

die Analyse der punktuellen Größe  $H(r_C)$  aus, während für quantitative Angaben der Verlauf von  $H(r)$  im Bindungsbereich berücksichtigt werden muß<sup>[13]</sup>.

Eingegangen am 28. März,  
in veränderter Fassung am 14. Mai 1984 [Z 783]

CAS-Registry-Nummern:

$\text{C}_2\text{H}_6$ : 74-84-0 /  $\text{CH}_3\text{NH}_2$ : 74-89-5 /  $\text{CH}_3\text{OH}$ : 67-56-1 /  $\text{CH}_3\text{F}$ : 593-53-3 /  $\text{H}_2\text{O}_2$ : 7722-84-1 /  $\text{F}_2$ : 7782-41-4.

- [1] J. M. Savariault, M. S. Lehmann, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 1298.
- [2] J. D. Dunitz, P. Seiler, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 7056.
- [3] a) P. Chakrabarti, P. Seiler, J. D. Dunitz, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 7378; b) J. D. Dunitz, W. B. Schweizer, P. Seiler, *Helv. Chim. Acta* 66 (1983) 123.
- [4] a) P. Coppens, E. D. Stevens, *Adv. Quantum Chem.* 10 (1977) 1; b) P. Coppens, *Angew. Chem.* 89 (1977) 33; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 16 (1977) 32; c) J. D. Dunitz: *X-ray Analysis and the Structure of Organic Molecules*. Cornell University Press, Ithaca, NY 1979.
- [5] Schwierigkeiten ergeben sich u. a. bei der Untersuchung von Ionen mit delokalisierte Ladung, z. B. Kationen oder Anionen von Cyclopolyenen.
- [6] Die Bedeutung des Laplace-Feldes lässt sich über die Definition der zweiten Ableitungen verständlich machen. Im eindimensionalen Falle gilt:

$$\lim_{\Delta x \rightarrow 0} [\rho(x) - \frac{1}{2}[\rho(x - \Delta x) + \rho(x + \Delta x)]] = \\ -\frac{1}{2} \lim_{\Delta x \rightarrow 0} [(\rho(x + \Delta x) - \rho(x)) - (\rho(x) - \rho(x - \Delta x))] = \\ -\frac{1}{2} (\frac{\partial^2 \rho}{\partial x^2}) \cdot \Delta x^2$$

Wenn die zweite Ableitung und damit die Krümmung von  $\rho$  negativ ist, so ist  $\rho(x)$  größer als der Durchschnittswert von  $\rho$  an allen benachbarten Punkten; P. M. Morse, H. Feshbach: *Methods of Theoretical Physics*, Bd. I, McGraw-Hill, New York 1953, S. 6.

- [7] R. F. W. Bader, *J. Am. Chem. Soc.*, im Druck.
- [8] Eine signifikante Korrelation zwischen Dichteigenschaften und den thermochemisch abgeleiteten Bindungsenergien erhält man, wenn man die gesamte im Bindungsbereich vorhandene Elektronendichte berücksichtigt. Siehe z. B. R. F. W. Bader, T. Tang, Y. Tal, F. W. Bieler-König, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 946.
- [9] Bei korrelationskorrigierten Rechnungen ist die Elektronendichte  $\rho(r)$  im Bindungsbereich kleiner als bei HF-Rechnungen (M. Breitenstein, H. Dannöhe, H. Meyer, A. Schweig, W. Zittlau in P. Coppens, M. B. Hall: *Electron Distributions and the Chemical Bond*, Plenum Press, New York 1982, S. 255). Da dies positivere Krümmungen sowohl in als auch senkrecht zur Bindungsrichtung zur Folge hat, wird eine Verbesserung der Rechnung zu einem noch größeren  $\nabla^2 \rho(r)$ -Wert führen.
- [10] Nach dem Hohenberg-Kohn-Theorem (P. Hohenberg, W. Kohn, *Phys. Rev.* 136 (1964) B864) existiert ein noch unbekannter Zusammenhang zwischen Energie und Elektronendichte.
- [11] K. Ruedenberg, *Rev. Mod. Phys.* 34 (1962) 326.
- [12] a) R. F. W. Bader, *J. Chem. Phys.* 73 (1980) 2871; b)  $G(r)$  und  $V(r)$  werden durch die Dichtematrix erster Ordnung  $\Gamma^1(r, r')$  definiert:

$$G(r) = \frac{1}{2} \nabla V \Gamma^1(r, r')|_{r=r}; \quad V(r) = \text{Spur } \tilde{\sigma}(r), \\ \tilde{\sigma}(r) = \frac{1}{2} [(\nabla V + V' \nabla) - (\nabla V' + V \nabla)] \Gamma^1(r, r')|_{r=r'}$$

Integriert über den gesamten Molekülräum ergeben  $G(r)$  und  $V(r)$  die kinetische bzw. potentielle Energie des Moleküls. Entsprechend gilt für die elektronische Molekülergie  $E = \int H(r) dr$ .

- [13] D. Cremer, E. Kraka, *Croat. Chem. Acta*, im Druck.

## CP/MAS-<sup>13</sup>C-NMR-Spektren von sklerotisierten InsektenCuticula und von Chitin\*\*

Von Martin G. Peter\*, Lothar Grün und Hans Förster

Die Sklerotisierung des Exoskeletts ist für Insekten ein lebensnotwendiger Prozeß. Dabei werden die *N*-acylierten

[\*] Priv.-Doz. Dr. M. G. Peter, L. Grün  
Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität  
Gerhard-Domagk-Straße 1, D-5300 Bonn 1

Dr. H. Förster  
Bruker Analytische Meßtechnik GmbH  
Silberstreifen, D-7512 Rheinstetten 4

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt. Wir danken Dr. R. Ziegler, Berlin, für die Chitin-Präparate und Angaben zu deren Herstellung.

Catecholamine („Diphenole“) *N*-(3,4-Dihydroxyphenyl)acetamid (*N*-Acetyl-dopamin)<sup>[1]</sup> und 3-Amino-*N*-(3,4-dihydroxyphenyl)propionamid (*N*-β-Alanyl-dopamin)<sup>[2]</sup> in der Cuticula zu reaktionsfähigen Zwischenstufen oxidiert. Nach weit verbreiteter Ansicht handelt es sich dabei um *o*-Chinone und/oder *p*-Chinonmethide, die in einer Additions-Oxidations-Kondensations-Sequenz<sup>[3]</sup> zur kovalenten Quervernetzung von Proteinen und/oder Chitin führen sollen<sup>[4]</sup>. Sklerotisierte Cuticula ist unter nicht-destruktiven Bedingungen fast völlig unlöslich, so daß es keine überzeugenden Beweise für das postulierte Konstitutionsschema gibt<sup>[5]</sup>. Zur zerstörungsfreien Analyse von komplexen unlöslichen Biopolymeren bietet sich die Festkörper-<sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie an. Mit dieser Methode ist es uns nun gelungen, erstmals Strukturinformationen über die vollständig sklerotisierte, native Cuticula von Insekten zu erhalten.

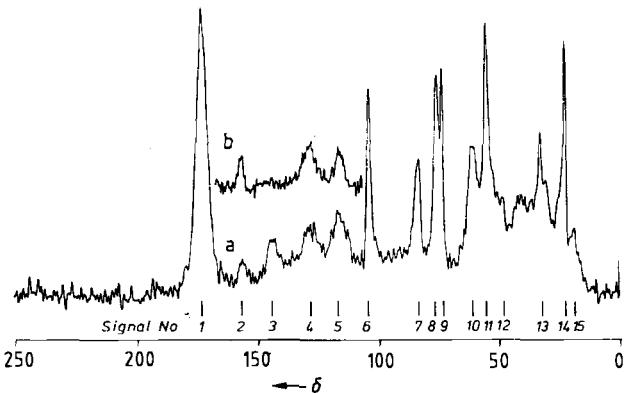


Abb. 1. a) CP/MAS-<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum der Puppencuticula (Exuvien) von *Manduca sexta*; b) Aromatenregion des CP/MAS-<sup>13</sup>C-NMR-Spektrums von *Blaberus giganteus* (Exuvien). Rotationsseitenbänder wurden unterdrückt. Meßbedingungen: Bruker CXP 300, Meßfrequenz 75.46 MHz, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-Kreuzpolarisation mit Probenrotation um den magischen Winkel, 15–20 G Entkopplungsfeldstärke, 4.9–5.1 kHz Rotationsfrequenz, 1 ms Kontaktzeit. Die sklerotisierte Cuticula wurde in eiskaltem 0.1 M Phosphatpuffer (pH 6.8) mit einem Ultra-Turrax-Gerät bei höchster Drehzahl zerkleinert. Nach Absaugen wusch man mit Wasser, Ethanol und Ether und trocknete über  $\text{P}_4\text{O}_{10}$ .

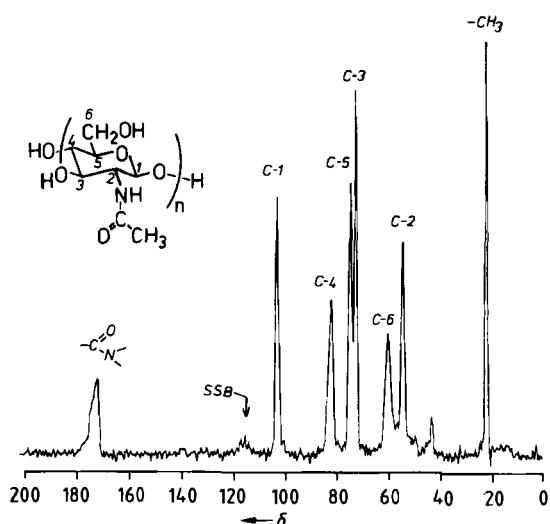


Abb. 2. CP/MAS-<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von Chitin. Rotationsseitenbänder wurden nicht unterdrückt. Die Cuticula von *Manduca-sexta*-Larven wurde zweimal wie folgt behandelt: 1 h Einlegen in 10proz. NaOH bei 80°C, Waschen mit Wasser, 1 h Einlegen in 89proz. HCOOH bei 22°C, Waschen mit Wasser, Trocknen über  $\text{P}_4\text{O}_{10}$ , Zerkleinern des übriggebliebenen Chitingerüsts mit einer Schere.

Abbildung 1a zeigt ein CP/MAS-<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von festen, tiefbraunen Puppenhüllen (Exuviae) der Tabakmotte *Manduca sexta*. Aus dem Vergleich mit dem Spektrum von Chitin (Abb. 2) folgt unmittelbar die Zuordnung der Signalgruppen 1, 6 bis 11 und 14 (siehe Tabelle 1 und [6]), die von 2-Desoxy-2-acetylaminoglucopyranosyl-Einheiten stammen. Durch Vergleich mit dem Spektrum von Rinderserumalbumin (Abb. 3) erkennt man einen Beitrag von Proteinen bei den Signalgruppen 1, 2, 4, 5 und 10 bis 15 (siehe Tabelle 1 und [7]). Was läßt sich nun über den

Tabelle 1. Zuordnung der Signalgruppen in den CP/MAS-<sup>13</sup>C-NMR-Spektren von sklerotisierter Cuticula (Abb. 1), von Chitin (Abb. 2) und von Rinderserumalbumin (Abb. 3).

Signalgruppe	$\delta$ -Werte (rel. Int.) der Signalzentren		Zuordnung
	Cuticula	Chitin	
1	171.6 (vs)	172 (m)	176.3 (vs) Acylamin in Chitin und Protein
2	154.8 (vw)	—	158.8 (vw) Phenoxy-C in Tyrosin, Guanidino-C in Arginin
3	143.6 (w)	—	— Phenoxy-C in Diphenolen
4	128.9 (m)	—	129 (m) aromat. C
5	115.6 (s)	115 [a] (vw)	115.5 (vw) C-3/5 in Tyrosin, C-4 in Imidazol, C-2/5 in Diphenolen
6	103.5 (vs)	102.3 (s)	— C-1 in $\beta$ -GlcNAc-Einheiten
7	82.3 (s)	82.3 (s)	— C-4 in $\beta$ -GlcNAc-Einheiten
8	75.3 (vs)	73.9 (vs)	— C-5 in $\beta$ -GlcNAc-Einheiten
9	73.6 (vs)	71.6 (vs)	— C-3 in $\beta$ -GlcNAc-Einheiten
10	60.0 (s)	60.0 (s)	65 (m) C-6 in $\beta$ -GlcNAc-Einheiten, $\alpha$ -C in Aminosäureresten
11	54.8 (vs)	53.6 (s)	57 (s) C-2 in $\beta$ -GlcNAc-Einheiten, $\alpha$ -C in Aminosäureresten
12	44.2 (s)	44.1 [b] (vw)	41 (s) aliph. C in Aminosäureresten
13	32.8 (s)	—	30 (s) aliph. C in Aminosäureresten
14	23.4 (vs)	22.1 (vw)	25/21 (vs) CH <sub>3</sub> in Acetyl, CH in Leucin und Isoleucin
15	19.3 (s)	—	18 (m) CH <sub>3</sub> in Alanin und Leucin

[a] Rotationsseitenband der Gruppe 1. [b] Chitin läßt sich nicht völlig proteinfrei gewinnen.

Verbleib der N-acylierten Catecholamine ableiten, die bei der Sklerotisierung in die Cuticula eingelagert werden? In den Signalgruppen 1 und 14 überlagern sich die Resonanzen der N-Acetylgruppen mit denen von Chitin. Die Signale der aliphatischen C-Atome der Seitenkette, die mit denen von Aminosäureresten zusammenfallen, sind ebenfalls nicht gesondert zu beobachten. Dagegen hat die Region aromatischer C-Atome großen diagnostischen Wert. Der Vergleich mit einem Festkörper-<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von N-Acetyldopamin<sup>[8]</sup> ergibt, daß die im Spektrum der sklerotisierten Cuticula beobachteten Signalgruppen 3 und 5 hauptsächlich von diphenolischen Partialstrukturen abzuleiten sind. Dabei handelt es sich höchstwahrscheinlich um Polyphenole, die durch oxidative Kopplung entstanden sind. Daß die Absorptionsbereiche der Gruppen 3 und 5 sehr viel breiter als die Chitin-Resonanzen sind, deutet das Vorliegen einer Vielzahl aromatischer C-Atome mit unterschiedlichen chemischen Umgebungen an. Die Zuordnung der Signalgruppen 1 bis 4 zu quartären C-Atomen ergibt sich auch aus einem Spektrum, das mit einer NQS-

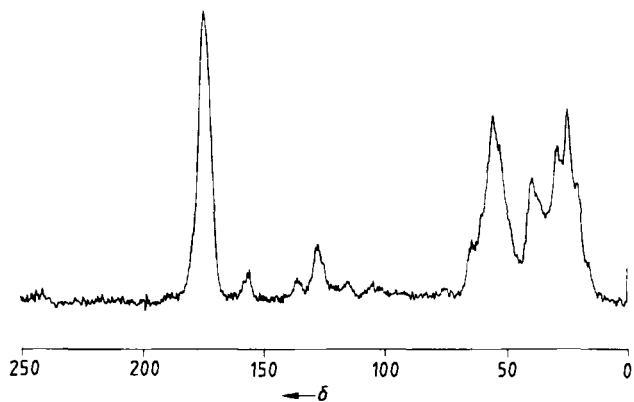


Abb. 3. CP/MAS-<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von Rinderserumalbumin (Sigma). Rotationsseitenbänder wurden unterdrückt. Meßbedingungen wie in Abb. 1.

Meßsequenz aufgenommen wurde, bei der die übrigen Resonanzen verschwinden.

Der Befund, daß die Umwandlungsprodukte der Sklerotisierungssubstanzen in der Cuticula reduziert vorliegen, ist zunächst überraschend, da er der Hypothese einer kovalenten Quervernetzung von Proteinen über Aminoquinonimine widerspricht. Die Absorptions von Imino-C-Atomen sind im Bereich von  $\delta \approx 150 - 160$  zu erwarten. In dieser Region erscheinen auch die Phenoxy-C-Atome von Tyrosin- und die Guanidino-C-Atome von Argininresten<sup>[7]</sup>. Vergleicht man die Intensitäten der Signalgruppen 2 im Cuticula- (Abb. 1a) und im Proteinspektrum (Abb. 3) mit denjenigen der Gruppe 4, so ergibt sich kein Hinweis auf größere Anteile an Aminoquinonimin-Partialstrukturen. Exuvien der Wanderheuschrecke *Locusta migratoria* haben ein analoges Festkörper-<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum. Dagegen findet man in den Exuvien der Schabe *Blaberus giganteus* wesentlich geringere Diphenol-Anteile (Abb. 1b). Offensichtlich sind die molekularen Grundlagen der Sklerotisierung der Cuticula bei einzelnen Insektenarten verschieden.

Die Frage, ob kovalente Protein-Diphenol-Verknüpfungen durch Addition von Nucleophilen an p-Chinonmethide entstanden sind, ist ohne Anwendung isotopenmarkierter Verbindungen nicht zu beantworten. – Die vorliegenden Ergebnisse sind konsistent mit der Hypothese, daß die Sklerotisierung der Cuticula durch eine Denaturierung von Strukturproteinen durch Polyarene zustande kommt. Analogien zur Tanningerbung oder zur Stabilisierung pflanzlicher Strukturen durch Lignin liegen nahe<sup>[5, 9]</sup>.

Eingegangen am 5. März,  
in veränderter Fassung am 30. Mai 1984 [Z 735]

- [1] P. Karlson, C. E. Sekeris, *Nature (London)* 195 (1962) 183.
- [2] T. L. Hopkins, T. D. Morgan, Y. Aso, K. J. Kramer, *Science* 217 (1982) 364.
- [3] H. W. Wanzlick, *Angew. Chem.* 76 (1964) 313; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 3 (1964) 401.
- [4] Neuere Übersichten: P. C. J. Brunet, *Insect Biochem.* 10 (1980) 467; H. Lipke, M. Sugamaran, W. Henzel, *Adv. Insect Physiol.* 17 (1983) 1.
- [5] M. G. Peter, *Insect Biochem.* 10 (1980) 221; M. G. Peter, *Habilitationsschrift*, Universität Bonn 1982.
- [6] R. L. Dudley, C. A. Fyfe, P. J. Stephenson, Y. Deslandes, G. K. Hamer, R. H. Marchessault, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 2469.
- [7] A. Allerhand, *Acc. Chem. Res.* 11 (1978) 469.
- [8] Zur Herstellung von N-Acetyldopamin siehe [5]. Umkristallisiert aus 0.2 N Essigsäure;  $F_p = 78 - 80^\circ\text{C}$ ; CP/MAS-<sup>13</sup>C-NMR (75.46 MHz):  $\delta = 174.0$  (CONH), 145.0 (C-3), 144.2 (C-4), 131.9 (C-1), 123.5 (C-6), 118.5 (C-5), 116.0 (C-2), 44.0 ( $\alpha$ -C), 33.5 ( $\beta$ -C), 24.0 ( $\text{CH}_3$ ).
- [9] H. Niemz, *Angew. Chem.* 86 (1974) 336; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 13 (1974) 313; D. S. Himmelsbach, F. E. Barton, *J. Agric. Food Chem.* 28 (1980) 1203.