wertes $K_{D_2} = 4,6 \cdot 10^{-2}$ Mol/l die Gleichgewichts-Konzentration $[D_2]$ aus, so erhält man beim Auftragen der Extinktion gegen $\log [D_2]$ annähernd wieder die übliche S-Kurve (vgl. Abb. 14), aus der man $pK_{D_2F} = 3,46$ entnehmen kann. Dieser Wert ist durchaus mit den bei den Cyclodextrinen (α -Dextrin: $pK_{DF} = 3,95$; β -Dextrin: $pK_{DF} = 3,60$) gefundenen⁴ vergleichbar.

C. Die Ermittlung von Einschluß-Gleichgewichten bei ungefärbten Verbindungen

Das Adrenalin ist nicht nur farblos, sondern sein UV-Spektrum zeigt in Gegenwart von α -Dextrin auch keine meßbare Verschiebung der Absorptionsbande. Um zu klären, ob das Adrenalin zur Einschluß-Verbindungs-Bildung befähigt ist, entwickelten wir ein indirektes Verfahren. Wir gingen dabei von der Überlegung aus, daß das Gleichgewicht eines Farbstoffes mit Cyclodextrin bei Zugabe von Adrenalin

gestört werden muß, wenn dieses eine Einschluß-Verbindung bildet.

Aus dem MWG. des Adrenalins

$$\frac{[A][D]}{[DA]} = K_{DA} \quad (12)$$

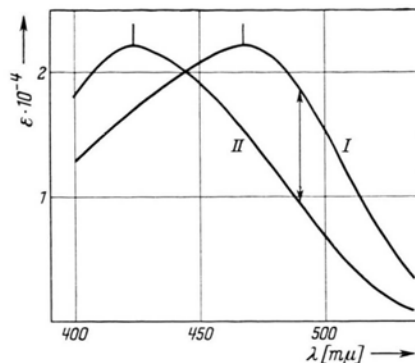


Abb. 12. Spektrum von Methylorange ohne (I) und mit Na-Desoxycholat (II). $c_F = 2 \cdot 10^{-5}$, $c_D = 0,1, 0,5-n.$ Na_2CO_3 .

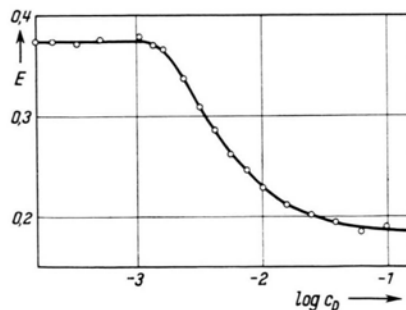


Abb. 13. Gleichgewicht Na-Desoxycholat-Methylorange. $c_F = 2 \cdot 10^{-5}$, 0,5-n. Na_2CO_3 , $\lambda = 490\text{ m}\mu$, $d = 1\text{ cm}$, 20° C .

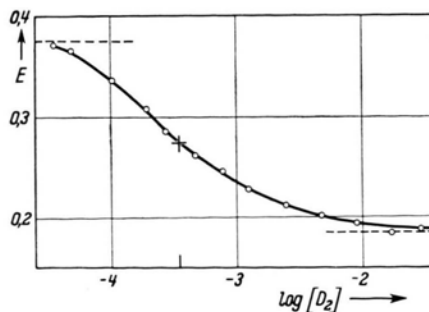


Abb. 14. Gleichgewicht Na-Desoxycholat-Methylorange. $[D_2]$ = Konzentration der assoziierten Desoxycholsäure-Mol., berechnet aus dem Gleichgewicht Na-Desoxycholat-Buttergelb.

und den stöchiometrischen Beziehungen

$$c_A = [A] + [DA], \quad (13)$$

$$c_D = [D] + [DA], \quad (14)$$

A = Adrenalin, D = Cyclodextrin, c_A = Bruttokonz. des Adrenalins, c_D = Bruttokonz. des Cyclodextrins, erhält man

$$K_{DA} = \frac{[D] \cdot (c_A - c_D + [D])}{c_D - [D]} \quad (15)$$

Da c_A und c_D willkürlich gewählt werden können, ist die Dextrin-Gleichgewichts-Konzentration $[D]$ die einzige Unbekannte. Diese ist aber über das Gleichgewicht des gleichzeitig anwesenden Farbstoffes [vgl. Gl. (2) in Arbeit I. c. ³]

$$\frac{E - E_{DF}}{E_F - E} = \frac{K_{DF}}{[D]} \quad (16)$$

mit den Extinktionen verknüpft und damit der Messung zugänglich. Zweckmäßigerweise wird man hierfür einen Farbstoff anwenden, bei dem $E_F - E_{DF}$ möglichst groß sind. Dies ist für Methylorange in saurer Lösung der Fall ⁴. Weiterhin ist c_D so zu wählen, daß geringe Änderungen in $[D]$ möglichst große Extinktionsänderungen bewirken. Dies ist in der Umgebung des Wendepunktes der Gleichgewichts-Kurve (vgl. z. B. Abb. 2) gewährleistet; d. h. man macht am besten $c_D \approx K_{DF}$. Um sicherzustellen, daß tatsächlich Gl. (15) und damit auch Gl. (12) gelten, ist es erforderlich, c_A über einen möglichst großen Bereich zu variieren.

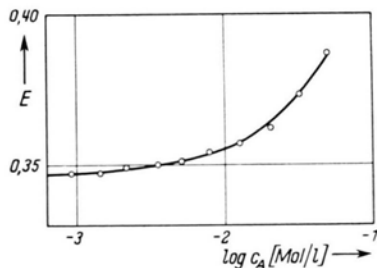


Abb. 15. System α -Dextrin-Methylorange-Adrenalin. $c_F = 10^{-5}$, $c_D = 10^{-3}$, 0,08-n. HCl, 508 m μ , $d = 1$ cm, 20° C.

In Abb. 15 ist dementsprechend die Extinktions-Veränderung des Systems α -Dextrin-Methylorange bei Zugabe steigender Mengen an Adrenalin wiedergegeben. Aus den einzelnen Meßwerten ergeben sich unter Zugrundelegung der in einem Kontrollversuch erneut bestimmten Größen

$$K_{DF} = 1,3 \cdot 10^{-3} \text{ entspr. } pK_{DF} = 2,88.$$

$$E_F = 0,568; E_{DF} = 0,038$$

für K_{DA} die in Tab. 2 angegebenen Werte.

$c_A \cdot 10^3$	K_{DA}
3,55	0,14
5,14	0,15
7,95	0,14
12,65	0,15
20,4	0,16
31,8	0,14
50,0	0,13
Mittelwert	0,144

Tab. 2. Werte für K_{DA} .

Man erkennt, daß innerhalb der Meßgenauigkeit K_{DA} einen konstanten Wert besitzt. Damit ist bewiesen, daß Adrenalin mit α -Dextrin nach Gl. (12) eine Einschluß-Verbindung im Mol.-Verhältnis 1:1 bildet.

D. Diskussion

1. Einschluß-Verbindungen des Globins

Aus den spektrophotometrischen Untersuchungen geht einwandfrei hervor, daß das Globin in Lösungen sowohl mit Tetrachlorsalizil als auch mit Methylorange stöchiometrisch definierte Mol.-Verbindungen im Verhältnis 1:2 bildet, die derartig stabil sind, daß sie auch nicht dissoziieren, wenn das Globin nur im großen Unterschub vorhanden ist. Dies steht in bester Übereinstimmung mit den Dialyseversuchen von Kuhn und Birkofer ⁶. Aus der Tatsache, daß — wie wir in einem Kontrollversuch feststellen konnten — weder natives noch resynthetisiertes Rinder-Oxyhämoglobin ein Addukt mit Tetrachlorsalizil zu bilden vermögen, kann geschlossen werden, daß die Gast-Mol. die Plätze der Häme in Hämoglobin einnehmen, wobei allerdings die Frage offen gelassen werden muß, weshalb Globin einerseits vier Hämin-Mol., andererseits dagegen nur zwei Tetrachlorsalizil- bzw. Methylorange-Mol. addieren kann.

Die Tatsache, daß die Banden der Globin- gegenüber der Albuminlösung nicht nur stärker verschoben, sondern auch wesentlich verbreitert sind, deutet neben der hohen Stabilität der Addukte darauf hin, daß die Wechselwirkungen zwischen Wirt und Gast beim Globin bedeutend stärker als beim Albumin sind. Es darf daher wohl geschlossen werden, daß die Farbstoff-Mol. in Einschlußbezirken des Globins festgehalten und dort mehr oder minder vollständig umschlossen werden. Auf diese Weise kommen die Feldkräfte stärker zur Geltung als bei einer einfachen

Assoziation, wodurch die Veränderung der Spektren und die hohe Stabilität der Addukte ihre plausible Erklärung findet.

2. Einschluß-Verbindungen der Desoxycholsäure

Wie bereits oben bemerkt, kann allein aus dem Kurvenverlauf nicht mit völliger Sicherheit geschlossen werden, daß tatsächlich 2 Desoxycholatanionen 1 Farbstoff-Mol. binden, da die Kurven auch unter der Annahme einer Tri- oder Tetramerisation deubar sind. Jedoch spricht der Befund⁷, daß zur Auflösung von einem Mol. Natriumpalmitat zwei Mol. Natrium-desoxychololat erforderlich sind, für das Mol.-Verhältnis 2:1. Deshalb wird man sich also vorzustellen haben, daß sich das Farbstoff-Mol. in einem Hohlraum befindet, der von zwei halbkreisförmigen Desoxycholationen gebildet wird.

3. Einschluß-Gleichgewicht des Adrenalins

Am Beispiel des Adrenalins konnte gezeigt werden, daß es möglich ist, auch in den Fällen, bei denen sich das Addukt nicht durch eine Änderung des Spektrums zu erkennen gibt, Einschluß-Gleichgewichte nicht nur nachzuweisen, sondern auch einwandfrei zu messen. Im Falle des Systems Adrenalin- α -Dextrin liegt eine Einschluß-Verbindung im Mol.-Verhältnis 1:1 vor. Wie man auch aus dem Wert der Konstante $K_{DA} = 0,143 \text{ Mol/l}$ entspr. $pK_{DA} = 0,85$ entnehmen kann, ist diese Einschluß-Verbindung viel weniger stabil als die bisher untersuchten. Es ist daher verständlich, daß bei der geringen Wechselwirkung eine Änderung des Spektrums nicht zu beobachten ist.

E. Experimenteller Teil

1. Die Messungen

Die Aufnahme der Spektren und die optische Konzentrationsbestimmung erfolgte in der bereits früher³ beschriebenen Weise.

Das System α -Cyclodextrin-Tetrachlorsalizil

Je 2 ml einer $8 \cdot 10^{-5}$ -m. Lösung von Tetrachlorsalizil in Glykokoll-Puffer von p_H 9,0 (lt. Tabelle Küster-Thiel, doppelte Konz.) wurden mit x ml einer 0,02-m. Cyclodextrin-Lösung und mit $(2-x)$ ml Wasser versetzt. Da es praktisch nicht möglich ist, stets ausreichend genau gleiche Farbstoffmengen einzupipettieren, wurde die Menge der einpipettierten Lösungen durch Wägung ermittelt und daraus die genaue Farbstoffkonzentration der Meßlösung berechnet. Die gemessenen Extinktionen wurden dann rechnerisch auf den Sollwert $4 \cdot 10^{-5}$ korrigiert.

Die Systeme Rinderserum-Albumin-Tetrachlorsalizil und Rinderglobin-Tetrachlorsalizil

Die Meßlösungen wurden in ganz analoger Weise wie beim Cyclodextrin hergestellt. Statt der 0,02-m. Dextrinlösung wurde eine 2-proz. Serumalbumin- bzw. 0,68-proz. Globinlösung benutzt. Die Extinktionen wurden 4 Stdn. nach Herstellung der Lösungen gemessen.

Das System Rinderglobin-Methylorange

Je 2 ml einer $4 \cdot 10^{-5}$ -m. Lösung von Methylorange in Wasser wurden mit x ml einer 0,68-proz. Lösung von Globin in 2/15-m. Phosphatpuffer von p_H 7,3 und $(2-x)$ ml 2/15-m. Phosphatpuffer versetzt. Die Extinktionen wurden 4 Stdn. nach Herstellung der Lösungen gemessen.

Das System α -Cyclodextrin-Methylorange

Je 1 ml einer $5 \cdot 10^{-5}$ -m. Methylorange-Lösung wurde mit je 2 ml 0,2-n. HCl, mit x ml einer 0,025- bzw. 0,0025-m. Dextrin-Lösung und $(2-x)$ ml Wasser versetzt. Die genaue Menge der einpipettierten Lösungen wurde durch Wägung ermittelt und daraus die genaue Farbstoff- und Dextrinkonzentration der Meßlösung berechnet. Die Dichte sämtlicher Lösungen wurde gleich 1 gesetzt. Der dadurch verursachte Fehler liegt unterhalb 1 Prozent. Die gemessenen Extinktionen wurden rechnerisch auf die Farbstoffkonzentrationen $c_F = 10^{-5}$ korrigiert. Eine geringfügige Extinktion des Dextrins (Trübung durch Verunreinigungen) wurde für $c_D = 10^{-2}$ getrennt ermittelt, für alle übrigen Dextrinkonzentrationen nach dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnet und von den Extinktionen der jeweiligen Meßlösungen abgezogen. Als Nulllösung diente Wasser.

Das System α -Cyclodextrin-Methylorange-Adrenalin

Je 1 ml einer $5 \cdot 10^{-5}$ -m. Methylorange-Lösung wurde mit je 2 ml einer 0,0025-m. Dextrin-Lösung, mit y ml 0,125-m. Adrenalin / 0,325-n. HCl-Lösung und $(2-y)$ ml 0,2-n. HCl versetzt. Die genaue Menge der einpipettierten Lösungen wurde durch Wägung ermittelt und daraus die genaue Methylorange- und AdrenalinKonzentration berechnet. Die Dichte sämtlicher Lösungen wurde gleich 1 gesetzt. Die gemessenen Extinktionen wurden rechnerisch auf den Wert $c_F = 10^{-5}$ korrigiert. Eine geringe Extinktion des Adrenalins (Verunreinigungen) wurde für $c_A = 5 \cdot 10^{-2}$ getrennt ermittelt, für die übrigen AdrenalinKonzentrationen nach dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnet und von den Extinktionen der jeweiligen Meßlösungen abgezogen. Als Nulllösung diente Wasser. Adrenalin allein (ohne Dextrin) ändert die Extinktion des Methylorange nicht.

Das System Na-Desoxychololat-Methylorange

Je 2 ml einer $4 \cdot 10^{-5}$ -m. Lösung von Methylorange in Wasser wurden mit x ml einer $2 \cdot 10^{-2}$ - bzw. $2 \cdot 10^{-1}$ -m. Lösung von Desoxycholsäure in 1-n. Na_2CO_3 und mit $(2-x)$ ml 1-n. Na_2CO_3 -Lösung versetzt. Die gemessenen

Extinktionen wurden auf die Farbstoffkonzentration $c_F = 2 \cdot 10^{-5}$ korrigiert.

Das System Na-Desoxycholat-Buttergelb

Je 20 ml einer Lösung von Desoxycholsäure in 0,5-n. Na_2CO_3 wurden mit überschüssigem fein pulverisierten Buttergelb zur Einstellung des Lösungsgleichgewichts 12 Stdn. im Thermostaten bei 20° C geschüttelt. Die Desoxycholat-Konzentration wurde zwischen 0 und $8 \cdot 10^{-3}$ variiert. Nach dem Abfiltrieren des ungelösten Farbstoffes wurden die Lösungen zentrifugiert, da sich herausstellte, daß feinste Farbstoffteilchen selbst durch engporige Filter nicht vollständig zurückgehalten werden.

Das System α -Cyclodextrin-Buttergelb

Je 20 ml einer Lösung von α -Dextrin in dest. Wasser wurden mit festem Buttergelb 12 Stdn. bei 20° C geschüttelt. Die Dextrinkonzentration wurde zwischen 0 und $1,6 \cdot 10^{-3}$ -m. variiert. Messung der Extinktionen nach Abfiltrieren des ungelösten Farbstoffes und Klarzentrifugieren.

2. Dialyseversuche (Nacharbeitung der Kuhnschen Befunde)

Kupplung von 3,3'.5.5'-Tetrachlorsalizil mit Globin: 170 mg Rinderglobin ($2,5 \cdot 10^{-6}$ Mole) wurden in 3 ccm Wasser gelöst und mit Natriumcarbonat auf p_H 9 gebracht. 1,9 mg Tetrachlorsalizil ($5 \cdot 10^{-6}$ Mole) wurden in 3 ccm Wasser gelöst, das durch 1-n. Na_2CO_3 gleichfalls auf p_H 9 gebracht war. Die Einstellung des p_H -Wertes erfolgte mit Hilfe von Indikatorpapier. Die vereinigten Lösungen wurden in einem Cellophanschlauch bei +4° C vier Tage gegen Wasser von p_H 9 dialysiert. Das Volumen der Außenlösung betrug etwa 100 ccm. Die Lösung im Schlauch blieb tiefgelb; an die Außenlösung wurde kein Farbstoff abgegeben. Bei Anwendung von mehr als zwei Molen Tetrachlorsalizil auf ein Mol Globin ließ sich der Überschub durch Dialyse leicht entfernen.

Verhalten des Symplexes gegen Borat

Tetrachlorsalizil löst sich in überschüssigem Boratpuffer von p_H 9 zu einem farblosen Borsäurekomplex. Nach Zugabe von Globinlösung färbt sich die Lösung innerhalb weniger Min. gelb, indem sich der Tetrachlorsalizil-Globin-Symplex bildet. Letzterer ist also stabiler als der Tetrachlorsalizil-Borat-Komplex.

Verhalten des Symplexes gegen Hämin

Eine aus 170 mg Globin und 1,9 mg Tetrachlorsalizil gewonnene dialysierte Symplexlösung wurde bei p_H 9 mit 6,5 mg Chlorhämin in verdünnter Natriumcarbonatlösung (p_H 9) versetzt und bei +4° C gegen Wasser von p_H 9 dialysiert. (Volumen der Außenlösung ca. 100 ccm.) Selbst nach 4 Tagen war in der Außenlösung weder Hämin noch Tetrachlorsalizil feststellbar.

100 mg krist. Oxyhämoglobin (Rind) und 1 mg Tetra-

chlorsalizyl, beides in Wasser von p_H 9 gelöst, gaben beim Dialysieren im Cellophanschlauch den Farbstoff an die Außenlösung ab. Ebenso verhalten sich resynthetisiertes Methämoglobin und resynthetisiertes Oxyhämoglobin. Eine frisch bereitete Lösung von 6,5 mg Hämin in möglichst wenig 1-n. Na_2CO_3 wurde mit einigen ccm Wasser verdünnt und mit der Lösung von 170 mg Globin in 3—4 ccm Wasser vereinigt. Es erfolgt spontane Kupplung zu Methämoglobin. Dieses wurde bei p_H 9 mit Natriumdithionit zu Hämoglobin reduziert. Zu diesem Zweck wurde die Lösung tropfenweise mit verd. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ versetzt, bis die gelb-braune Farbe in rot-violett übergegangen war. Durch anschließendes Schütteln der Lösung mit Luft wurde Oxyhämoglobin erhalten. (Das Absorptionsspektrum in 1/15-m. Phosphatpuffer von p_H 7 zeigte die bekannten Oxyhämoglobin-Banden bei 543 $m\mu$ und 578 $m\mu$). Je 170 mg Globin wurden wie oben mit Hämin zu Methämoglobin bzw. Oxyhämoglobin gekuppelt und mit je 1,9 mg Tetrachlorsalizyl in verd. Natriumcarbonatlösung von p_H 9 versetzt. In beiden Fällen dialysierte das gelbe Diketon in die Außenlösung.

3. Präparativer Teil

Rinderglobin

Das Globin wurde unter Benutzung der Vorschriften von Anson und Mirsky¹³, Schenck¹⁴ und Drabkin¹⁵ gewonnen.

Eigenschaften des gereinigten Globins

Klar löslich in Wasser von p_H 5—10. Nicht fällbar durch Sättigung der neutralen oder alkalischen Lösung mit NaCl oder durch 40-proz. Sättigung mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. (Aus sauren Lösungen bewirkt bereits ein geringer NaCl-Zusatz Fällung.) Während die Lösungen sehr empfindlich sind und durch Schütteln oder Erwärmen schnell denaturiert werden, ist das trockene Präparat stabiler und selbst nach mehrtäg. Erhitzen auf 110° in seinen Löslichkeits-Eigenschaften praktisch unverändert.

Eine Probe wurde 10 Stdn. bei 110° und 15 Torr über P_2O_5 getrocknet. Der Wassergehalt betrug 4,5 Prozent. Durch Kupplung mit Hämin in verd. Natriumcarbonatlösung erhält man Methämoglobin, nach Reduktion mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ und anschließendem Schütteln mit Luft Oxyhämoglobin. Die Maxima der α - und β -Bande des resynthetisierten Oxyhämoglobins lagen bei 578 $m\mu$ und 543 $m\mu$ (p_H 7), stimmten also mit den Werten für natives Oxyhämoglobin überein.

Rinderoxyhämoglobin

Das Oxyhämoglobin wurde in Anlehnung an die Arbeitsweise von Heidelberger¹⁶ und Aszódi¹⁷ gewonnen. (Hämolyse mit Toluol, Auslösen der Kristallisation durch Alkohol.)

Cyclodextrine

Die Cyclodextrine wurden nach der Vorschrift von Freudenberg, Plankenhorn und Knau-

¹³ M. L. Anson u. A. E. Mirsky, J. gen. Physiol. **13**, 469 [1930].

¹⁴ E. G. Schenck, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol. **150**, 160 [1930].

¹⁵ D. L. Drabkin, J. biol. Chemistry **158**, 721 [1945].

¹⁶ M. Heidelberger, J. biol. Chemistry **53**, 31 [1922].

¹⁷ Z. Aszódi, Biochem. Z. **252**, 212 [1932].

ber¹⁸ durch Abbau der Kartoffelstärke mit *Bacillus macerans* hergestellt. Die spezifischen Drehungen stimmten innerhalb der Fehlergrenzen mit dem von Freudenberg angegebenen $[\alpha]_D = 149,0 \pm 1$ für α -Dextrin und $[\alpha]_D = 158,8 \pm 1$ für β -Dextrin überein.

Desoxycholsäure

Ein käufliches Präparat (Merck) wurde ohne weitere Reinigung verwendet.

α -Chlorhämin

Hämin wurde aus Rinderblut nach Schälfejeff (modifiziert) gewonnen (Nencki und Zaleski¹⁹). Das Rohprodukt wurde nach der von Fischer und Orth²⁰ angegebenen Methode umkristallisiert.

Tetrachlorsalizil (3.3'.5.5'-Tetrachlor-2.2'-dihydroxybenzil)

Durch Chlorierung von Salizil in Eisessig gewonnen (Kuhn und Birkofer⁶). Das Präparat wurde 3-mal aus Eisessig umkristallisiert. Orange-gelbe Nadelchen vom Schmp. 207°.

Dibromsalizil (5.5'-Dibrom-2.2'-dihydroxybenzil)

Durch Bromierung von Salizil in Eisessig gewonnen (Kuhn, Birkofer und Moeller²¹). Das Präparat wurde 3-mal aus Eisessig umkristallisiert. Zitronengelbe biegsame Nadeln vom Schmp. 212—213°.

¹⁸ K. Freudenberg, E. Plankenhorn u. H. Knauber, Liebigs Ann. Chem. **558**, 1 [1945].

¹⁹ M. Nencki u. J. Zaleski, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **30**, 390 [1900].

Buttergelb (*p*-Dimethylamino-azobenzol)

Der durch Kupplung von diazotiertem Anilin mit Dimethylanilin gewonnene Farbstoff wurde 3-mal aus Alkohol umkristallisiert. Goldgelbe Blättchen von Schmp. 117°.

Methylorange (*p*-Dimethylamino-azobenzol-*p'*-sulfonsaures Na)

Käufliches Methylorange (Merck) wurde 2-mal aus Wasser umkristallisiert.

Rinderserum-Albumin und γ -Rinderserum-Globulin

Es wurden reinste Präparate der Behring-Werke Marburg verwendet.

L-Adrenalin

Käufliches Adrenalin besitzt infolge von Oxydationsprozessen einen schwach rötlichen Farbton und muß daher für die optischen Messungen umgefällt werden. Hierzu wurde 1 g Adrenalin (Schuchardt München) mit 0,5 g Oxalsäure p.a. in 25 ccm Wasser gelöst und mit 5-proz. Ammoniak wieder ausgefällt. Nach dem Absaugen und Waschen mit Wasser, Alkohol und Äther erhält man das Adrenalin als rein weißes Pulver (ca. 0,8 g). Trocknen im Vak.Exs. über CaCl₂.

²⁰ H. Fischer u. H. Orth, Die Chemie des Pyrrols, Leipzig 1940, Bd. II, 2. Hälfte, S. 440.

²¹ R. Kuhn, L. Birkofer u. E. F. Moeller, Ber. dtsh. chem. Ges. **76**, 900 [1943].

Zur Ermittlung von Stellungsisomeren. Mitt. II¹

VON RANDOLPH RIEMSCHNEIDER²

Aus dem Institut für Organische Chemie der Freien Universität Berlin-Dahlem

(Z. Naturforschg. **11 b**, 291—301 [1956]; eingegangen am 9. Februar 1956)

In vorliegender Arbeit werden einige Aufgaben behandelt, die sich durch sinngemäße Anwendung der in Mitteilung I dieser Reihe¹ beschriebenen Methode zur Ermittlung von Stellungsisomeren lösen lassen.

Aufgabe 1

Wieviel und welche stellungsisomeren Acetyl-, Äthyl- und Acetyl-äthyl-benzole sind theoretisch möglich?

Lösung

Aus der gestellten Aufgabe geht hervor, daß stellungsisomere Benzol-Substitutionsprodukte mit Summenformeln³ gesucht werden, deren Indizes für H

und die Substituenten sind:

6 0 0

5 1 0

4 2 0

3 3 0

4 1 1

3 2 1

2 2 2.

¹ Mitt. I: Z. Naturforschg. **11 b**, 228 [1956].

² Anschrift: Berlin-Charlottenburg 9, Bolivarallee 8.

³ Unter Summenformeln verstehen wir, wie in Mitt. I

dieser Reihe¹ ausgeführt wurde, rationale Formeln, bei denen Atome der Substituenten und des Grundkörpers nicht addiert sind.