

SPECIALIA

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces brèves communications. – Für die Kurzmitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed in the authors' brief reports. – Ответственность за короткие сообщения несёт исключительно автор. – El responsable de los informes reducidos, está el autor.

Cu²⁺-Adeninring-Wechselwirkung in den Cu²⁺-Komplexen von Adenosin-5'- und Adenosin-3'-monophosphat

Im Zusammenhang mit unseren Untersuchungen über die katalytische Aktivität verschiedener Cu²⁺-Nucleotid-Komplexe^{1,2} ist es von Bedeutung, dass in den Cu²⁺-Komplexen von ADP³ und ATP³ Cu²⁺ ausser am Phosphatrest⁴ noch am N(7) des Adeninringes koordiniert ist, wie von COHN und HUGHES⁵ bzw. STERNLICHT, SHULMAN und ANDERSON⁶ auf Grund von Kernresonanzmessungen sowie von SCHNEIDER, BRINTZINGER und ERLIENMEYER⁷ mit Hilfe von UV-Differenzspektren nachgewiesen wurde.

Von EICHORN, CLARK und BECKER⁸ wurde kürzlich ebenfalls mit NMR-Messungen gezeigt, dass auch im Cu²⁺-Desoxyadenosin-monophosphat-System Cu²⁺ an den Adeninring vorwiegend über N(7) gebunden ist, daneben möglicherweise aber auch noch über N(1) oder N(3).

Beim Cu²⁺-AMP-5'-Komplex³ wurde eine Wechselwirkung zwischen Cu²⁺ und dem N(7) des Adeninringes schon von COHN und HUGHES⁵ festgestellt. Diese Koordination des Cu²⁺ an den Adeninring lässt sich auch mit Differenzspektren nachweisen, wie von uns kürzlich gezeigt wurde¹ (Figur 1).

Vergleicht man Kalottenmodelle, so scheint beim Cu²⁺-AMP-5'-Komplex – im Gegensatz zum Cu²⁺-AMP-3'-Komplex^{3,9} – eine gleichzeitige Koordination von Cu²⁺ an Phosphat und N(7) noch als möglich; ein Vergleich dieser beiden Komplexe ist daher im Hinblick auf die Koordinationsmöglichkeiten des Cu²⁺ mit dem Adeninring interessant¹⁰.

Das vom Cu²⁺-AMP-3'-System⁹ aufgenommene Differenzspektrum (Figur 2) zeigt einen ähnlichen Verlauf wie dasjenige des Cu²⁺-AMP-5'-Komplexes (vgl. Figur 1). Aber auch die Protonierung des Adeninringes an N(1)¹¹ in AMP-5' und AMP-3' lässt sich mit Hilfe von Differenzspektren nachweisen, die wie erwartet identisch verlaufen (Figur 2). Dass die Extinktion der Differenzspektren ein recht gutes Mass für den Ausbildungsgrad des «Komplexes» liefert, zeigen die mit ihrer Hilfe bestimmten Aciditätskonstanten: der für AMP-5' und auch für AMP-3' gefundene Wert von pK_A = 3,8¹² stimmt mit den auf anderem Weg bestimmten Werten¹³ befriedigend überein.

Überraschend ist nun der ungefähr gleich grosse Wert der Extinktion der Differenzspektren der beiden Cu²⁺-AMP-Systeme bei ca. 275 nm, der offenbar aussagt, dass in beiden Fällen die Cu²⁺-Adeninring-Wechselwirkung von derselben Grössenordnung ist¹⁴. Da eine Chelatbildung vom 3'-Phosphat zum N(7) höchst unwahrscheinlich ist, bleiben folgende Möglichkeiten: (1) Es treten intermolekulare Assoziate mit zum Beispiel Phosphat-Cu²⁺-N(7)-Bindungen auf. (2) Es bilden sich relativ stabile Komplexe mit alleiniger Koordination an den Adeninring. (3) Es findet Chelatbildung mit einem der beiden übrigen N-Atome, wahrscheinlich mit N(3)¹⁵, statt.

Von diesen Möglichkeiten gilt: (1) ist unter unseren Messbedingungen ([Cu²⁺] = [AMP] = 2 · 10⁻⁴ M) unwahrscheinlich. Gegen (2) spricht, dass für eine beobachtbare Cu²⁺-Adeninring-Wechselwirkung im Cu²⁺-Adenosin-System sehr viel höhere Cu²⁺-Konzentrationen not-

wendig sind⁷, das heisst, die Phosphatgruppe beeinflusst die Komplexbildung mit dem Adeninring in den Cu²⁺-AMP-Komplexen wesentlich. Andererseits spricht dieser Befund⁷ auch gegen (1), da für eine solche «Polymerisation» die Stabilitäten der Cu²⁺-Adeninring- und der Cu²⁺-Phosphat-Bindung von derselben Grössenordnung sein müssten. Die Möglichkeit (3) wird hingegen durch diesen Befund gestützt, was durch folgenden Versuch deutlich wird: die Extinktion des Differenzspektrums nimmt mit Erhöhung des pH von 6 auf 7 zu. Mit zunehmender Ausbildung des Cu²⁺-Phosphat-Komplexes nimmt also auch die Wahrscheinlichkeit einer Koordination von Cu²⁺ an den Adeninring zu, folglich müssen zumindest Anteile als Chelate vorliegen.

Aus allen diesen Befunden lässt sich schliessen, dass in den Cu²⁺-Komplexen sowohl des AMP-5' als auch des AMP-3' das Cu²⁺ zum grössten Teil gleichzeitig am Adeninring – beim AMP-5' vorwiegend an N(7)^{5,8}, beim

¹ H. SIGEL und H. ERLIENMEYER, *Helv. chim. Acta* **49**, 1266 (1966).

² R. ZELL, H. SIGEL und H. ERLIENMEYER, *Helv. chim. Acta* **49**, 1275 (1966).

³ ADP = Adenosin-5'-diphosphat; ATP = Adenosin-5'-triphosphat; AMP-5' = Adenosin-5'-monophosphat; AMP-3' = Adenosin-3'-monophosphat.

⁴ Über die Koordination an die Phosphatgruppen vgl. H. BRINTZINGER, *Biochim. biophys. Acta* **77**, 343 (1963); *Helv. chim. Acta* **48**, 47 (1965); *J. Am. chem. Soc.* **87**, 1805 (1965); vgl. auch ⁵ und ⁶.

⁵ M. COHN und TH. R. HUGHES JR., *J. biol. Chem.* **237**, 176 (1962).

⁶ H. STERNLICHT, R. G. SHULMAN und E. W. ANDERSON, *J. chem. Phys.* **43**, 3133 (1965).

⁷ P. W. SCHNEIDER, H. BRINTZINGER und H. ERLIENMEYER, *Helv. chim. Acta* **47**, 992 (1964); P. W. SCHNEIDER und H. BRINTZINGER, *Helv. chim. Acta* **47**, 1717 (1964).

⁸ G. L. EICHORN, P. CLARK und E. D. BECKER, *Biochemistry* **5**, 245 (1966).

⁹ Das für die folgenden Untersuchungen zur Verfügung stehende Präparat war ein Gemisch aus AMP-3' und Adenosin-2'-monophosphat; dadurch werden aber unsere Aussagen im wesentlichen nicht beeinflusst, da die im folgenden angeführten Überlegungen auch für AMP-2' gelten. AMP-5' und AMP-3'(+2') sowie Cu(ClO₄)₂ wurden von der Firma Fluka AG, Buchs, St. Gallen, bezogen.

¹⁰ Über Komplexgleichgewichtsuntersuchungen zwischen Basen- und Phosphat-Teil von Nucleotiden vgl. H. SIGEL und H. BRINTZINGER, *Helv. chim. Acta* **47**, 1701 (1964); H. SIGEL, *Helv. chim. Acta* **48**, 1513, 1519 (1965).

¹¹ W. COCHRAN, *Acta crystallogr.* **4**, 81, 92 (1951); S. F. MASON, *J. chem. Soc.* **1954**, 2071; A. ALBERT und D. J. BROWN, *J. chem. Soc.* **1954**, 2060. – Auch die N-Oxid-Bildung erfolgt an dieser Stelle, vgl. zum Beispiel M. A. STEVENS, D. I. MAGRATH, H. W. SMITH und G. B. BROWN, *J. Am. chem. Soc.* **80**, 2755 (1958); M. A. STEVENS und G. B. BROWN, *J. Am. chem. Soc.* **80**, 2759 (1958); F. CRAMER und K. RANDEARTH, *Angew. Chem.* **70**, 571 (1958).

¹² Ausgewertet wurde durch Auftragen von 1/[H⁺] gegen 1/ΔE₂₇₄ (vgl. ¹⁰).

¹³ Von M. M. TAQUI KHAN und A. E. MARTELL wurde für AMP-5' pK_A = 3,81 und für AMP-3' pK_A = 3,63 gefunden; *J. Am. chem. Soc.* **84**, 3037 (1962).

¹⁴ Dass der Extinktionskoeffizient für beide Fälle von derselben Grössenordnung ist, kann in erster Näherung angenommen werden (vgl. auch ⁷).

¹⁵ Die Distanz Phosphat-N(1) scheint nach Kalottenmodellen für eine Chelatbildung zu gross.

AMP-3' wahrscheinlich am N(3)¹⁵ – und an die Phosphatgruppe gebunden sein muss¹⁶.

Um diese Annahmen zu überprüfen, wurden unter gleichen Bedingungen wie bei COHN und HUGHES⁵ bzw. EICHORN, CLARK und BECKER⁸ Protonenresonanzspektren aufgenommen¹⁷. Hierbei wäre im Falle einer Ausbildung des Cu²⁺-AMP-5'-Komplexes als Chelat eine Verbreiterung der Bande des Protons von C(8)^{5,8} – entsprechend einer Koordination an N(7) – und beim Cu²⁺-

AMP-3'-Komplex eine solche des Protons von C(2) – entsprechend einer Koordination an N(3) bzw. N(1) – zu erwarten¹⁸.

¹⁶ Dies bedeutet aber nicht, dass alles an das Phosphat koordinierte Cu²⁺ gleichzeitig auch mit dem Adeninring in Wechselwirkung steht.

¹⁷ Die Aufnahme der Kernresonanz-Spektren wurde von Herrn W. SCHWAB (Organ.-chem. Institut) auf einem Varian A 60 NMR-Spektrometer durchgeführt, wofür wir ihm bestens danken.

¹⁸ Die Zuordnung der Kernspinresonanz-Banden in Figur 3 erfolgte nach C. D. JARDETZKY und O. JARDETZKY, J. Am. chem. Soc. 82, 222 (1960); J. J. BULLOCK und O. JARDETZKY, J. org. Chem. 29, 1988 (1964); vgl. auch ⁵ und ⁸.

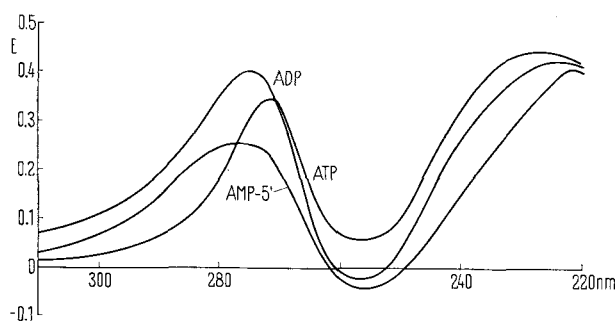


Fig. 1. UV-Differenzspektren⁷ von Cu²⁺-AMP-5'²⁻ gegen Cu²⁺ und AMP-5'²⁻ bei pH 8 und zum Vergleich von Cu²⁺-ATP⁴⁻ gegen Cu²⁺ und ATP⁴⁻ sowie von Cu²⁺-ADP³⁻ gegen Cu²⁺ und ADP³⁻ ([AMP²⁻] = [ATP⁴⁻] = [ADP³⁻] = [Cu²⁺] = 2 · 10⁻⁴ M; 1-cm-Quarzküvetten).

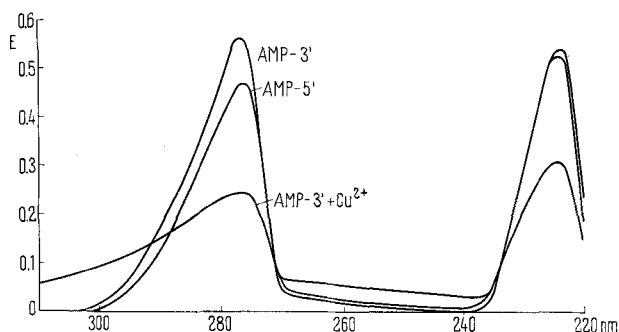


Fig. 2. UV-Differenzspektren von Cu²⁺-AMP-3'²⁻ gegen Cu²⁺ und AMP-3'²⁻ bei pH 8 sowie diejenigen von AMP-5' (pH 3,8) und AMP-3' (pH 3,6) gegen den entsprechenden deprotonierten Liganden (pH 8), [AMP] = 2 · 10⁻⁴ M).

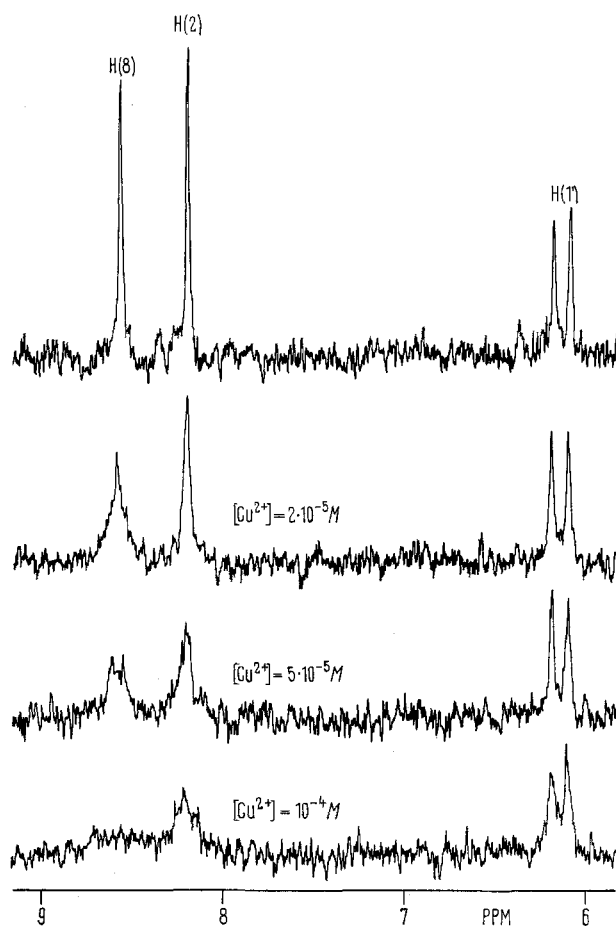


Fig. 3a. Protonenresonanz-Spektren von 0,1 M AMP-5' in D₂O bei pD ~ 7 sowie unter denselben Bedingungen mit steigenden Zusätzen von Cu(ClO₄)₂ (von oben nach unten).

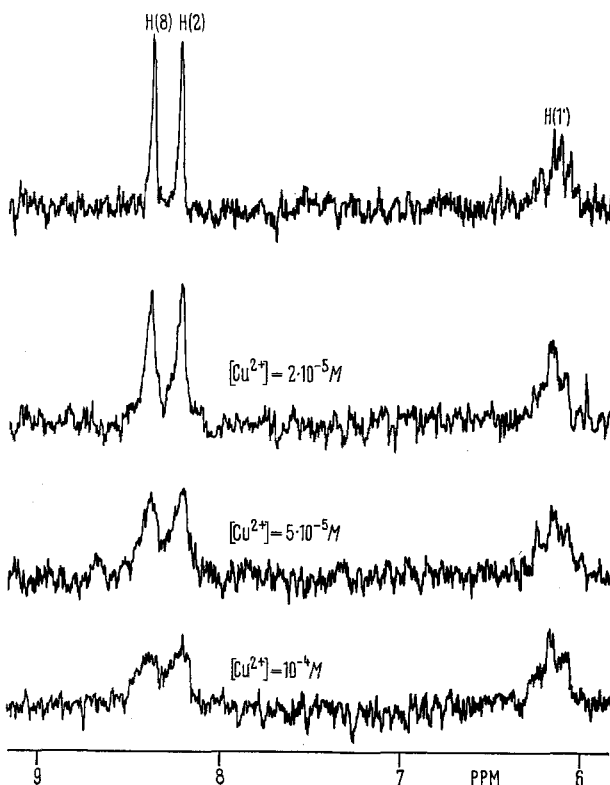


Fig. 3b. Protonenresonanz-Spektren von 0,1 M AMP-3' in D₂O bei pD ~ 7 sowie unter denselben Bedingungen mit steigenden Zusätzen von Cu(ClO₄)₂ (von oben nach unten).

Unsere Versuche zeigen, dass beim Cu^{2+} -AMP-5'-System die Bande des C(8)-Protons stark verbreitert wird⁶. Analog zu den Befunden am Cu^{2+} -Desoxyadenosinmonophosphat-System⁸ wird aber auch das C(2)-Proton beeinflusst (Figur 3a). Im Falle des Cu^{2+} -AMP-3'-Systems ist die Aussage der Kernresonanz-Spektren (Figur 3b) weniger eindeutig, da die Banden von H(2) und H(8) in gleicher Weise verbreitert werden¹⁹. Jedoch kommt auch hier die Cu^{2+} -Adeninring-Wechselwirkung deutlich zum Ausdruck. Die «zusätzliche» Verbreiterung der Banden von H(2) im Cu^{2+} -AMP-5'-System (Figur 3a) und von H(8) im Cu^{2+} -AMP-3'-System (Figur 3b) rührt möglicherweise von (unter diesen Messbedingungen möglichen) intermolekularen Assoziaten her. Auch besteht die Möglichkeit, dass alle Protonen des Liganden von ein und demselben Metallion je nach Distanz verschieden stark beeinflusst werden können⁶.

Im ganzen gesehen scheint die Cu^{2+} -Adeninring-Wechselwirkung im Cu^{2+} -AMP-5'-Komplex etwas grösser zu sein als im Cu^{2+} -AMP-3'-Komplex, wahrscheinlich weil N(3) durch die Ribose etwas abgeschirmt ist¹⁵. Möglicherweise erklären sich damit die von TAQI KHAN und MARTELL¹³ gefundenen Stabilitätsdifferenzen von ca. 0,1 bis 0,2 log.-Einheiten zwischen den Komplexen von AMP-5' und AMP-3'²⁰.

Summary. By means of UV and NMR spectroscopy evidence is given for direct interaction between metal ion and heteroaromatic groups in both Cu^{2+} -adenosine-5'-monophosphate and Cu^{2+} -adenosine-3'-monophosphate complexes. A comparison with the Cu^{2+} -adenosine system⁷ shows that this interaction is much enhanced in the monophosphate analogues, which points to the existence of a macrocyclic phosphate-metal-adenine chelate.

H. SIGEL

Institut für Anorganische Chemie der Universität Basel (Schweiz), 20. April 1966.

¹⁹ Interessant ist ein Vergleich der Kernresonanz-Spektren der beiden Liganden AMP-5' und AMP-3', da – offenbar bedingt durch den «Platzwechsel» der Phosphatgruppe – eine chemische Verschiebung des C(8)-Protons nach höherer Feldstärke stattfindet. H(8) und H(1') zeigen praktisch keine Verschiebung.

²⁰ Für Anregungen und die Möglichkeit zur Diskussion danke ich Herrn Prof. Dr. H. ERLNMEYER und Herrn Dr. B. PRIJS. Dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung sei für Unterstützung unserer Arbeiten gedankt.

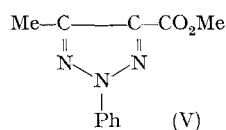
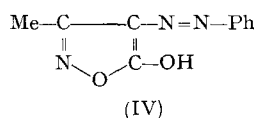
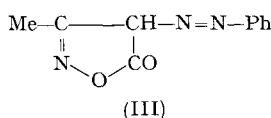
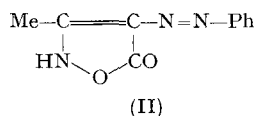
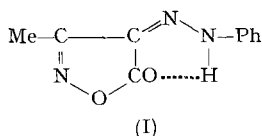
Comment on the Structure of 3-Alkyl-4-arylazoisoxazol-5-ones

Since 3-alkyl-4-arylazoisoxazol-5-ones are of interest as agricultural fungicides¹ we wish to comment on a recent report by CUM, LO VECCHIO and AVERSA² regarding their structure.

We have shown^{3,4} that most 3-alkyl-4-arylazoisoxazol-5-ones prefer the phenylhydrazono form (I) of the four possible tautomers (I), (II), (III) and (IV). The Italian group, however, suggest that structure (II) is the predominant one. Some of the arguments used to arrive at this conclusion depend on an interpretation of the spectroscopic properties of a compound of m.p. 54–56°, which is considered to be 2,3-dimethyl-4-phenylazoisoxazol-5-one (II; Me for H). The structure assigned to this compound is incorrect since its melting point is substantially differ-

ent from that of authentic 2,3-dimethyl-4-phenylazoisoxazol-5-one, m.p. 198°, prepared⁴ unambiguously from ethyl α -phenylazoacetate and *N*-methylhydroxylamine, a reaction which has also been utilized by MUSTAFA et al.⁵

We suggest that the compound of m.p. 54–56° is almost certainly the isomeric 4-methoxycarbonyl-5-methyl-2-phenyl-1,2,3-triazole (V), which has not hitherto been reported. This follows from its method of preparation. 3-Methyl-4-phenylazoisoxazol-5-one was treated with diazomethane, from which reaction the compound of m.p. 54–56° was obtained as one product, along with 3-methyl-4-[methyl(phenyl)hydrazono]isoxazol-5-one (I; Me for H) and 5-methoxy-3-methyl-4-phenylazoisoxazole (IV; Me for H). The analogous reaction carried out by us⁴ using 3-methyl-4-(3-chlorophenylazo)isoxazol-5-one as starting material also yielded 3 products, namely, 3-methyl-4-[methyl(3-chlorophenyl)hydrazono]isoxazol-5-one, 5-methoxy-3-methyl-4-(3-chlorophenylazo)isoxazole and 4-methoxycarbonyl-5-methyl-2-(3-chlorophenyl)-1,2,3-triazole, the last compound being formed by a facile isomerization of the 5-methoxy-3-methyl-4-(3-chlorophenylazo)isoxazole. Further support for the triazole formulation comes from the very close similarity between



¹ L. A. SUMMERS, P. F. H. FREEMAN, M. J. A. GEOGHEGAN, and J. A. W. TURNER, Brit. pat. 999,097 (1965). Imperial Chemical Industries Limited, Belgian pat. 617,389 (1962).

² G. CUM, G. LO VECCHIO, and M. C. AVERSA, Gazz. chim. ital. 95, 583 (1965).

³ L. A. SUMMERS and D. J. SHIELDS, Chemy Ind. 1964, 1264.

⁴ L. A. SUMMERS, P. F. H. FREEMAN, and D. J. SHIELDS, J. chem. Soc. 1965, 3312.

⁵ A. MUSTAFA, W. ASKER, A. H. HARHASH, and A. M. FLEIFEL, Tetrahedron 21, 2215 (1965).