

## 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.

### Cu<sup>2+</sup>-Adeninring-Wechselwirkung in den Cu<sup>2+</sup>-Komplexen von Adenosin-5'- und Adenosin-3'-monophosphat

Im Zusammenhang mit unseren Untersuchungen über die katalytische Aktivität verschiedener Cu<sup>2+</sup>-Nucleotid-Komplexe<sup>1,2</sup> ist es von Bedeutung, dass in den Cu<sup>2+</sup>-Komplexen von ADP<sup>3</sup> und ATP<sup>3</sup> Cu<sup>2+</sup> außer am Phosphatrest<sup>4</sup> noch am N(7) des Adeninringes koordiniert ist, wie von COHN und HUGHES<sup>5</sup> bzw. STERNLICHT, SHULMAN und ANDERSON<sup>6</sup> auf Grund von Kernresonanzmessungen sowie von SCHNEIDER, BRINTZINGER und ERLENMEYER<sup>7</sup> mit Hilfe von UV-Differenzspektren nachgewiesen wurde.

Von EICHHORN, CLARK und BECKER<sup>8</sup> wurde kürzlich ebenfalls mit NMR-Messungen gezeigt, dass auch im Cu<sup>2+</sup>-Desoxyadenosin-monophosphat-System Cu<sup>2+</sup> an den Adeninring vorwiegend über N(7) gebunden ist, daneben möglicherweise aber auch noch über N(1) oder N(3).

Beim Cu<sup>2+</sup>-AMP-5'-Komplex<sup>3</sup> wurde eine Wechselwirkung zwischen Cu<sup>2+</sup> und dem N(7) des Adeninringes schon von COHN und HUGHES<sup>5</sup> festgestellt. Diese Koordination des Cu<sup>2+</sup> an den Adeninring lässt sich auch mit Differenzspektren nachweisen, wie von uns kürzlich gezeigt wurde<sup>1</sup> (Figur 1).

Vergleicht man Kalottenmodelle, so scheint beim Cu<sup>2+</sup>-AMP-5'-Komplex – im Gegensatz zum Cu<sup>2+</sup>-AMP-3'-Komplex<sup>8,9</sup> – eine gleichzeitige Koordination von Cu<sup>2+</sup> an Phosphat und N(7) noch als möglich; ein Vergleich dieser beiden Komplexe ist daher im Hinblick auf die Koordinationsmöglichkeiten des Cu<sup>2+</sup> mit dem Adeninring interessant<sup>10</sup>.

Das vom Cu<sup>2+</sup>-AMP-3'-System<sup>9</sup> aufgenommene Differenzspektrum (Figur 2) zeigt einen ähnlichen Verlauf wie dasjenige des Cu<sup>2+</sup>-AMP-5'-Komplexes (vgl. Figur 1). Aber auch die Protonierung des Adeninringes an N(1)<sup>11</sup> 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 Ausbildunggrad des «Komplexes» liefert, zeigen die mit ihrer Hilfe bestimmten Aciditätskonstanten: der für AMP-5' und auch für AMP-3' gefundene Wert von  $pK_A = 3,8^{12}$  stimmt mit den auf anderem Weg bestimmten Werten<sup>13</sup> befriedigend überein.

Überraschend ist nun der ungefähr gleich grosse Wert der Extinktion der Differenzspektren der beiden Cu<sup>2+</sup>-AMP-Systeme bei ca. 275 nm, der offenbar aussagt, dass in beiden Fällen die Cu<sup>2+</sup>-Adeninring-Wechselwirkung von derselben Größenordnung ist<sup>14</sup>. Da eine Chelatbildung vom 3'-Phosphat zum N(7) höchst unwahrscheinlich ist, bleiben folgende Möglichkeiten: (1) Es treten intermolekulare Assoziate mit zum Beispiel Phosphat-Cu<sup>2+</sup>-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)<sup>15</sup>, statt.

Von diesen Möglichkeiten gilt: (1) ist unter unseren Messbedingungen ( $[Cu^{2+}] = [AMP] = 2 \cdot 10^{-4} M$ ) unwahrscheinlich. Gegen (2) spricht, dass für eine beobachtbare Cu<sup>2+</sup>-Adeninring-Wechselwirkung im Cu<sup>2+</sup>-Adenosin-System sehr viel höhere Cu<sup>2+</sup>-Konzentrationen not-

wendig sind<sup>7</sup>, das heisst, die Phosphatgruppe beeinflusst die Komplexbildung mit dem Adeninring in den Cu<sup>2+</sup>-AMP-Komplexen wesentlich. Andererseits spricht dieser Befund<sup>7</sup> auch gegen (1), da für eine solche «Polymerisation» die Stabilitäten der Cu<sup>2+</sup>-Adeninring- und der Cu<sup>2+</sup>-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 Cu<sup>2+</sup>-Phosphat-Komplexes nimmt also auch die Wahrscheinlichkeit einer Koordination von Cu<sup>2+</sup> an den Adeninring zu, folglich müssen zumindest Anteile als Chelate vorliegen.

Aus allen diesen Befunden lässt sich schliessen, dass in den Cu<sup>2+</sup>-Komplexen sowohl des AMP-5' als auch des AMP-3' das Cu<sup>2+</sup> zum grössten Teil gleichzeitig am Adeninring – beim AMP-5' vorwiegend an N(7)<sup>5,8</sup>, beim

<sup>1</sup> H. SIGEL und H. ERLENMEYER, Helv. chim. Acta 49, 1266 (1966).

<sup>2</sup> R. ZELL, H. SIGEL und H. ERLENMEYER, Helv. chim. Acta 49, 1275 (1966).

<sup>3</sup> ADP = Adenosin-5'-diphosphat; ATP = Adenosin-5'-triphosphat; AMP-5' = Adenosin-5'-monophosphat; AMP-3' = Adenosin-3'-monophosphat.

<sup>4</sup> 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 <sup>5</sup> und <sup>6</sup>.

<sup>5</sup> M. COHN und TH. R. HUGHES JR., J. biol. Chem. 237, 176 (1962).

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

<sup>7</sup> P. W. SCHNEIDER, H. BRINTZINGER und H. ERLENMEYER, Helv. chim. Acta 47, 902 (1964); P. W. SCHNEIDER und H. BRINTZINGER, Helv. chim. Acta 47, 1717 (1964).

<sup>8</sup> G. L. EICHHORN, P. CLARK und E. D. BECKER, Biochemistry 5, 245 (1966).

<sup>9</sup> 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(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> wurden von der Firma Fluka AG, Buchs, St. Gallen, bezogen.

<sup>10</sup> Über Komplexeigengewichtsuntersuchungen 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).

<sup>11</sup> 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. RANDERATH, Angew. Chem. 70, 571 (1958).

<sup>12</sup> Ausgewertet wurde durch Auftragen von  $1/[H^+]$  gegen  $1/\Delta E_{274}$  (vgl. <sup>10</sup>).

<sup>13</sup> 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).

<sup>14</sup> Dass der Extinktionskoeffizient für beide Fälle von derselben Größenordnung ist, kann in erster Näherung angenommen werden (vgl. auch <sup>7</sup>).

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

AMP-3' wahrscheinlich am N(3)<sup>15</sup> – und an die Phosphatgruppe gebunden sein muss<sup>16</sup>.

Um diese Annahmen zu überprüfen, wurden unter gleichen Bedingungen wie bei COHN und HUGHES<sup>5</sup> bzw. EICHHORN, CLARK und BECKER<sup>8</sup> Protonenresonanz-Spektren aufgenommen<sup>17</sup>. Hierbei wäre im Falle einer Ausbildung des Cu<sup>2+</sup>-AMP-5'-Komplexes als Chelat eine Verbreiterung der Bande des Protons von C(8)<sup>5,8</sup> – entsprechend einer Koordination an N(7) – und beim Cu<sup>2+</sup>-

AMP-3'-Komplex eine solche des Protons von C(2) – entsprechend einer Koordination an N(3) bzw. N(1) – zu erwarten<sup>18</sup>.

<sup>16</sup> Dies bedeutet aber nicht, dass alles an das Phosphat koordinierte Cu<sup>2+</sup> gleichzeitig auch mit dem Adeninring in Wechselwirkung steht.

<sup>17</sup> 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.

<sup>18</sup> 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 <sup>5</sup> und <sup>8</sup>.

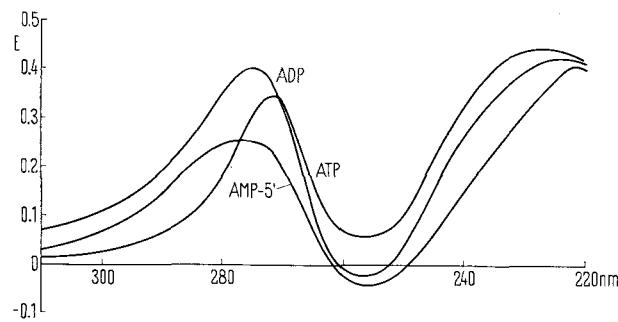


Fig. 1. UV-Differenzspektren<sup>7</sup> von Cu<sup>2+</sup>-AMP-5'<sup>2-</sup> gegen Cu<sup>2+</sup> und AMP-5'<sup>2-</sup> bei pH 8 und zum Vergleich von Cu<sup>2+</sup>-ATP<sup>4-</sup> gegen Cu<sup>2+</sup> und ATP<sup>4-</sup> sowie von Cu<sup>2+</sup>-ADP<sup>8-</sup> gegen Cu<sup>2+</sup> und ADP<sup>8-</sup> ([AMP<sup>2-</sup>] = [ATP<sup>4-</sup>] = [ADP<sup>8-</sup>] = [Cu<sup>2+</sup>] = 2 · 10<sup>-4</sup> M; 1-cm-Quarzküvetten).

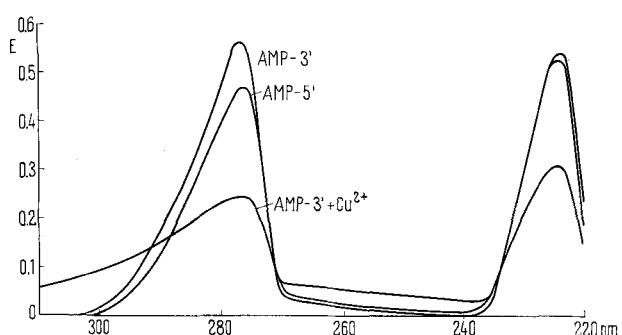


Fig. 2. UV-Differenzspektren von Cu<sup>3+</sup>-AMP-3'<sup>2-</sup> gegen Cu<sup>2+</sup> und AMP-3'<sup>2-</sup> bei pH 8 sowie diejenigen von AMP-5' (pH 3,8) und AMP-3' (pH 3,6) gegen den entsprechenden deprotonierten Liganden (pH 8), ([AMP] = 2 · 10<sup>-4</sup> M).

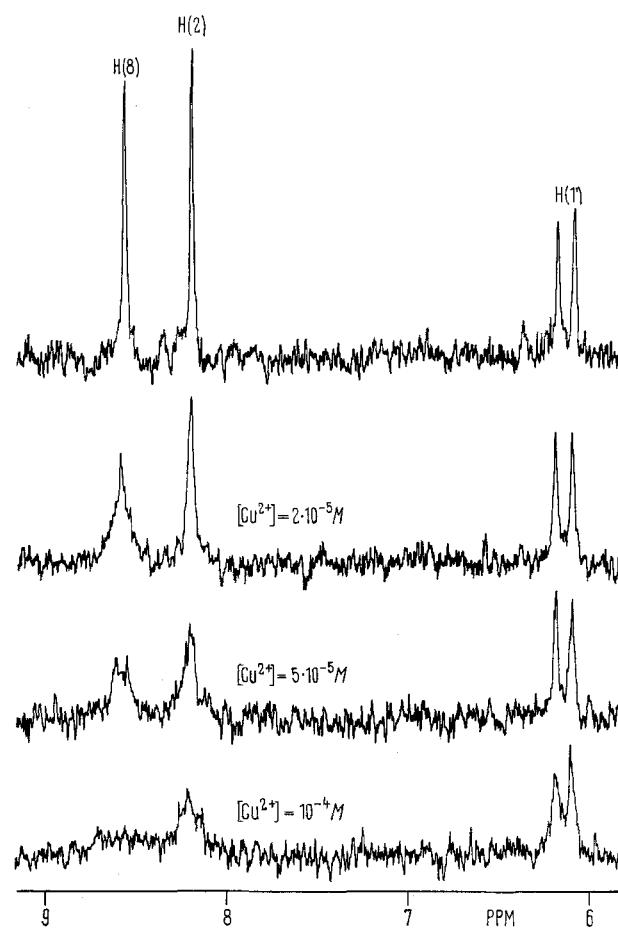


Fig. 3a. Protonenresonanz-Spektren von 0,1 M AMP-5' in D<sub>2</sub>O bei pH ~ 7 sowie unter denselben Bedingungen mit steigenden Zusätzen von Cu(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (von oben nach unten).

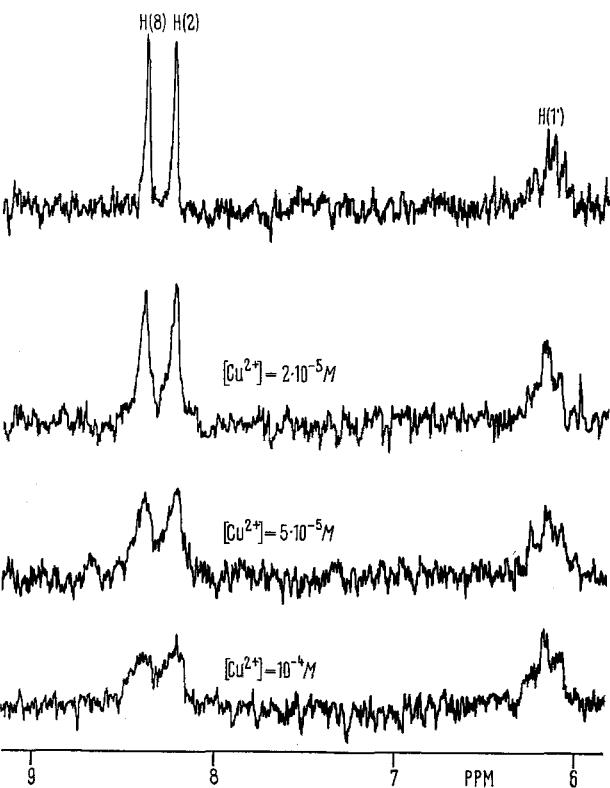


Fig. 3b. Protonenresonanz-Spektren von 0,1 M AMP-3' in D<sub>2</sub>O bei pH ~ 7 sowie unter denselben Bedingungen mit steigenden Zusätzen von Cu(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (von oben nach unten).

Unsere Versuche zeigen, dass beim  $\text{Cu}^{2+}$ -AMP-5'-System die Bande des C(8)-Protons stark verbreitert wird<sup>5</sup>. Analog zu den Befunden am  $\text{Cu}^{2+}$ -Desoxyadenosin-monophosphat-System<sup>8</sup> wird aber auch das C(2)-Proton beeinflusst (Figur 3a). Im Falle des  $\text{Cu}^{2+}$ -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 werden<sup>19</sup>. Jedoch kommt auch hier die  $\text{Cu}^{2+}$ -Adeninring-Wechselwirkung deutlich zum Ausdruck. Die «zusätzliche» Verbreiterung der Banden von H(2) im  $\text{Cu}^{2+}$ -AMP-5'-System (Figur 3a) und von H(8) im  $\text{Cu}^{2+}$ -AMP-3'-System (Figur 3b) röhrt 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 können<sup>6</sup>.

Im ganzen gesehen scheint die Cu<sup>2+</sup>-Adeninring-Wechselwirkung im Cu<sup>2+</sup>-AMP-5'-Komplex etwas grösser zu sein als im Cu<sup>2+</sup>-AMP-3'-Komplex, wahrscheinlich weil N(3) durch die Ribose etwas abgeschirmt ist<sup>15</sup>. Möglicherweise erklären sich damit die von TAQUI KHAN und MARTELL<sup>13</sup> gefundenen Stabilitätsdifferenzen von ca. 0,1 bis 0,2 log.-Einheiten zwischen den Komplexen von AMP-5' und AMP-3'<sup>20</sup>.

**Summary.** By means of UV and NMR spectroscopy evidence is given for direct interaction between metal ion and heteroaromatic groups in both  $\text{Cu}^{2+}$ -adenosine-5'-monophosphate and  $\text{Cu}^{2+}$ -adenosine-3'-monophosphate complexes. A comparison with the  $\text{Cu}^{2+}$ -adenosine system<sup>7</sup> 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.*

<sup>19</sup> 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.

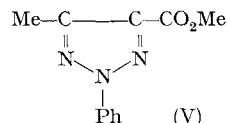
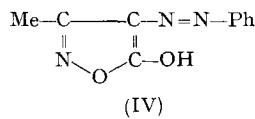
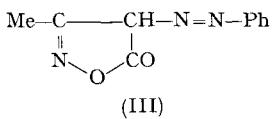
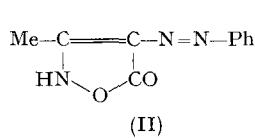
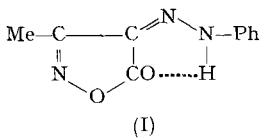
und  $H_1(\cdot)$  zeigen praktisch keine Verschiebung.

20 Für Anregungen und die Möglichkeit zur Diskussion danke ich Herrn Prof. Dr. H. ERLENMEYER 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-arylazo- isoxazol-5-ones

Since 3-alkyl-4-arylazoisoaxazol-5-ones are of interest as agricultural fungicides<sup>1</sup> we wish to comment on a recent report by CUM, Lo VECCHIO and AVERSA<sup>2</sup> regarding their structure.

We have shown<sup>3,4</sup> that most 3-alkyl-4-arylazoisoaxazol-5-ones prefer the phenylhydrazone 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-phenylazoisoaxazol-5-one (II; Me for H). The structure assigned to this compound is incorrect since its melting point is substantially different.



ent from that of authentic 2,3-dimethyl-4-phenylazo-isoxazol-5-one, m.p. 198°, prepared<sup>4</sup> unambiguously from ethyl  $\alpha$ -phenylazoacetate and *N*-methylhydroxylamine, a reaction which has also been utilized by MUSTAFA et al.<sup>5</sup>

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)hydrazone]isoxazol-5-one (I; Me for H) and 5-methoxy-3-methyl-4-phenylazoisoxazole (IV; Me for H). The analogous reaction carried out by us<sup>4</sup> using 3-methyl-4-(3-chlorophenylazo)isoxazol-5-one as starting material also yielded 3 products, namely, 3-methyl-4-[methyl(3-chlorophenyl)hydrazone]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

<sup>1</sup> 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).

<sup>2</sup> G. Cum, G. Lo Vecchio, and M. C. Aversa, *Gazz. chim. ital.* 95, 583 (1965).

<sup>3</sup> L. A. SUMMERS and D. J. SHIELDS, Chem. Ind. 1964, 1264.

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

<sup>5</sup> A. MUSTAFA, W. ASKER, A. H. HARHASH, and A. M. FLEIFEL, *Tetrahedron* **21**, 2215 (1965).