

## Kurze Mitteilungen

Bis am 15. des Monats bei der Redaktion eingehende Kurze Mitteilungen werden in der Regel am 15. des folgenden Monats veröffentlicht. Es werden auch Manuskripte aus dem Ausland angenommen. Maximalumfang: 6 Schreibmaschinenseiten (alles inbegriffen)

## Développement d'images photolytiques sur des macrocristaux d'halogénures de plomb\*

### Summary

A method of physical development which provides to develop latent images on lead halide large crystals is described.

The application of that new method shows that the presence of oxygen during exposition to light has a large influence on the aspect of the developed image. The development centers are not made of lead, but probably of an association of  $O^{-2}$  and  $Pb^{+2}$  ions, oxyhalides for instance.

Dans un travail précédent<sup>1</sup>, nous avons exposé à l'ultraviolet des macrocristaux de chlorure et de bromure de plomb. Des images avaient été obtenues par attaque au moyen de solutions aqueuses hydracides halogénés, d'halogénures de potassium ou de nitrate de plomb.

Nous avons également montré que la présence d'oxygène lors de l'exposition lumineuse jouait un rôle déterminant dans la formation des images.

Le présent travail concerne l'obtention d'images par développement physique.

### Conditions expérimentales

Les plaques cristallines, de 1 à 3 cm<sup>2</sup> de surface et d'une épaisseur comprise entre 3 et 6 mm, sont préparées comme décrit dans <sup>1</sup>. Elles sont alors éclairées par un pinceau de lumière de 1 mm de largeur environ provenant d'une lampe à vapeur de mercure (type Osram 3739 spectral Hg/3 KLX, de 230 watt), placée à une distance de 20 cm. Elles sont ensuite immergées dans la solution révélatrice contenant du nitrate d'argent et un réducteur approprié. Avec une solution aqueuse contenant du sulfite de sodium et du nitrate d'argent ou encore de l'acide citrique, du citrate trisodique, du métol et du nitrate d'argent, on obtient des images sur des cristaux de chlorure ou de bromure de plomb polis mécaniquement. Mais les meilleurs résultats ont été obtenus en utilisant comme révélateur le mélange, au moment de l'emploi, des deux solutions suivantes :

A	Ethanol anhydrique	100 ml
	Eau	5 ml
	Acide critique	5 g
	Métol	0,1 g
B	Eau	100 ml
	Nitrate d'argent	5 g

Le pouvoir solvant du révélateur à l'égard des halogénures de plomb dépend de la quantité d'eau qu'il contient. Il est ainsi possible de contrôler le contraste de l'image et aussi de développer le cristal en profondeur.

### Résultats

Les figures 1 et 2 donnent des exemples d'images obtenues sur un cristal de bromure de plomb. Les images ont la même largeur que le faisceau lumineux. On le obtient aussi bien sur un cristal poli chimiquement que mécaniquement. La période d'induction qui précède l'apparition de l'image varie beaucoup avec l'intensité de la lumière et avec la durée de l'exposition.

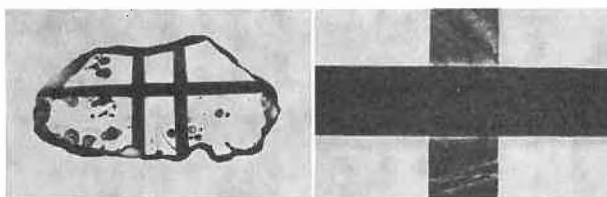


Fig. 1. Cristal de  $PbBr_2$  développé avec le révélateur

Fig. 2. Image développée sur un cristal de  $PbBr_2$ . Exposition en présence d'oxygène: verticale, 1 s; horizontale, 10 s

Elle est comprise ordinairement entre 3 et 10 minutes. Si le développement est poursuivi longtemps le contraste entre zones exposées pendant des durées différentes diminue et la densité tend à devenir uniforme sur toute la surface éclairée. Toutefois, les zones non exposées restent claires, sans formation de voile.

Au début du développement, il se forme des grains d'argent de forme sphérique, qui s'assemblent ensuite.

\* Présenté à l'assemblée d'automne de la Société Suisse de Chimie à Lucerne, 14 octobre 1972.

<sup>1</sup> J. F. REBER, J. G. FERNANDEZ-GARCIA, R. STEIGER et CH. G. BOISSONNAS, *Helv. Chim. Acta* 55 (1972) 1436.



Fig. 3. Image développée sur un cristal de  $\text{PbBr}_2$ . Exposition en présence d'oxygène: horizontale, 90 s; verticale, 10 s

Fig. 4. Image développée sur un cristal de  $\text{PbCl}_2$ . Exposition: 20 min à 20 cm de la lampe; horizontale, sous azote; verticale, à l'air

Un exemple des structures obtenues est donné par la figure 3.

#### Influence de l'oxygène sur la photolyse

Dans une deuxième suite d'expériences, nous avons étudié l'influence de l'oxygène, lors de l'éclairement, sur les images obtenues après développement. La figure 4 donne une image obtenue sur un cristal de chlorure de plomb exposé pendant 20 minutes sous atmosphère d'azote, puis perpendiculairement, pendant la même durée, en présence d'oxygène.

Seule l'exposition en présence d'oxygène donne lieu à une image. De plus, aucune image n'apparaît au croisement des deux faisceaux lumineux. Le résultat est le même si l'exposition en présence d'oxygène précède l'exposition sous azote.

Cela montre que les centres de développement ne peuvent être du plomb. Nous pensons qu'il se pourrait qu'il s'agisse de ions  $\text{O}^{-2}$ , résultant de la photolyse, associés à des ions  $\text{Pb}^{+2}$ , peut-être sous forme d'oxyhalogénures. Le plomb superficiel, qui est aussi un germe virtuel, mais facilement oxydable, est peut-être détruit par la solution avant qu'une nucléation puisse se produire.

#### Conclusions

Des images ont été révélées sur des macrocristaux d'halogénure de plomb exposés à l'ultraviolet, et développés avec un révélateur physique composé de nitrate d'argent, de métol et d'acide citrique en milieu alcoolique. Cette méthode est très sélective.

L'oxygène a une influence considérable sur l'image obtenue, donc sur les centres de développement. Ces derniers ne sont pas constitués par du plomb, mais probablement par des ions  $\text{O}^{-2}$  associés à des ions  $\text{Pb}^{+2}$ , par exemple des oxyhalogénures. Des recherches sont continuées dans notre laboratoire afin d'obtenir, avec cette nouvelle méthode, d'autres renseignements sur les propriétés photochimiques des halogénures de plomb.

J. F. REBER, J. G. FERNANDEZ-GARCIA,  
R. STEIGER\* et CH. G. BOISSONNAS

Laboratoire de chimie physique de l'Université de Neuchâtel

\* Ciba-Geigy Photochimie S. A., 1701 Fribourg

## Massenspektrometrische Untersuchung der Kinetik von H-Atom-Reaktionen mit ungesättigten Kohlenwasserstoffen in der Gasphase\*

### Summary

The reaction of hydrogen atoms with benzene was investigated in the gas phase at low pressure ( $< 1$  Torr) using a stationary gas flow method with a mass spectrometer as detector for the reaction components. The loss of hydrogen atoms through wall recombination, favoured by adsorbed organic reaction components, and the pressure drop along the reaction tube was taken into account for the determination of the rate constants. For the initial reaction the rate constant is

$$k(\text{H} + \text{C}_6\text{H}_6) = (1.55 \pm 0.14) \cdot 10^7 \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}.$$

It is found that the main reaction does not proceed to cyclohexane for low pressures but dominantly yields methane and  $\text{C}_2$ -products, probably by ring opening of the vibrationally excited cyclohexadienyl radical.

### Einleitung

Im Gegensatz zu den Wasserstoff-Atom-Reaktionen mit Olefinen sind die entsprechenden Reaktionen mit aromatischen Verbindungen noch relativ wenig untersucht worden. Die Anlagerung von Wasserstoff-Atomen an Benzol wurde bisher vor allem in relativ komplexen strahlungschemischen Systemen in flüssiger Phase und

in Gasphase (1 atm und mehr) beobachtet<sup>1</sup>. Die Konzentration einzelner Reaktionskomponenten wurde mit kinetischer UV-Spektroskopie und durch Produktanalyse gemessen. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Reaktion zur selektiven Bestimmung der einzelnen Reaktions-schritte in einem stationären Gasflußsystem bei einem Druck von weniger als 1 Torr untersucht. Der Nachweis der Reaktionskomponenten erfolgte massenspektrometrisch. Durch den Vergleich des Reaktionsverlaufes bei tiefem Druck mit demjenigen bei hohem Druck und in flüssiger Phase können wesentliche Informationen über die Elementarschritte des Reaktionssystems (z. B. Desaktivierung von Zwischenprodukten mit hohen Überschußenergien) gewonnen werden.

\* Vorläufige Mitteilung. Vorgetragen an der Herbstversammlung der Schweizerischen Chemischen Gesellschaft am 14. Oktober 1972 in Luzern. Die Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung unterstützt.

<sup>1</sup> a) K. YANG, *J. Amer. Chem. Soc.* 84 (1962) 3795. b) M. C. SAUER jr. und B. WARD, *J. Physic. Chem.* 71 (1967) 3971. c) B. D. MICHAEL und E. J. HART, *J. Physic. Chem.* 74 (1970) 2878. d) S. W. BENSON und R. SHAW, *J. Amer. Chem. Soc.* 89 (1967) 5351.

## Experimentelles

Die H-Atome wurden durch Dissoziation von molekularem Wasserstoff (etwa 1:15 verdünnt mit He) in einer Mikrowellenentladung erzeugt und anschließend mit der organischen Reaktionskomponente bei Raumtemperatur gemischt. Mit der Gasflußmethode wird im Reaktionsrohr ein stationärer Zustand erreicht. Stromabwärts von der Mischstelle entspricht jede Stelle einer bestimmten Reaktionszeit. Durch räumliches Abtasten längs des Reaktionsrohres kann der zeitliche Reaktionsverlauf untersucht werden. Der Detektor (modifiziertes Flugzeit-Massenspektrometer, Typ Bendix 12-107) gibt Auskunft über den Konzentrationsverlauf der Edukte, Zwischenprodukte und Endprodukte. Das Kernstück der Apparatur wird durch zwei koaxiale Quarzrohre gebildet (Abb. 1). Die Position des Detektors ist fest, dagegen wird der Mischpunkt (Beginn der Reaktion) durch Verschieben des zentralen Röhrchens (Reaktionszone 0 bis 25 cm) variiert. Bei einer typischen Flußgeschwindigkeit von 20 m/s ergibt sich eine maximale Reaktionszeit von 12 ms mit einer zeitlichen Auflösung von 1 ms. Unter Reaktionsbedingungen pseudo-1. Ordnung können damit Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung im Bereich von  $10^6$  bis  $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  bestimmt werden. Die bekannten Geschwindigkeitskonstanten für die Anlagerung von H-Atomen an Olefine liegen alle in diesem Bereich<sup>2</sup>. Die Reaktion von H-Atomen mit Radikalen können hingegen schneller ablaufen<sup>3</sup>

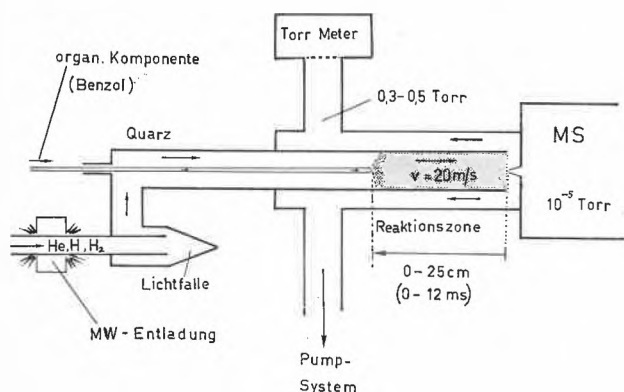


Abb. 1. Kernstück der Gasflußapparatur mit Mikrowellenentladung, verschiebbarem Zentralrohr (organische Reaktionskomponente), Reaktionszone und Detektor (Massenspektrometer)

Die Methode ist nicht geeignet zur direkten Beobachtung von monomolekularen Zerfallsreaktionen, da Geschwindigkeitskonstanten 1. Ordnung nur im Bereich von 1 bis  $1000 \text{ s}^{-1}$  erfasst werden können. Typische experimentelle Bedingungen sind:

- Druck: 0,3 bis 0,5 Torr (mit gasunabhängigem Kapazitätstorrmetertyp Atlas MCT gemessen)
- mittlere Flußgeschwindigkeit im Reaktionsrohr: 20 m/s (aus Rotameterangaben, Druck und Rohrquerschnitt berechnet)
- Konzentrationsverhältnis:  
 $[\text{H}] : [\text{Benzol}] : [\text{He}] = 1 : 2 \cdot 10^{-3} : 15$

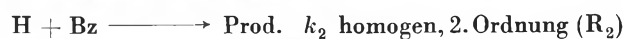
Die absolute H-Atomkonzentration wurde mit Hilfe der sehr raschen Reaktion  $\text{H} + \text{NO}_2$  bestimmt<sup>4</sup>. Relative Werte ergaben sich durch Intensitätsmessung der Masse 1 im MS. Um die Überlagerung der Massenspektren der verschiedenen Reaktionskomponenten zu verringern, wurde in der Ionenquelle des MS eine Elektronenenergie von etwa 18 eV gewählt, allerdings auf Kosten der Empfindlichkeit. Zur Aufnahme und Auswertung der Massenspektren wurde ein On-Line-Kleincomputer (PDP-8/I) eingesetzt<sup>5</sup>. Durch die kontinuierliche Wiedergabe des Spektrums auf einem Oszilloskop wurde das System überwacht. Ein 2-Kanal-Kompensationsschreiber diente zur Aufzeichnung zweier interessierender Massen als Funktion der Zeit, z. B. bei Ein- und Ausschaltprozessen und zur Stabilitätsüberwachung.

Die folgenden zwei Faktoren beeinflussen die Analyse des Reaktionssystems wesentlich:

1. Trotzdem das Quarzrohr mit Dri-Film<sup>6</sup> behandelt wurde, verliert man über die maximale Reaktionsstrecke von 25 cm etwa 10% der H-Atome. Dieser Verlust ist ausschließlich der Wandrekombination zuzuordnen. Ein Beitrag von der homogenen Gasphaserekombination 3. Ordnung ist nicht zu erwarten, da deren Halbwertszeit unter den Versuchsbedingungen etwa 30 s beträgt. Durch die nachträgliche Belegung der Wand mit der organischen Reaktionskomponente während des Experimentes wird leider der Schutzeffekt des Dri-Films stark reduziert.
2. Der Druckabfall im Reaktionsrohr wurde experimentell bestimmt und beträgt bei 0,3 Torr 10% und bei 0,5 Torr noch 4,5% über 25 cm. Er verursacht einerseits eine Zunahme der Flußgeschwindigkeit über die Reaktionsstrecke und andererseits eine druckbedingte Konzentrationsabnahme der Reaktionspartner.

## Reaktionsmodell

Das Reaktionsmodell für die Startreaktion läßt sich somit folgendermaßen beschreiben:



$$\frac{d[\text{H}]}{dt} = -k_1 \cdot [\text{H}] \quad (\text{I})$$

$$\frac{d[\text{Bz}]}{dt} = -k_2 \cdot [\text{H}] \cdot [\text{Bz}]$$

$$\frac{d[\text{H}]}{dx} = -k_1 \cdot [\text{H}] \cdot \frac{P}{v_0 \cdot P_0} + \frac{[\text{H}]}{P} \cdot \frac{dP}{dx} \quad (\text{II})$$

$$\frac{d[\text{Bz}]}{dx} = -k_2 \cdot [\text{H}] \cdot [\text{Bz}] \cdot \frac{P}{v_0 \cdot P_0} + \frac{[\text{Bz}]}{P} \cdot \frac{dP}{dx}$$

$$\text{wobei } [\text{H}]_0 \gg [\text{Bz}]_0 \quad \text{und} \quad P = P_0 + \alpha(l-x)$$

$$\ln \left( \frac{[\text{Bz}]_0}{[\text{Bz}]_l} \right) = k_2 \cdot [\text{H}]_0 \cdot \frac{l}{v_0} \cdot \gamma(k_1, P, l) \quad (\text{III})$$

$[\text{H}]_0$	Konzentration H-Atome ohne Reaktion, am Ende des Reaktionsrohres ohne Reaktion
$[\text{Bz}]_0$	Konzentration Benzol am Ende des Reaktionsrohres ohne Reaktion
$[\text{Bz}]_l$	Konzentration Benzol mit Reaktion, am Ende des Reaktionsrohres
$x$	Position innerhalb der Reaktionszone
$l$	Länge der Reaktionszone für bestimmte Stellung des Zentralrohres
$P$	Totaldruck an Stelle $x$
$P_0$	Totaldruck am Ende des Reaktionsrohres
$\alpha$	Koeffizient für Druckabfall im Reaktionsrohr
$v_0$	Flußgeschwindigkeit am Ende des Reaktionsrohres
$\gamma$	Korrekturfaktor, Funktion von $k_1, P, l$

<sup>2</sup> a) F. E. DABY, H. NIKI und B. WEINSTOCK, *J. Physic. Chem.* 75 (1971) 1601. b) J. A. COWFER, D. G. KEIL, J. V. MICHAEL und C. YEH, *J. Physic. Chem.* 75 (1971) 1584.

<sup>3</sup> M. J. KURYLO, N. C. PETERSON und W. BRAUN, *J. Chem. Physics* 53 (1970) 2776.

<sup>4</sup> a) L. F. PHILLIPS und H. I. SCHIFF, *J. Chem. Physics* 37 (1962) 1233. b) R. V. POIRIER und R. W. CARR, *J. Physic. Chem.* 75 (1971) 1593.

<sup>5</sup> R. KNUTTI und R. E. BÜHLER, *Chimia* 24 (1970) 437.

<sup>6</sup> GE-Silicone Dri-Film SC-87.

Wegen des großen H-Überschusses ist die Reaktion ( $R_1$ ) allein für den H-Verlust verantwortlich. Beim Übergang vom zeitabhängigen Ansatz (I) zur Konzentration in Funktion der Reaktionsstrecke  $x$  (II), erscheint auch der zusätzliche Term für die Konzentrationsänderung durch die Variation des Gesamtdruckes. Der Druckabfall ist innerhalb der experimentellen Genauigkeit linear. Integration von (II) führt zur Bestimmungsgleichung (III) für  $k_2$ . Diese entspricht einer Reaktion pseudo-1. Ordnung bezüglich  $\frac{l}{v_0} \cdot \gamma(k_1, P, l)$ , wobei  $\gamma (\approx 1)$  die Funktion eines Korrekturfaktors hat.

**Resultate und Diskussion**

**1. H + Benzol bei fester Position l**

Die verstärkte Rekombination der H-Atome durch die Belegung der Wand mit der organischen Komponente (Benzol) kann zur Bestimmung von  $k_2$  benutzt werden.

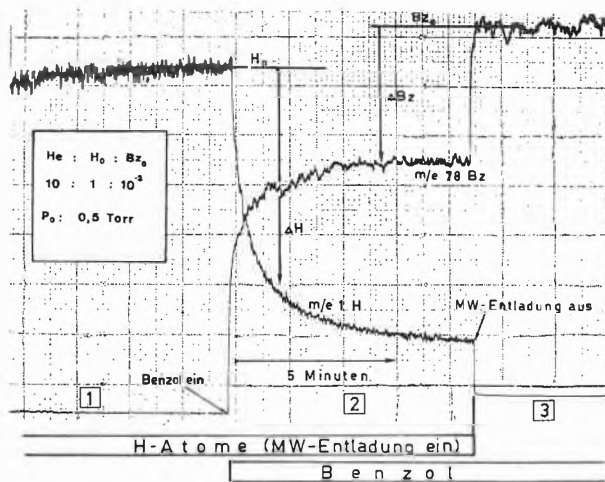


Abb. 2. Relaxationsexperiment zur Bestimmung von  $k$  (H + Benzol) durch Änderung der H-Atom-Konzentration unter pseudo-1. Ordnungs-Bedingungen (verstärkte Wandrekombination der H-Atome durch Belegung der Oberfläche mit Benzol)

Abb. 2 zeigt ein solches Experiment. Die Intensitäten von  $m/e$  78 (Benzol) und  $m/e$  1 (H) sind gegen die Zeit aufgetragen. Die Maßstäbe unterscheiden sich um einen Faktor 1000. Zur Desaktivierung der Wandoberfläche wird die Benzolzufuhr für etwa 20 Minuten unterbrochen [1]. Durch Einschalten des Benzols [2] wird ein Relaxationsprozeß ausgelöst. Die durch den Benzolbelag verstärkte Rekombination der H-Atome auf der Oberfläche ( $R_1$ ) nimmt zu, und gleichzeitig nimmt der Reaktionsumsatz der homogenen Reaktion H + Benzol ( $R_2$ ) ab. Wird die Mikrowellenentladung ausgeschaltet [3], so fällt die Masse 1 auf null, und die Masse 78 geht auf den Wert für  $[Bz]_0$ . Dieses Experiment wurde an verschiedenen Positionen  $l$  wiederholt. Trägt man den H-Verlust für eine bestimmte Zeit des Relaxationsprozesses gegen  $l$  auf, so findet man 1. Ordnung. Eine größere Abweichung von der Geraden tritt erst bei 20 bis 25 cm auf.

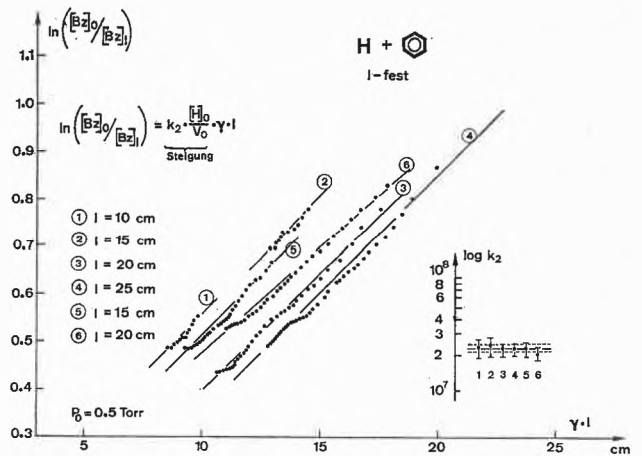


Abb. 3. Relaxationsexperiment bei fester Reaktionsstrecke  $l$ . Pseudo-1. Ordnungs-Darstellung für H + Benzol. Jeder Satz von Meßpunkten entspricht einem Relaxationsprozeß.  $k_2 = (2,25 \pm 0,12) 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (— Mittelwert, --- Fehlergrenze des Mittelwertes)

Da der Korrekturfaktor eine Funktion von  $k_1$  ist, kann  $k_2$  aus einem einzelnen Relaxationsprozeß bestimmt werden. In Abb. 3 ist der Benzolverlust gegen die mit dem Korrekturfaktor  $\gamma$  multiplizierte Reaktionsstrecke  $l$  aufgetragen. Jeder Satz von Meßpunkten entspricht einem Relaxationsprozeß. Aus der Steigung ergibt sich die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante  $k_2$ .

**2. H + Benzol mit variabler Position l**

Abb. 4 zeigt die Bestimmung von  $k_2$  bei 0,3 Torr. Aufgetragen ist wiederum der Benzolverlust gegen die mit dem Korrekturfaktor  $\gamma$  multiplizierte Reaktionsstrecke  $l$ . In diesem Experiment wurde der Benzolumsatz durch Ein- und Ausschalten der Mikrowellenentladung in Funktion der Reaktionsstrecke bestimmt. Der H-Atom-Verlust ist kleiner als im vorangehenden Experiment und liegt zwischen 2 und 35%. Die nach dieser Methode bestimmten Werte für  $k_2$  liegen um etwa 30% tiefer als diejenigen aus der Methode mit fester Position  $l$ . Da der

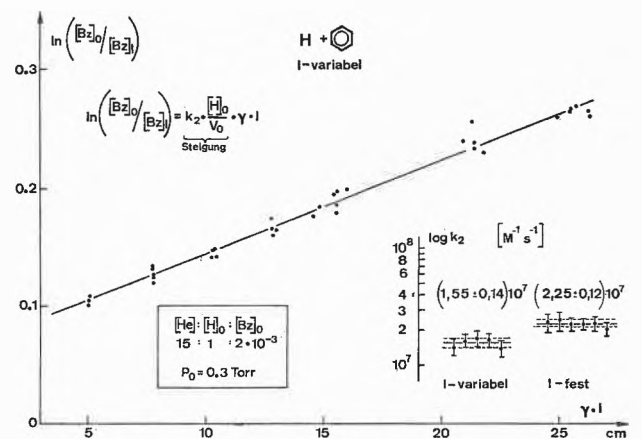


Abb. 4. Bestimmung von  $k$  (H + Benzol) unter pseudo-1. Ordnungs-Bedingungen durch Variation der Reaktionsstrecke  $l$  (—  $k_2$ -Mittelwert, --- Fehlergrenze des Mittelwertes)

Tabelle 1. Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten

Reaktion	Druck (Torr)	$k$ ( $M^{-1}s^{-1}$ ) $\times 10^{-7}$	$n$
H + Benzol	0,3	$1,55 \pm 0,14$	( $n = 5$ )
H + Benzol <sup>a</sup>	500	1	
H + Benzol <sup>b</sup>	760	$3,1 \pm 0,5$	
H + 1,3-cyclo-C <sub>6</sub> H <sub>8</sub>	0,3	$127 \pm 21$	( $n = 1$ )
H + 1,4-cyclo-C <sub>6</sub> H <sub>8</sub>	0,3	$98 \pm 13$	( $n = 1$ )
H + c C <sub>6</sub> H <sub>10</sub>	0,3	$44 \pm 7$	( $n = 1$ )
H + <i>trans</i> -Buten-2	0,3	$47 \pm 12$	( $n = 4$ )
H + <i>trans</i> -Buten-2 <sup>c</sup>	1	$53 \pm 4$	

$n$  Anzahl Experimente

<sup>a</sup> YANG<sup>1</sup>, <sup>60</sup>Co-Radiolyse, Produktanalyse

<sup>b</sup> SAUER und WARD<sup>1</sup>, Pulsradiolyse, kinetische UV-Spektroskopie

<sup>c</sup> DABY, NIKI und WEINSTOCK<sup>2</sup>, Gasflußsystem, MS

Korrekturfaktor  $\gamma$  einige vereinfachende Annahmen enthält, ist zu erwarten, daß die Messungen mit  $\gamma \approx 1$  (im vorliegenden Fall mit variablem  $l$ ) korrektere Werte ergeben. Tabelle 1 gibt die resultierenden Konstanten für verschiedene Reaktionen wieder. Ein Vergleich der Konstanten für H + *trans*-Buten-2 mit Literaturwerten bestätigt die Richtigkeit der Methode. Die Startreaktion H + Benzol verläuft um eine bis zwei Zehnerpotenzen langsamer als die Anlagerungsreaktionen an Olefine<sup>2</sup>. Dies bedeutet, daß Zwischenprodukte nur in geringen Konzentrationen zu erwarten sind.

### 3. Reaktionsmechanismus

Abb. 5 zeigt einige wenige Schritte des komplexen Reaktionsmechanismus für H + Benzol. Zur Vermeidung von Fehlinterpretationen aufgrund der Fragmentierungsspektren von möglicherweise vibratorisch stark angeregten Molekeln wurden die desaktivierten Reaktionsprodukte zusätzlich über einen Bypass in die Ionenquelle des MS gebracht. Die Hauptreaktion führt nicht zu Cyclohexan. Hauptprodukte sind vielmehr Methan und

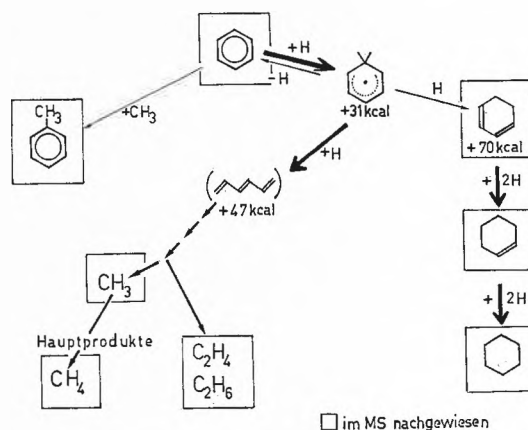


Abb. 5. Postulierte Reaktionsschritte im System H + Benzol

Druck  $\approx 1$  Torr,  $[H] \gg [Benzol]$

→ Hauptreaktionen, ↔ Nebenreaktionen

Äthan oder Äthylen. Der Benzolring wird somit ziemlich vollständig in kleine Bruchstücke zerlegt. Die separat untersuchten Reaktionen mit den beiden Cyclohexadienen und mit Cyclohexen führen vorwiegend zu Cyclohexan. Wir vermuten deshalb, daß die Ringöffnung bereits beim vibratorisch angeregten C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>-Radikal stattfindet und daß der Reaktionsweg über das offenkettige Hexatrien führt.

Versuche mit dieser leider nicht sehr stabilen Verbindung haben bisher diese These weder bestätigt noch widerlegt. Das für die Bildung des Hauptproduktes Methan und des ebenfalls nachgewiesenen Nebenproduktes Toluol benötigte Methylradikal konnte massenspektrometrisch nachgewiesen werden (Messung des Ionisationspotentials).

R. KNUTTI und R. E. BÜHLER

Physikalisch-Chemisches Laboratorium der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich

## 1,2-Diazaazulene und 1,2-Diazapentalene, zwei neue Klassen von nichtbenzoiden Heteroaromaten\*

### Summary

1,2-diazaazulenes and 1,2-diazapentalenes are produced from the corresponding pyrazoles by mild dehydrogenation. They are stable, but sensible against strong acids. They are easily converted in nitrocompounds.

### Voraussetzungen

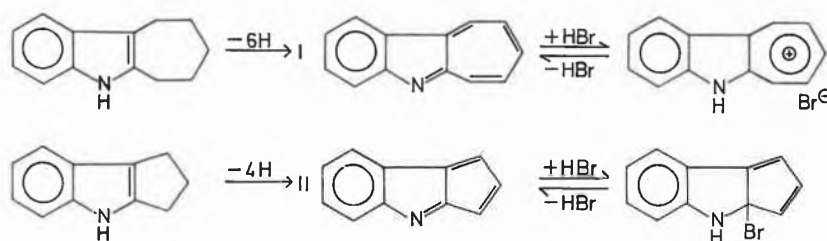
Die ersten Azaazulene (1-Aza-2,3-benzazulen I<sup>1</sup>) und Azapentalene (1-Aza-2,3-benzpentalen II<sup>2</sup>) wurden in unserm Arbeitskreis 1953 und 1958 aus ihren Hydroprodukten durch Dehydrierung hergestellt. Unsere Nomenclatur war zwar formelmäßig anschaulich, doch führt der Ersatz einer =CH-Gruppe durch =N-, unter

Einbeziehung des einsamen Elektronenpaars des Stickstoffs in die Konjugation, zu Verbindungsklassen, die chemisch mit Azulenen und Pentalenen wenig gemein haben. Mit starken Säuren bildet das 1-Azaazulen I ein stark ionisiertes Salz des Azuleniumkations (schon mit der schwachen Essigsäure), 1-Azapentalen II dagegen, ebenso wie das Indolizin, ein unpolares Addukt.

\* Vorläufige Mitteilung. Vorgetragen vor der Herbstversammlung der Schweizerischen Chemischen Gesellschaft am 14. Oktober 1972 in Luzern.

<sup>1</sup> W. TREIBS, R. STEINERT und W. KIRCHHOF, *Liebigs Ann. Chem.* 581 (1953) 54.

<sup>2</sup> W. TREIBS, *Naturwiss.* 46 (1958) 170.

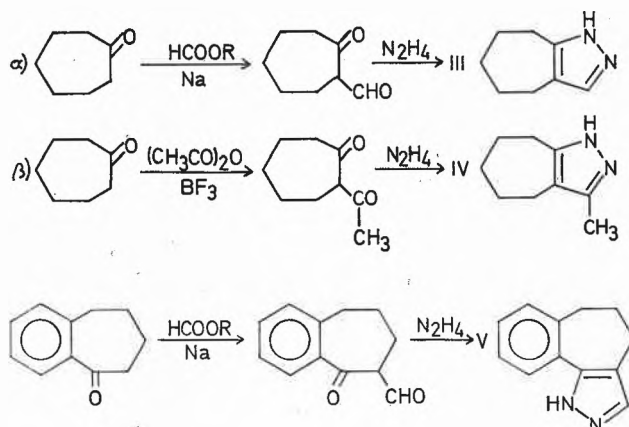


### Hydro-1,2-diazaazulene und 1,2-diazapentalene (Pyrazole)

Analog dem 1-Azaazulen I und 1-Azapentalen II synthetisierten wir die entsprechenden 1,2-Diaza-Verbindungen durch Dehydrierung ihrer Hydroprodukte (Pyrazole).

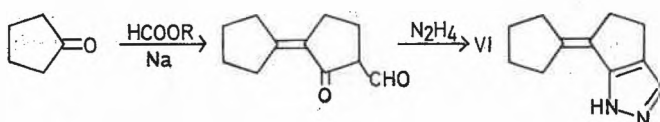
#### Hexahydro-1,2-diazaazulene

Das Hexahydro-1,2-diazaazulen III und sein 3-Methyl-derivat IV sowie sein 7,8-Benzologes V hatten W. TREIBS und H. J. NEUPERT<sup>3</sup> bereits 1955 aus Cycloheptanon und Benzocycloheptanon dargestellt:



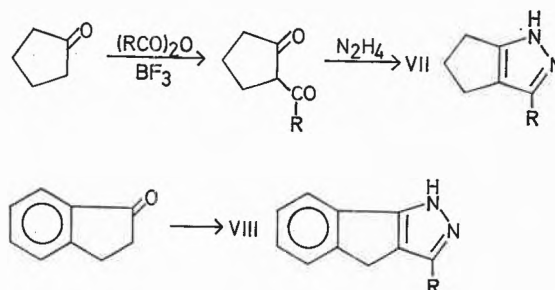
#### Tetrahydro-1,2-diazapentalene

Die Übertragung der Abwandlung Ba von Cycloheptanon auf Cyclopentanon mittels Ameisensäureester und metallischem Natrium durch W. TREIBS und A. BHARAMARAMBA<sup>4</sup> führte stets unter völliger Kondensation des Ketons zu VI



Dagegen erhielten wir aus Cyclopentanon und Säureanhydriden (Essigsäureanhydrid, Benzoesäureanhydrid) mittels Lewis-Säuren (z. B.  $\text{BF}_3$  oder sein Diätherat) die gewünschten Diketone und aus diesen mit Hydrazin die bityklichen Pyrazole (Tetrahydro-1,2-diazapentalene) VII. Analog ließ sich Indanon-1 über das Diketon in das

tritykliche 3-Methyl-dihydro-1,2-diaza-5,6-benzpentalen VIII überführen (R:  $\text{CH}_3$ , VII,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ).



#### Dehydrierung der Pyrazole

Zur Wasserstoffabspaltung hatten wir bei Hydroazulen und Hydro-azapentalenen Brom, Bromsuccinimid und das von uns in dieses Gebiet zuerst eingeführte Chloranil mit guten Ergebnissen verwendet, soweit die entstandenen nichtbenzoiden Aromaten mit letzterem Reagenz nicht sekundär Dienprodukte bildeten<sup>5</sup>. Bei den Pyrazolen III bis VIII waren anfangs stets Di- und Polymerisation eingetreten. Monomere Dehydrierungsprodukte wurden nur in geringern Mengen erhalten. Die Pyrazole hatten sich als sehr empfindlich gegen die bei allen obigen Verfahren stets auftretenden Mineralsäuren, besonders bei höheren Temperaturen, erwiesen. Erst als wir neuerdings säurebindende oder -schwächende Zusätze oder Lösungsmittel verwandten, gelang die Dehydrierung zu Monomeren mittels Bromsuccinimid und Chloranil in guten Ausbeuten, und zwar um so leichter, je weniger Wasserstoff abzuspalten war. Die 2 Wasserstoffatome des Pyrazols VIII aus Indanon-1 zum 1,2-Diaza-5,6-benzpentalen IX wurden durch Chloranil und Bromsuccinimid bereits bei Zimmertemperatur abgespalten. Dimerisation ließ sich allerdings auch unter mildesten Bedingungen nicht ganz vermeiden.

#### 1,2-Diazaazulene

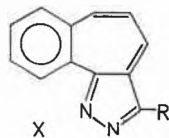
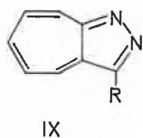
Aus den Pyrazolen III bis V wurden bisher, am besten durch Chloranil, die Grundkörper, das bitykliche 1,2-Diazaazulen IX, das tritykliche 1,2-Diaza-7,8-benzazulen X sowie beide 3-Methyl- und 3-Phenyl-derivate erhalten (R: H,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ). Erfolgte die Darstellung in

<sup>3</sup> Liebigs Ann. Chem. 595 (1955) 219.

<sup>4</sup> Tetrahedron Letters 1966, 1867.

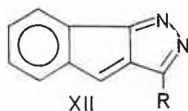
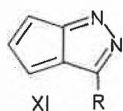
<sup>5</sup> W. TREIBS und K. ELAZEM, Liebigs Ann. Chem. 740 (1970) 112.

mineralsaurem Milieu oder bei höheren Temperaturen, dann entstanden kristallisierte, sehr schwer lösliche Dimere.



### 1,2-Diazapentalene

Die Grundkörper, das 1,2-Diazapentalen und sein Benzologes, ließen sich bisher, wie bereits oben erwähnt, nicht darstellen, da Reaktionsfolge Ba stets zur Kondensation zweier Ketonmoleküle und damit zu VI führte. Dagegen wurden die 3-Methyl- und 3-Phenylhomologen des bicyklischen 1,2-Diazapentalens XI nach B $\beta$  in guten Ausbeuten erhalten und noch leichter, wie bereits oben erwähnt, das trizyklische benzologe 3-Methyl-1,2-diaza-5,6-benzpentalen XII (R: CH<sub>3</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).



### Eigenschaften und Spektren

Die 1,2-Diazaazulene und -pentalene sind leicht in Äther und Aceton, schwer oder kaum in Petroläther und Methanol löslich. Sie, und ebenso die Pyrazole ihrer Synthesen, riechen sehr schwach, aber äußerst anhaftend nach Indol. Sie bilden keine Addukte mit starken Säuren, gegen die sie sehr empfindlich sind. In ihren *Farbnuancen* (in Äther und Aceton) von Rotgelb bis Rotbraun unterscheiden sich beide Gruppen und ihre Derivate viel weniger als die Azulene und sind vom Lösungsmittel unabhängig. Ihre *Spektren im sichtbaren Gebiet* sind untereinander ziemlich ähnlich, mit Hauptmaxima bei 328 bis 335 m $\mu$ .

### 1,2-Diazaazulene

bicyklisch	329	371	462
trizyklisch	328	369	455

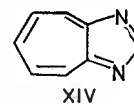
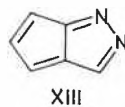
### 1,2-Diazapentalene

bicyklisch	331	370	466
trizyklisch	335	382	472

Während die Absorptionsmaxima bei trizyklischen 1,2-Diazapentalenen höher liegen als bei bicyklischen, sind sie bei allen bisher dargestellten 1,2-Diazaazulenen fast gleich. Seitenketten in 3-Stellung sind ohne merkbareren Einfluß auf die Spektren. Der wichtigste Faktor für Farben und spektrale Maxima dürfte demnach die =N=N= -Gruppierung sein.

Im *IR-Spektrum* ist der auffälligste Unterschied zwischen einem Pyrazol und der daraus erhaltenen 1,2-Diazaverbindung die Verschiebung von 3160–3170 nach 3350–4000 cm<sup>-1</sup>, die ebenfalls für den Übergang von –NH–N= nach =N=N= spricht.

Inzwischen ist uns auch die Synthese des Grundkörpers der 1,2-Diazapentalene, des unsubstituierten Diazapentalens XIII, und die des 1,3-Diazaazulens XIV durch Dehydrierung der betreffenden Hexahydroimidazols gelungen, über die wir in Kürze berichten werden. XIV wurde von T. NOZOE<sup>6</sup> aus Tropolon gewonnen und eingehend untersucht.



Eine Reaktion, die für alle Azulene, Aza- und Diazaazulene sowie -pentalene charakteristisch ist, besteht in ihrer Überführung in feste gelbrote *Nitroverbindungen*, schon unter den mildesten Bedingungen, die mit einer hypsochromen Verschiebung des spektralen Maximums von 10 m $\mu$  verbunden ist.

Für die Unterstützung der Arbeit danken wir dem Fonds der Chemischen Industrie und der BASF.

WILHELM TREIBS

Universität Heidelberg, 69 Heidelberg (BRD)

<sup>6</sup> z. B. D. GINSBERG, *Non Benzenoid Aromatic Compounds*, New York 1959, S. 320.

## Umlagerungen bicyklischer 2-Vinyl-aziridine\*

### Summary

Addition of phthalimidonitrene to cyclopentadiene (5), 1,3-cyclohexadiene (6) as well as cyclooctatetraene (7) led to the bicyclic 2-vinyl-aziridines: N-phthalimido-6-aza-bicyclo [3.1.0] hex-2-ene (8a), N-phthalimido-7-aza-bicyclo [4.1.0] hept-2-ene (9a) and N-phthalimido-9-aza-bicyclo [6.1.0] nona-2,4,6-triene (10a), respectively. Thermolysis of 8a gave pyridine (16) and phthalimide (17), whereas from the thermolysis of 9a and of 10a the products of a 2-vinylaziridine-rearrangement were isolated, namely N-phthalimido-7-aza-bicyclo [2.2.1] hept-2-ene

(11) and N-phthalimido-9-aza-bicyclo [4.2.1] nona-2,4,7-triene (23), respectively. 11 was found to be thermally labile under the conditions of its formation and decomposed into N-phthalimido-pyrrole (12) and, presumably, ethylene. N-Phthalimido-indole (24) was isolated as a by-product from the thermolysis of 10a.

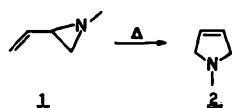
\* Vorläufige Mitteilung, vorgetragen auf der Herbstversammlung der Schweizerischen Chemischen Gesellschaft in Luzern, 14. Oktober 1972.

Hydrazinolyse von **8a** und von **9a** gaben die entsprechenden N-amino-aziridine **8b** und **9b**, respectively. NMR-Monitoring of the  $\text{CDCl}_3$ -solutions of **8b** and of **9b** suggested the formation of N-amino-5-aza-bicyclo[2.1.1]hex-2-ene (**22**) along with cyclopentadiene (**5**), and of N-amino-7-aza-bicyclo[2.2.1]hept-2-ene (**13**) along with 1,3-cyclohexadiene (**6**), respectively, as well as of hydrazine (**14**). In the presence of catalytic amounts of **14**, **8b** and **9b** decomposed into cyclopentene (**21**) and cyclohexene (**15**), respectively.

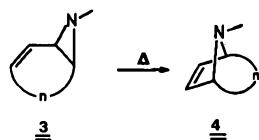
Interpretations are suggested for these highly diversified reactions.

## 1. Einleitung

Vor wenigen Jahren berichteten verschiedene Autoren von der thermischen<sup>1,2</sup> und in einem Falle auch Kaliumjodid-katalysierten<sup>3</sup> Umlagerung von 2-Vinyl-aziridinen (**1**) in 3-Pyrroline (**2**).



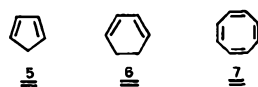
Wir haben damit begonnen zu untersuchen, ob sich diese Umlagerung auf bicyklische 2-Vinyl-aziridine vom Bicyclo[ $n+2.1.0$ ]-Typ (**3**) übertragen lassen, wodurch ein neuer Syntheseweg zu den Bicyclo[ $n.2.1$ ]-Systemen (**4**) mit Stickstoff in der 1-Brücke eröffnet würde.



Dabei beschränkten wir bisher unsere Untersuchung auf N-Phthalimido- und N-Amino-substituierte bicyklische 2-Vinyl-aziridine.

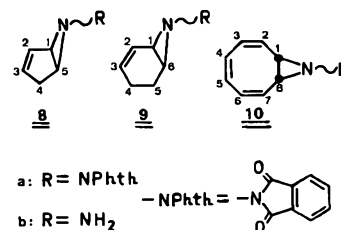
## 2. Bicyklische 2-Vinyl-aziridine durch Addition von Phthalimido-nitren an zyklische 1,3-Diene

Die ausschließliche (NMR der Rohproduktgemische) im 1,2-Modus erfolgende Addition des oxidativ aus N-Amino-phthalimid erzeugten Phthalimido-nitrens<sup>4,5</sup> an Cyclopentadien (**5**), 1,3-Cyclohexadien (**6**) und Cyclooctatetraen (**7**) führte zu den Aziridinen **8a**\*, Smp. 172° (69%) [ $100 \text{ MHz}^{-1}\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,85$  bis  $7,6$ /symm. M, 4 Pr (Phthaly-H); 6,2 bis 5,9/AB-System ( $J = 6$ ) mit Feinstruktur, 2 Pr (H-C2, -C3); 3,8 bis 3,5/AB-System ( $J = 5$ ) mit Feinstruktur im A-Teil (H-C1) und mit D-Aufspaltung ( $J =$  etwa 4,5) sowie zusätzlicher Feinstruktur im B-Teil (H-C5), 2 Pr; 3,1 bis



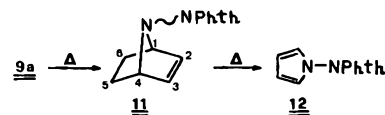
\* Alle neuen Verbindungen, außer **8b**, **13** und **22**, sind auch durch Elementaranalysen sowie IR-, UV- und MS-Spektren charakterisiert. Über diese wird später berichtet.

2,5/AB-System ( $J = 19$ ) mit Feinstruktur (*endo*- und *exo*-H-C4); ppm (Hz)], **9a**\*\*\*, Smp. 131° (49%) und **10a**\*\*\*, Smp. 189° d. (40%) [ $100 \text{ MHz}^{-1}\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,9$  bis  $7,5$ /symm. M, 4 Pr (Phthaly-H); 6,6 bis 6,0/AB-System ( $J = 12$ ) mit Feinstruktur, 4 Pr (H-C2, -C3, -C6, -C7); 6,0 bis 5,85/symm. M, 2 Pr (H-C4, -C5); 3,20/S, 2 Pr (H-C1, -C8); ppm (Hz)].



## 3. Thermolyse von N-Phthalimido- und N-Amino-7-aza-bicyclo[4.1.0]hept-2-en (**9a** und **9b**)

Thermolyse von **9a** unter verschiedenen Bedingungen (siedendes *p*-Xylol; 24, 48 und 60 Std. oder siedendes Dekalin; 1 Std.) ergab Gemische aus unreaktiertem **9a**, dem Produkt einer 2-Vinylaziridin-Umlagerung **11** und N-Phthalimido-pyrrol (**12**), deren Zusammensetzung nach NMR zwischen 80 : 15 : 5 und 13 : 7 : 80 variierte. Nach 48 Std. in siedendem *p*-Xylol konnte das N-Phthalimido-7-aza-bicyclo[2.2.1]-hept-2-en (**11**), Smp. 128° [ $100 \text{ MHz}^{-1}\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,85$  bis  $7,55$ /symm. M, 4 Pr (Phthaly-H); 6,16/D × D ( $J = 1 \times 1$ ), 2 Pr (H-C2, -C3); 5,05 bis 4,95/symm. M, 2 Pr (H-C1, -C4); 2,02/D ( $J = 10$ ) mit Feinstruktur, 2 Pr (*exo*-H-C5, -C6); 1,16/D × D ( $J = 10 \times 3$  bis 4), 2 Pr (*endo*-H-C5, -C6); ppm (Hz)] chromatographisch abgetrennt werden (15%). Nach 4,5 Std. in siedendem Dekalin isolierte man (88%) nur **12** (identisch mit einem authentischen Präparat<sup>7</sup>). Seine Bildung deuten wir als Ergebnis einer Cycloreversion aus intermediärem **11** unter Abspaltung von (bisher nicht nachgewiesenem) Äthylen. Nach 48stündigem Kochen mit Kaliumjodid in Aceton blieb **9a** unverändert (vgl. <sup>1,3</sup>).



\*\* Verbesserung von Ausbeute und Reinheit gegenüber früher<sup>5</sup>.

\*\*\* Kürzlich auch von einer anderen Arbeitsgruppe<sup>6</sup> auf dem gleichen Wege synthetisiert.

<sup>1</sup> R. S. ATKINSON und C. W. REES, *Chem. Commun.* 1967, 1232; *J. Chem. Soc. (C)* 1969, 778.

<sup>2</sup> A. MISHRA, S. N. RICE und W. LWOWSKI, *J. Org. Chem.* 33 (1968) 481.

<sup>3</sup> P. SCHEINER, *J. Org. Chem.* 32 (1967) 2628.

<sup>4</sup> D. J. ANDERSON, T. L. GILCHRIST, D. C. HORWELL und C. W. REES, *Chem. Commun.* 1969, 146; *J. Chem. Soc. (C)* 1970, 576.

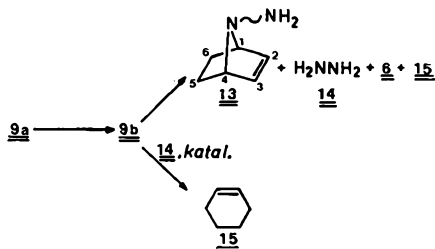
<sup>5</sup> L. HOESCH und A. S. DREIDING, *Chimia* 23 (1969) 405.

<sup>6</sup> G. C. TUSTIN, C. E. MÖNKEN und W. H. OKAMURA, *J. Amer. Chem. Soc.* 94 (1972) 5112.

<sup>7</sup> R. EPTON, *Chem. & Ind.* 1965, 425.



Das für eine Synthese von **11** (und anderer daraus potentiell ableitbarer Derivate) ungünstige Verhältnis der beiden Thermolysegeschwindigkeiten  $9a \rightarrow 11 \rightarrow 12$  veranlaßte uns, das Verhalten des N-Amino-7-aza-bicyclo[4.1.0]hept-2-ens (**9b**) zu untersuchen. **9b** war durch Hydrazinolyse\* von **9a** zugänglich (76%), Smp.  $40^\circ$  [ $100 \text{ MHz}^{-1} \text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 6,2$  bis  $5,5$ /AB-System ( $J = 10$ ) mit Feinstruktur, 2 Pr (H-C2, -C3); 3,61/br. S, mit  $\text{D}_2\text{O}$  auswaschbar, 2 Pr ( $\text{NH}_2$ ); 2,5 bis 1,1/M, 6 Pr (H-C1, -C4, -C5, -C6); ppm (Hz)]. Ließ man eine  $\text{CDCl}_3$ -Lösung von **9b** 4 Tage bei Rt. stehen, so entstand ein Gemisch von Hydrazin (**14**), 1,3-Cyclohexadien (**6**), Cyclohexen (**15**) und einem als N-Amino-7-aza-bicyclo[2.2.1]hept-2-en (**13**) interpretierten Produkt im Verhältnis von etwa 5:6:8:10. Diese Substanzen wurden nicht getrennt, waren aber im NMR-Spektrum durch folgende Signale erkennbar. **14**:  $\delta =$  etwa  $4,8^{**}$ /br. S, auswaschbar mit  $\text{D}_2\text{O}$ . **6**:  $\delta = 5,83$ /M (Vinyl-H); 2,14/M (Allyl-H). **15**:  $\delta = 5,65$ /M (Vinyl-H). **13**:  $\delta = 6,51$ /D  $\times$  D ( $J = 5 \times 3$ ) (H-C2, -C3); 3,62/symm. M (H-C1, -C4); 3,22/br. S, auswaschbar mit  $\text{D}_2\text{O}$  ( $\text{NH}_2$ ); ppm (Hz). Einstrahlen bei  $\delta = 3,62$  ppm vereinfachte das Signal bei  $\delta = 6,51$  ppm zum S. Das im Spektrum außerdem sichtbare M bei  $\delta = 2,1$  bis  $1,1$  ppm entsprach den Erwartungen für **13** (H-C5, -C6) und **15** (aliphatische H).



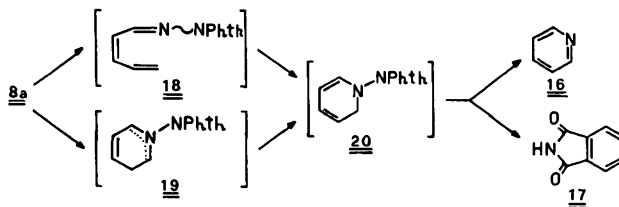
**13** ist das Resultat einer 2-Vinylaziridin-Umlagerung von **9b**. Ob **6** und **14** Zerfallsprodukte des N-Aminoaziridins **9b** oder des N-Amino-7-aza-norbornens (**13**) sind, muß vorläufig offenbleiben. **15** dagegen resultierte anscheinend direkt aus **9b**, da eine Lösung von **9b** in Gegenwart von katalytischen Mengen Hydrazin (**14**) nach 5 Tagen bei Rt. praktisch reines Cyclohexen ergab. Für diese letzte Reaktion kann man einen Wolff-Kishner-ähnlichen Verlauf in Betracht ziehen.

#### 4. Thermolyse von N-Phthalimido- und N-Amino-6-azabicyclo[3.1.0]hex-2-en (**8a** und **8b**)

Nach 60 min Erhitzen von **8a** in Mesitylen ( $160^\circ$ ) isolierten wir in 50prozentiger Ausbeute nur Pyridin (**16**) und Phthalimid (**17**). Bei tieferer Temperatur (siedendes Toluol oder *p*-Xylol) beobachteten wir im NMR-

Spektrum das Auftreten noch nicht identifizierter Zwischenprodukte.

**16** und **17** könnten durch  $\beta$ -Elimination aus intermediärem Dihydropyridin (**20**) entstanden sein, wobei als Zwischenstufen das Hydrazon **18** (Analogie zu <sup>9</sup>) oder das dipolare **19** (Analogie zu <sup>10</sup>) in Betracht gezogen werden könnten.



Hydrazinolyse von **8a** lieferte (38%) N-Amino-6-azabicyclo[3.1.0]hex-2-en (**8b**) [ $60 \text{ MHz}^{-1} \text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 5,9$  bis  $5,5$ /AB-System ( $J = 6$ ) mit Feinstruktur, 2 Pr (H-C2, -C3); 3,32/br. S, 2 Pr ( $\text{NH}_2$ ); 2,7 bis 2,3/M, 4 Pr (H-C1, -C4, -C5); ppm (Hz)] als Öl. Dieses Rohprodukt in  $\text{CDCl}_3$  zerfiel nach einigen Tagen bei Rt. in Cyclopenten (**21**) und Hydrazin (**14**;  $\delta = 5,0^{**}$  ppm, auswaschbar mit  $\text{D}_2\text{O}$ ) im Verhältnis von etwa 4:1, verunreinigt (nach NMR) mit geringen Mengen unidentifizierter Produkte.

Anders verlief die Zersetzung von **8b**, wenn man dessen Lösung in  $\text{CDCl}_3$  mit Essigsäure (etwa 0,1 Mol-äquivalent) versetzte. Nach 1 bis 2 Tagen bei Rt. entstand dann ein Gemisch aus unzersetztem **8b**, Cyclopenten (**21**), Cyclopentadien (**5**), geringen Mengen noch unidentifizierter Substanzen und einem Produkt, dem wir vorläufig die Struktur des N-Amino-5-aza-bicyclo[2.1.1]hex-2-ens (**22**) zuordnen. Unsere Interpretation stützt sich auf das  $60\text{-MHz}^{-1} \text{H-NMR}$  des Gemisches. **5**:  $\delta = 6,5$  bis  $6,2$ /symm. M (Vinyl-H); 2,9 bis 2,8/symm. M (Allyl-H). **8b** und **21**:  $\delta = 5,9$  bis  $5,5$ /M (Vinyl-H). **22**:  $\delta = 6,01$ /T oder D  $\times$  D ( $J = 3$  bis  $4$ ) (H-C2, -C3); 4,04/symm. M (H-C1, -C4); ppm (Hz). Bei  $\delta = 3,55$  und  $3,36$  ppm erscheinen die Signale der  $\text{NH}_2$ -Gruppen aus **22** und **8b**. Eine Folge von M bei  $\delta = 2,5$  bis  $1,0$  ppm vereinigt die Signale der aliphatischen Protonen von **8b** und **21**, von **22** (H-C6) und von den noch unidentifizierten Produkten. Nach den Intensitäten der Vinylprotonensignale bei  $\delta = 6,5$  bis  $5,5$  ppm und des M bei  $\delta = 4,04$  ppm verhalten sich die Anteile von **8b** + **21** : **22** wie 8 : 3 : 3 nach 28 Std. bei Rt. Nach 8 Tagen bei Rt. waren die vorläufig **22** zugeordneten Signale aus dem NMR verschwunden. **21** und **5** (im Verhältnis von etwa 6 : 4) waren die einzigen dann im Misch-NMR identifizierbaren Produkte.

\* Die Methode der Hydrazinolyse von N-Phthalimido-aziridinen stammt von FELIX, MÜLLER, HORN, JOOS, SCHREIBER und ESCHENMOSER<sup>8</sup>, denen wir für Informationen vor der Veröffentlichung danken.

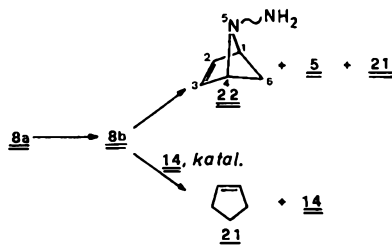
\*\*  $\delta$ -Wert nicht konstant, wie auch mit authentischem Hydrazin (**14**) gefunden.

<sup>8</sup> D. FELIX, R. K. MÜLLER, U. HORN, R. JOOS, J. SCHREIBER und A. ESCHENMOSER, *Helv. Chim. Acta* 55 (1972) 1276.

<sup>9</sup> P. SCHIESS und H. L. CHIA, *Helv. Chim. Acta* 53 (1970) 485.

<sup>10</sup> F. W. FOWLER, *Angew. Chem.* 83 (1971) 147 und 148.

Eine Analogie des Verhaltens von **8b** zu demjenigen von **9b** ergibt sich, wenn man annimmt, daß **8b** im Rohprodukt durch geringe Mengen Hydrazin (**14**) verunreinigt war, welches die Zersetzung zu **21** katalysierte (Analogie: **9b** + **14** → **15**). Zusatz von Essigsäure würde das Hydrazin (**14**) neutralisiert und so eine erfolgreiche Konkurrenz der 2-Vinylaziridin-Umlagerung (**8b** → **22**) und der Bildung von **5** gegenüber der Zersetzung zu **21** ermöglicht haben (Analogie: **9b** → **13** + **6**).

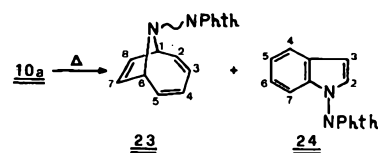


### 5. Thermolyse von N-Phthalimido-9-aza-bicyclo [6.1.0]-nona-2,4,6-trien (**10a**)

Das Aziridin **10a** erwies sich als thermolabiler als die Aziridine **8a** und **9a**, indem **10a** schon nach 12 Std. in siedendem Toluol unter Argon im NMR-Spektrum des Rohproduktgemisches nicht mehr nachweisbar war. Wir isolierten aus diesem Gemisch das N-Phthalimido-9-aza-bicyclo [4.2.1] nona-2,4,7-trien (**23**)\*, Smp. 136° d. (47%) [*100 MHz*-<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ = 7,9 bis 7,5/symm.M, 4 Pr (Phthalyl-H); 6,3 bis 5,9/M, 4 Pr (H-C2, -C3, -C4, -C5); 5,58/S, 2 Pr (H-C7, -C8); 4,76/D (J = 6), wird durch Einstrahlen bei 6,09 zum S, 2 Pr (H-C1, -C6); ppm (Hz)] und ein um zwei Wasserstoffatome ärmeres Oxidationsprodukt, das N-Phthalimido-indol (**24**), Smp. 156° (15%) [*UV* (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH): Sch. 301 (2090); Max. 288 (5770); Sch. 279 (6480); Max. 276 (7140);

\* **23** wurde jüngst auch von anderen Autoren<sup>6</sup> im Gemisch der Produkte einer Thermolyse von **10a** beobachtet, ohne isoliert worden zu sein.

Max. 260 (10150); Sch. 235 (11850); nm (ε). *100 MHz*-<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ = 8,05 bis 7,75/symm.M, 4 Pr (Phthalyl-H); 7,75 bis 7,60/M, 1 Pr (H-C4 oder -C7); 7,30 bis 7,00/M, 4 Pr (H-C2, -C5, -C6, -C7 oder -C4); 6,70/D × D (J = 3,7 × 0,7), 1 Pr (H-C3); ppm (Hz)].



Offenbar handelt es sich bei der Bildung von **23** um eine 2-Vinylaziridin-Umlagerung, die bisher keine Analogie in Thermolysen anderer Derivate<sup>11, 12, 13, 14</sup> des 9-Aza-cyclo [6.1.0] nona-2,4,6-triens hat. Als mögliche Vorstufe von **24** nehmen wir ein 8,9-Dihydroindol an, für dessen Bildung man eine Folge von Elektrozyklisierungen über ein N-Phthalimido-azonin in Betracht ziehen könnte (vgl. analoge Indol-<sup>6</sup>, 8,9-Dihydroindol-<sup>15</sup> und 8,9-Dihydroindenbildungen<sup>16, 17, 18</sup>).

Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung unterstützt. Wir danken auch der Firma Sandoz AG, Basel, für großzügige Forschungsbeiträge.

LIENHARD HOESCH und ANDRÉ S. DREIDING  
Organisch-Chemisches Institut, Universität Zürich  
Rämistraße 76, 8001 Zürich

<sup>11</sup> S. MASAMUME und N. T. CASTELLUCCI, *Angew. Chem.* 76 (1964) 569.

<sup>12</sup> A. G. ANASTASSIOU, *J. Amer. Chem. Soc.* 90 (1968) 1527.

<sup>13</sup> G. SCHRÖDER, G. HEIL, H. RÖTTELE und J. F. M. OTH, *Angew. Chem.* 84 (1972) 474.

<sup>14</sup> A. G. ANASTASSIOU, S. W. EACHUS, R. L. ELLIOTT und E. YAKALI, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 1972, 531.

<sup>15</sup> A. G. ANASTASSIOU und J. H. GEBRIAN, *J. Amer. Chem. Soc.* 91 (1969) 4011.

<sup>16</sup> A. G. ANASTASSIOU und R. C. GRIFFITH, *Chem. Commun.* 1971, 1301; *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 1972, 399.

<sup>17</sup> A. G. ANASTASSIOU, E. REICHMANIS und R. C. GRIFFITH, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 1972, 913.

<sup>18</sup> J. E. BALDWIN, A. H. ANDRIST und R. K. PINSCHMIDT jr., *J. Amer. Chem. Soc.* 94 (1972) 5845.

## Konformationsanalyse und Kinetik der Konformationsänderungen von membranaktiven Antibiotika\*

### Summary

Molecular properties of the membrane active antibiotics enniatin B, valinomycin and gramicidin A were investigated in various solvents. The conformational rearrangements of these antibiotics have been studied as a function of solvent polarity by spectroscopic techniques and ultrasonic absorption measurements. The results of these experiments provide information about conformational equilibria, about the number of populated conformers, and the kinetics of their interconversions. Enniatin B shows conformational changes which can be explained by reorientation of the polar groups in the molecule induced by specific interactions between polar solvent molecules

with the ester and amide groups of the depsipeptide. The conformational rearrangements of valinomycin are due to a stepwise opening of a structure stabilized by intramolecular hydrogen bonds. These conformational transitions give rise to relatively rapid relaxation processes in the frequency range of 10 to 100 MHz and also to slower conformational processes around 1 MHz rate constants of about 10<sup>7</sup> s<sup>-1</sup>.

\* Vorläufige Mitteilung. Vorgelesen an der Herbstversammlung der Schweizerischen Chemischen Gesellschaft am 14. Oktober 1972 in Luzern.

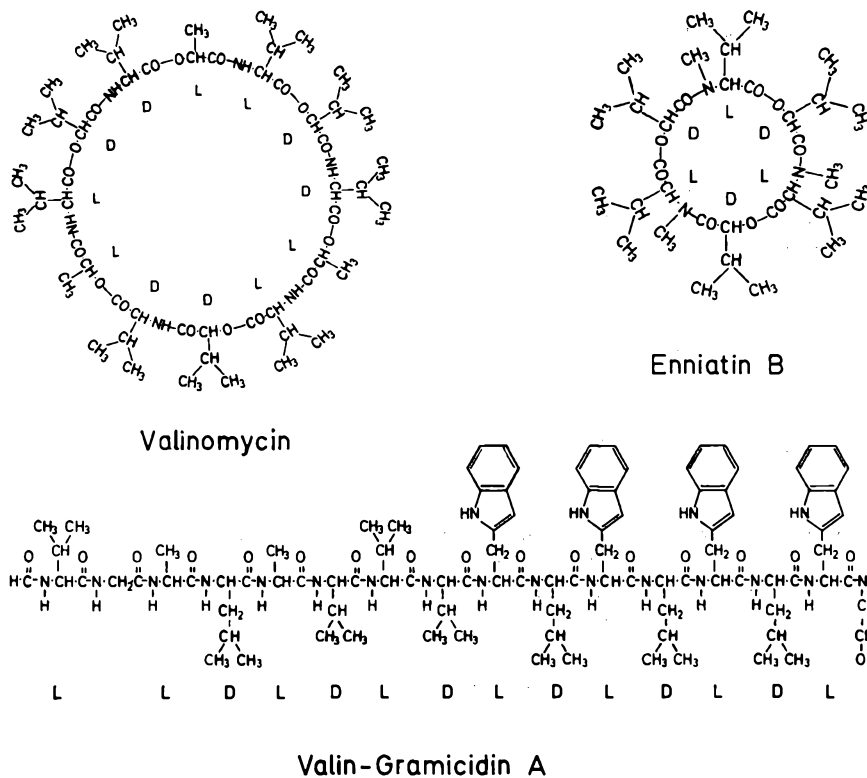


Abb. 1. Struktur der Cyclodepsipeptide Valinomycin und Enniatin B sowie des Valin-Gramicidin A

## Einleitung

Membranaktive Antibiotika, wie die Cyclodepsipeptide Enniatin B<sup>1,2</sup> und Valinomycin<sup>3,4</sup> (Abb. 1), sowie das lineare Peptid Gramicidin A<sup>5</sup> (Abb. 1) induzieren einen selektiven Alkaliionen-Transport in biologischen Membranen<sup>6,7</sup> und Modellmembransystemen<sup>8-10</sup>. Während die Cyclodepsipeptid-Antibiotika in der Membran als Ionen-Carrier wirken<sup>9,11</sup>, bildet das Gramicidin A Ionenleitungs Kanäle<sup>11-14</sup>, die aus assoziierten Gramicidin-A-Molekülen bestehen<sup>12-14</sup>. Die Ionenselektivität wird durch eine spezifische Komplexbildung zwischen Kationen und diesen Antibiotika an der Membranoberfläche erreicht und ist auch in homogener Lösung zu beobachten. Bei dieser Komplexbildung müssen Konformationsänderungen des Antibiotikums im Verlaufe des Ligandenaustausches am Kation und der damit zusammenhängenden Anpassung der Ligandenkonformation an Ionen verschiedener Größe von entscheidender Bedeutung sein<sup>15</sup>. Andererseits sind während der Diffusion des unkomplexierten Antibiotikums durch die Membranbereiche verschiedener Polarität ebenfalls Konformationsumlagerungen zu erwarten.

In diesem Zusammenhang interessieren die Konformationseigenschaften dieser Moleküle. Daher werden die Konformationsänderungen in Lösungsmitteln verschiedener Polarität anhand von spektroskopischen Eigenschaften und relaxationskinetischen Untersuchungen diskutiert. Die Ergebnisse unserer kinetischen Experimente geben nicht nur Aufschluß über die Geschwindigkeiten der Konformationsumlagerungen, sondern auch über die Anzahl der im Gleichgewicht vorhandenen Konformationszustände.

## Experimentelle Methoden

Die Messungen des Zirkulardichroismus erfolgten mit einem Roussel-Jouan-Dichrograph (Modèle CD 185) und werden als molare Elliptizität  $[\theta]$  angegeben. Die <sup>1</sup>H-NMR-Spektren wurden mit einem Varian-HA-100-Spektrometer aufgenommen. Die Angabe der chemischen Verschiebung erfolgt in ppm, relativ zum internen Standard Tetramethylsilan.

Für die kinetischen Untersuchungen der Konformationsänderungen haben sich zwei neue, speziell für kleine Flüssigkeitsmengen (etwa 1 ml) entwickelte Ultraschall-Relaxationsverfahren<sup>16</sup> als besonders geeignet erwiesen. Die Ultraschallwelle verursacht eine periodische Störung des chemischen Gleichgewichtes durch Druck- und Temperaturszillationen. Infolge einer verzögerten Einstellung des chemischen Gleichgewichtes wird die Schallwelle bei ihrer Ausbreitung gedämpft.

- P. A. PLATTNER, K. VOGLER, R. O. STUDER, P. QUITT und W. KELLER-SCHIERLEIN, *Helv. Chim. Acta* 46 (1963) 927.
- M. M. SHEMYAKIN, YU. A. OVCHINNIKOV, A. A. KIRYUSHKIN und V. T. IVANOV, *Tetrahedron Letters* 885 (1963).
- M. M. SHEMYAKIN, N. A. ALDANOVA, E. I. VINOGRADOVA und M. YU. FEIGINA, *Tetrahedron Letters* 1921 (1963).
- H. BROCKMANN, M. SPRINGORUM, G. TRÄXLER und I. HÖFER, *Naturwiss.* 50 (1963) 689.
- R. SARGES und B. WITKOP, *J. Amer. Chem. Soc.* 87 (1965) 2011.
- C. MOORE und B. C. PRESSMAN, *B. B. Res. Comm.* 15 (1964) 562.
- H. A. LARDY, S. N. GRAVEN und S. ESTRADA-O, *Fed. Proceed.* 26 (1967) 1355.
- P. MÜLLER und D. O. RUDIN, *B. B. Res. Comm.* 26 (1967) 398.
- D. C. TOSTESON, T. E. ANDREOLI, M. TIEFFENBERG und P. COOK, *J. Gen. Physiol.* 51 (1968) 373 S.
- G. EISENMAN, S. M. CIANI und G. SZABO, *Fed. Proceed.* 27 (1968) 1289.
- S. KRASNE, G. EISENMAN und G. SZABO, *Science* 174 (1971) 412.
- S. B. HLADKY und D. A. HAYDON, *Nature* 225 (1970) 451.
- M. C. GOODALL, *Arch. Biochem. Biophys.* 147 (1971) 129.
- D. W. URRY, M. C. GOODALL, J. D. GLICKSON und D. F. MAYERS, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 68 (1971) 1907.
- TH. FUNCK, F. EGGERS und E. GRELL, *Chimia* 26 (1972) 637.
- F. EGGERS und TH. FUNCK, in Vorbereitung.

Die vom Relaxationsprozeß herrührende Ultraschalldämpfung ist durch die folgende Funktion gegeben<sup>17</sup>:

$$\alpha\lambda = A \frac{\omega\tau}{1 + (\omega\tau)^2}$$

$\omega$  ist die Kreisfrequenz der Schallwelle ( $\omega = 2\pi f$ ) als periodischer Störung;  $\tau$  ist die Relaxationszeit für den betreffenden chemischen Prozeß;  $A$  ist ein Maß für die Relaxationsamplitude und ist abhängig von der Reaktionsenthalpie und dem Reaktionsvolumen;  $\alpha\lambda$  ist die vom Relaxationsprozeß verursachte Ultraschallabsorption pro Wellenlänge. Bei Auftragung von  $\log \alpha\lambda$  gegen  $\log f$  ergibt sich für einen Einzelprozeß ein charakteristischer Kurvenverlauf (vgl. Abb. 6b) mit einem Maximum bei  $f = 1/2\pi\tau$ . Bei mehreren Relaxationsvorgängen setzt sich die Gesamtabsorption aus den Absorptionsbeiträgen der einzelnen Prozesse zusammen. Aus der Anzahl der Relaxationszeiten lassen sich Schlüsse auf die Anzahl der im Gleichgewicht vorliegenden Zustände gewinnen<sup>17</sup>.

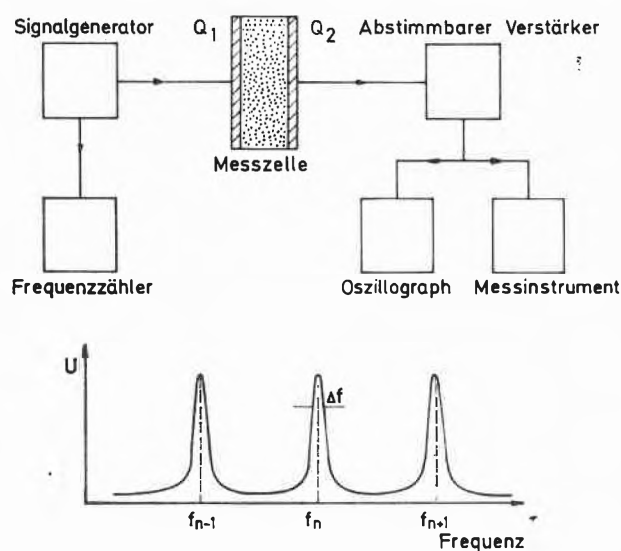


Abb. 2. Resonatormethode zur Messung der Ultraschallabsorption. Oben: Blockschaltbild. Unten: Frequenzabhängigkeit der Ausgangsspannung am Empfängerquarz  $Q_2$  mit Resonanz-Peaks von der Halbwertsbreite  $\Delta f$

Die Resonatormethode (Abb. 2) benutzt stehende Schallwellen (0,4 bis etwa 25 MHz) in einem Plattenresonator, der aus zwei Quarzwandlern ( $Q_1$  und  $Q_2$ ) und dem von beiden Wandlern eingeschlossenen Flüssigkeitsvolumen gebildet wird. In der Ausgangsspannung am Empfängerquarz  $Q_2$  treten Resonanzpeaks auf, aus deren Halbwerts-Breiten ( $\Delta f$ ) sich  $\alpha\lambda$  bestimmen läßt. Die Pulsmethode (Abb. 3) benutzt die Ausbreitung von

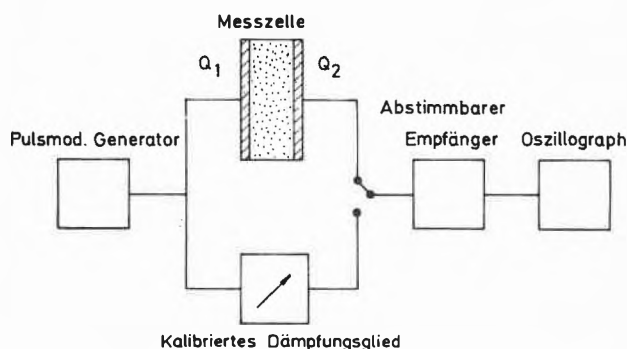


Abb. 3. Blockschaltbild der Pulsmethode zur Messung der Ultraschallabsorption

impulsmodulierten Schallwellen (etwa 15 bis 150 MHz) in der Flüssigkeit; sie werden beim Durchgang vom Senderquarz  $Q_1$  zum Empfängerquarz  $Q_2$  um den Faktor  $e^{-\alpha x}$  ( $x$ : Weglänge des Schalls in der Zelle) gedämpft. Durch den Vergleich des Signals am Empfängerquarz  $Q_2$  mit dem durch ein kontinuierlich einstellbares, kalibriertes Dämpfungsglied geschwächten Eingangssignal wird  $\alpha\lambda$  für verschiedene Schallfrequenzen bestimmt.

## Ergebnisse und Diskussion

### Enniatin B

Die spektroskopischen Eigenschaften des Enniatin B in verschiedenen Lösungsmitteln weisen auf von der Polarität des Lösungsmittels abhängige Konformationsänderungen hin<sup>18, 19</sup>. Die Änderungen des Zirkulardichroismus in den Lösungsmittelsystemen *n*-Hexan/Äthanol und Äthanol/Trifluoräthanol (Abb. 4) lassen die Existenz mehrerer solcher Konformationsgleichgewichte erkennen. Einzelheiten dieser Konformationsumlagerungen gehen aus der Abhängigkeit spektroskopischer Eigenschaften von der Lösungsmittelzusammensetzung hervor. Als Beispiel zeigt Abb. 5 eine Zusammenstellung der Lösungsmittelabhängigkeit des Zirkulardichroismus und der chemischen Verschiebungen für die  $\alpha$ CH-Protonen der *N*-Methyl-L-valin-Reste ( $\delta_{\alpha\text{-CH}}^{\text{L-V}}$ ) und der *D*- $\alpha$ -Hydroxy-isovaleriansäure-Reste ( $\delta_{\alpha\text{-CH}}^{\text{D-H}}$ ) im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum des Enniatin B.

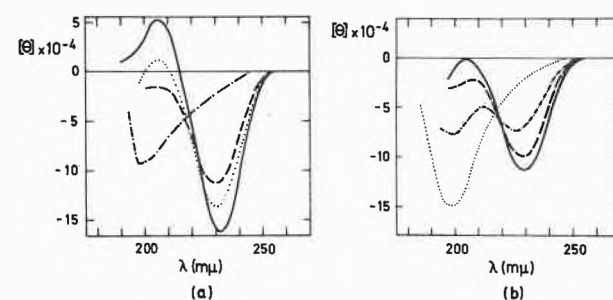


Abb. 4. Zirkulardichroismus von Enniatin B in verschiedenen Lösungsmitteln ( $[\theta]$ : molare Elliptizität; Angabe der Lösungsmittelzusammensetzung in Vol.-%;  $T = 25^\circ\text{C}$ ): (a) *n*-Hexan (—); 30% Äthanol in *n*-Hexan (· · · ·); Äthanol (---); 38% Wasser in Äthanol (- · - · -). (b) Äthanol (—); 10% Trifluoräthanol in Äthanol (- · - · -); 30% Trifluoräthanol in Äthanol (· · · ·)

Die chemische Verschiebung der  $\alpha$ CH-Protonen der *N*-Methylvalinreste bzw. der  $\alpha$ -Hydroxy-isovaleriansäure-Reste wird durch den Anisotropieeffekt der benachbarten Ester- bzw. Amidcarbonylgruppen beeinflusst. Da der Anisotropieeffekt auch von der räumlichen

<sup>17</sup> M. EIGEN und L. DE MAEYER, in *Techniques of Organic Chemistry*, Vol. 8, Part 2, Interscience, New York 1963, S. 895.

<sup>18</sup> M. M. SHEMYAKIN, YU. A. OVCHINNIKOV, V. T. IVANOV, V. K. ANTONOV, E. I. VINogradova, A. M. SHKROB, G. G. MALENKOV, A. V. EVSTRATOV, I. A. LAINE, E. I. MELNIK und I. D. RYABOVA, *J. Membrane Biol.* 1 (1969) 402.

<sup>19</sup> E. GRELL, TH. FUNCK und F. EGGERS, in *Symposium on Molecular Mechanisms of Antibiotic Action on Protein Biosynthesis and Membranes* (Ed. D. VASQUEZ), Elsevier Publ. Co., 1972.

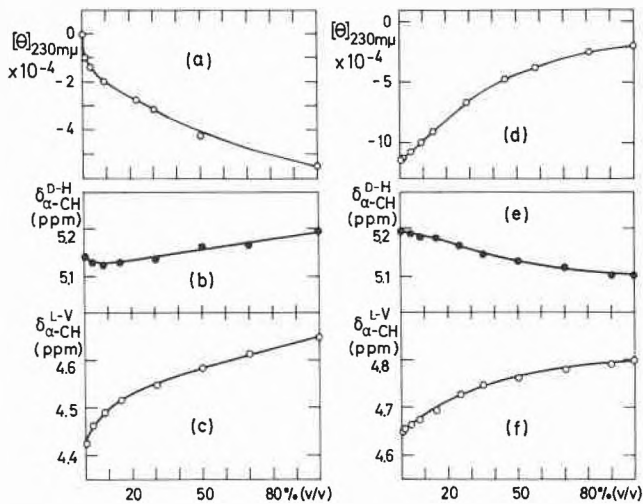
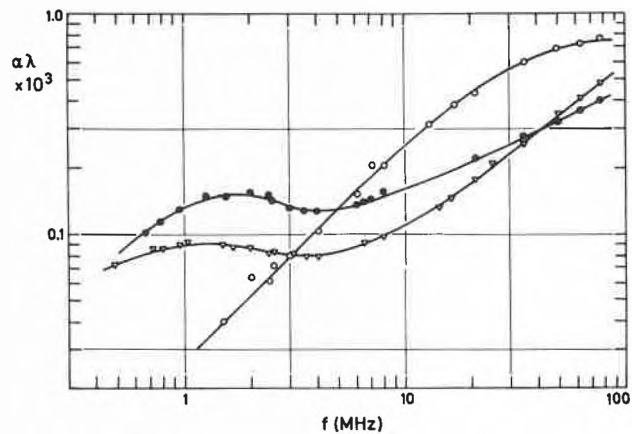


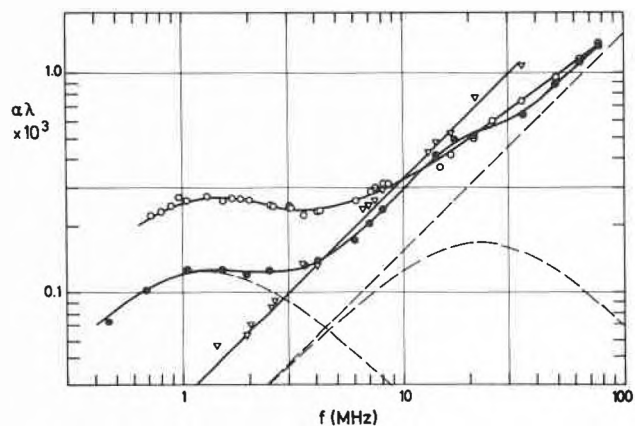
Abb. 5. Spektroskopische Eigenschaften von Enniatin B als Funktion der Lösungsmittelzusammensetzung (in Vol.-%): Zirkulardichroismus bei 230 m $\mu$  ( $[\theta]$ ): molare Elliptizität;  $T = 25^\circ\text{C}$ ) in *n*-Hexan/Äthanol (a) und in Äthanol/Trifluoräthanol (d). Chemische Verschiebungen für das  $\alpha\text{CH}$ -Proton im D- $\alpha$ -Hydroxy-isovaleriansäure-Rest ( $\delta_{\alpha\text{-CH}}^{\text{D-H}}$ ) in  $d_{12}$ -Cyclohexan/ $d_6$ -Äthanol (b), in  $d_6$ -Äthanol/ $d_3$ -Trifluoräthanol (e) und für das  $\alpha\text{CH}$ -Proton im N-Methyl-L-valin-Rest ( $\delta_{\alpha\text{-CH}}^{\text{L-V}}$ ) in  $d_{12}$ -Cyclohexan/ $d_6$ -Äthanol (c) und in  $d_6$ -Äthanol/ $d_3$ -Trifluoräthanol (f)

Anordnung beider Gruppen zueinander abhängt, können Konformationsumlagerungen durch Änderungen der chemischen Verschiebung angezeigt werden. Die bei der Erhöhung der Polarität im Lösungsmittelsystem *n*-Hexan/Äthanol nur an den  $\alpha\text{CH}$ -Protonen der N-Methylvalin-Reste deutlich auftretenden Verschiebungsänderungen (Abb. 5c) weisen deshalb auf eine bevorzugte Umorientierung der Ester-carbonylgruppen hin. Aus der Übereinstimmung des Verlaufs dieser Mediumabhängigkeit mit derjenigen des Zirkulardichroismus (Abb. 5a) folgt, daß mit beiden Methoden dieselben Prozesse erfaßt werden. Erst beim Übergang zum polareren Lösungsmittelsystem Äthanol/Trifluoräthanol ist auch eine ausgeprägte Abhängigkeit der Verschiebung der  $\alpha\text{CH}$ -Protonen der  $\alpha$ -Hydroxy-isovaleriansäure-Reste vom Medium zu beobachten (Abb. 5e, f), was auf eine Umlagerung der gesamten Molekülstruktur schließen läßt.

In den Ultraschallabsorptionsspektren des Enniatin B (Abb. 6a, b) kommen die vorliegenden Konformationsgleichgewichte in den durch Relaxationsprozesse gekennzeichneten Konformationsübergängen zum Ausdruck. Selbst im unpolarsten Medium, in *n*-Hexan, liegt das Enniatin B nicht in einer einheitlichen Konformation vor, denn in der Ultraschallabsorption tritt ein ausgeprägter Relaxationsprozeß um 80 MHz (Relaxationszeit:  $2 \cdot 10^{-9}\text{s}$ ) als Kennzeichen eines Konformationsgleichgewichts auf. Mit zunehmender Polarität des Lösungsmittels tritt ein neuer Relaxationsprozeß bei niedrigeren Frequenzen um 1,6 MHz (Relaxationszeit:  $10^{-7}\text{s}$ ) in den Vordergrund, der die Beteiligung eines zusätzlichen Gleichgewichts anzeigt. Die Amplitude dieser Re-



(a) Ultraschallabsorptionsspektren von Enniatin B ( $5,2 \cdot 10^{-2}\text{ m}$ ) ( $\circ$ ) in *n*-Hexan, ( $\bullet$ ) 31% Äthanol in *n*-Hexan und ( $\nabla$ ) in Äthanol ( $T = 25^\circ\text{C}$ )



(b) Ultraschallabsorptionsspektren von Enniatin B (0,15 m) in ( $\circ$ ) Äthanol, ( $\bullet$ ) in 17% Trifluoräthanol in Äthanol und ( $\nabla$ ) in Trifluoräthanol ( $T = 25^\circ\text{C}$ ). Zerlegung der Gesamtabsorption in die Anteile der einzelnen Relaxationsprozesse (----) für ( $\bullet$ )

Abb. 6. Kinetik der Konformationsänderungen von Enniatin B

laxation durchläuft bei etwa 25% Äthanolgehalt ein Maximum (Abb. 7). Dies weist in Übereinstimmung mit dem Verlauf des Zirkulardichroismus und der NMR-Parameter (Abb. 5) darauf hin, daß in diesem Medium die beiden beteiligten Konformationszustände annähernd gleich besetzt sind. In Lösungsmitteln höherer Polarität, im System Äthanol/Trifluoräthanol, treten kompliziertere Ultraschallabsorptionsspektren (Abb. 6b) auf, die auf andere Übergänge zwischen verschiedenen Konformationszuständen schließen lassen. Im reinen Trifluoräthanol führen die Wechselwirkungen zwischen dem Antibiotikum und den Lösungsmittelmolekülen wieder zu einheitlicheren Konformationszuständen und damit zu der beobachteten Vereinfachung der Ultraschallabsorption. Insgesamt wird die Vielfalt der Konformationsumlagerungen beim Enniatin B nur durch Solvatationsprozesse induziert, z.B. durch spezifische Wechselwirkungen zwischen den Ester- und Amidgruppen des Antibiotikums und polaren Lösungsmittelmolekülen.

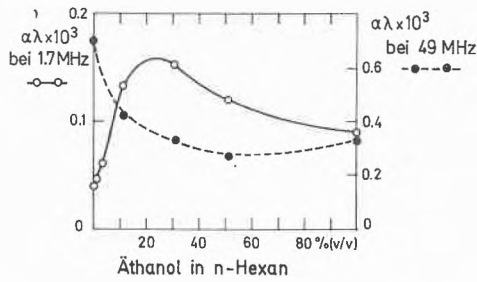


Abb. 7. Ultraschallabsorption von Enniatin B ( $5,2 \cdot 10^{-2}$  m) bei 1,7 MHz (○) und 49 MHz (●) in Abhängigkeit von der Lösungsmittelzusammensetzung im System *n*-Hexan/Äthanol ( $T = 25^\circ\text{C}$ )

### Valinomycin

Für das Valinomycin ist der Mechanismus der spezifischen Komplexbildung mit Alkaliionen aufgeklärt worden<sup>15</sup>. Da Konformationsänderungen im Verlaufe der Komplexbildung zur Spezifität entscheidend beitragen, sind genauere Untersuchungen des konformativen Verhaltens dieses Antibiotikums von besonderem Interesse. Konformationszustände können beim Valinomycin durch Ausbildung innermolekularer Wasserstoffbrücken zwischen den Amidgruppen stabilisiert werden. So bildet sich in unpolaren Lösungsmitteln eine ringförmig gefaltete, durch sechs intramolekulare Wasserstoffbrücken stabilisierte, kompakte Struktur aus<sup>18</sup>, die der durch Kristallstrukturanalyse ermittelten Struktur des Valinomycins im Valinomycin- $\text{K}^+$ -Komplex sehr ähnlich ist<sup>20</sup>.

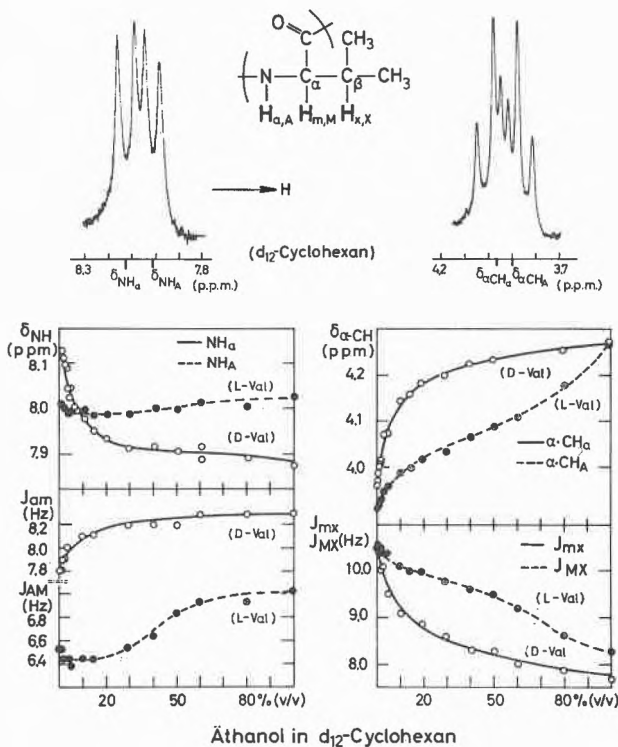


Abb. 8. Konformationsänderungen von Valinomycin im Lösungsmittelsystem  $d_{12}$ -Cyclohexan/Äthanol. Oben:  $^1\text{H}$ -NMR-Teilspektrum in  $d_{12}$ -Cyclohexan (Signale der  $\text{NH}$ - und  $\alpha\text{CH}$ -Protonen der D- und L-Valin-Reste). Unten: Chemische Verschiebungen und Kopplungskonstanten ( $J$ ) als Funktion der Lösungsmittelzusammensetzung

In dieser Konformation sind jeweils drei Wasserstoffbrücken in zwei verschiedenen Ebenen angeordnet, die einerseits die D-Valin- und L-Milchsäure-Reste (Lac-Ebene) und andererseits die L-Valin- und D- $\alpha$ -Hydroxyisovaleriansäure-Reste (HyIV-Ebene) enthalten<sup>19</sup>. Bei Erhöhung der Polarität des Lösungsmittels werden die innermolekularen Wasserstoffbrücken nacheinander aufgebrochen, wobei sich das Molekül schrittweise auseinanderfaltet. Die Konformationsänderungen bei diesem Auffaltungsprozeß lassen sich anhand der spektroskopischen Eigenschaften des Valinomycins deutlich nachweisen<sup>19</sup>.

Als Beispiel hierfür ist in Abb. 8 die Lösungsmittelabhängigkeit der in den  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren des Valinomycins auftretenden chemischen Verschiebungen und

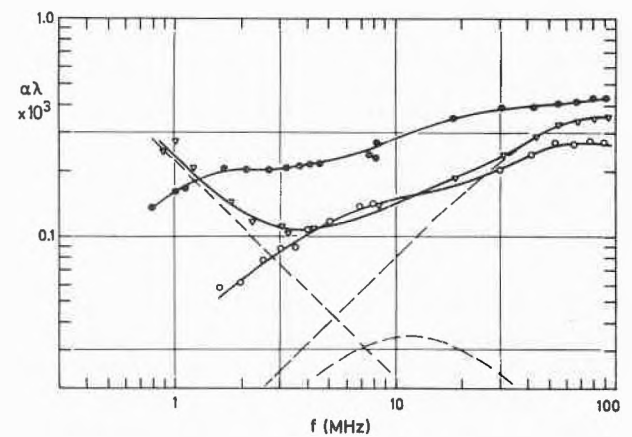


Abb. 9a) Kinetik der Konformationsänderungen von Valinomycin. Ultraschallabsorptionsspektren von Valinomycin ( $10^{-2}$  m) in (○) *n*-Hexan, (▽) 17% Äthanol in *n*-Hexan und in (●) 50% Äthanol in *n*-Hexan ( $T = 25^\circ\text{C}$ ). Zerlegung der Gesamtabsorption in die Anteile der einzelnen Relaxationsprozesse (---) für (▽)

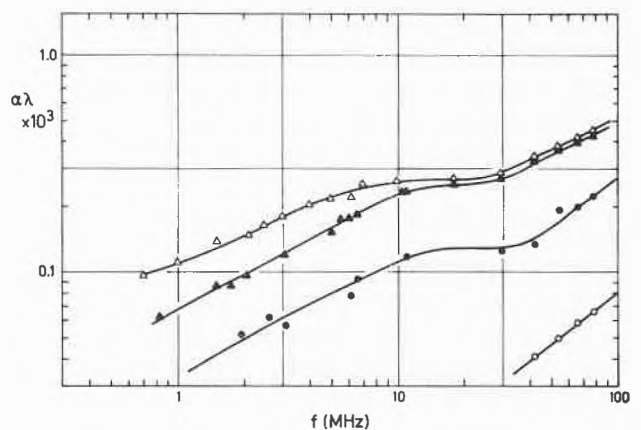


Abb. 9b) Ultraschallabsorptionsspektren von Gramicidin A im Lösungsmittelsystem Di-*n*-butyläther/Äthanol. Die angegebenen Absorptionskurven beziehen sich auf eine normierte Konzentration von  $8 \cdot 10^{-3}$  m. Experimentelle Bedingungen: (○) Di-*n*-butyläther ( $2 \cdot 10^{-3}$  m); (●) 10% Äthanol in Di-*n*-butyläther ( $5 \cdot 10^{-3}$  m); (▲) 30% Äthanol in Di-*n*-butyläther ( $7 \cdot 10^{-3}$  m); (Δ) Äthanol ( $8 \cdot 10^{-3}$  m).  $T = 25^\circ\text{C}$

<sup>20</sup> M. PINKERTON, I. K. STEINRAUF und P. DAWKINS, *B. B. Res. Comm.* 35 (1969) 512.

Kopplungskonstanten für verschiedene Protonen der Valinreste dargestellt. Dabei kennzeichnen die Indizes a, m und x die Protonen der D-Valin-Reste und andererseits A, M und X die Protonen der L-Valin-Reste. Durch kleine Zusätze von Äthanol, d. h. durch geringe Polaritätserhöhung, werden nur die Parameter für die Protonen der D-Valin-Reste geändert. Sowohl die deutliche Verschiebung der  $\text{NH}_\alpha$ - und  $\alpha\text{CH}_\alpha$ -Signale als auch die Änderungen der Kopplungskonstanten werden als Auffaltung der durch Wasserstoffbrücken stabilisierten Struktur interpretiert, die vorwiegend die Lac-Ebene erfaßt. Die Signale der in der anderen Ebene angeordneten Reste bleiben nahezu unverändert. Erst im Bereich höherer Polarität, bei Äthanolgehalten über 30%, zeigen die Kopplungskonstanten Konformationsumlagerungen auch im Bereich der HyIV-Ebene an, in der jedoch die innermolekularen Wasserstoffbrücken weitgehend erhalten bleiben, was aus der unveränderten Verschiebung der  $\text{NH}_\alpha$ -Signale folgt. Eine vollständige Auffaltung des Moleküls ist erst in den Spektren des Valinomycins in Lösungsmitteln noch höherer Polarität zu erkennen.

Die Ultraschallabsorptionsspektren des Valinomycins in diesem Lösungsmittelsystem (Abb. 9a) entsprechen völlig dem geschilderten Verhalten und lassen darüber hinaus schon in *n*-Hexan auf Grund der beobachteten Relaxationsprozesse das Vorliegen von mindestens zwei Konformationsgleichgewichten erkennen. Im Polaritätsbereich der Auffaltung der Lac-Ebene tritt bei niedrigen Frequenzen (unterhalb 1 MHz) eine intensive Ultraschallabsorption auf, die von verhältnismäßig langsamen Konformationsänderungen (Relaxationszeiten um  $10^{-7}$  s) hervorgerufen wird. Bei höheren Äthanolzusätzen verschwindet dieser Relaxationsprozeß wieder, so daß in diesem Polaritätsbereich Konformationsänderungen mit kürzeren Relaxationszeiten im Vordergrund stehen,

bis schließlich im weitgehend geöffneten Valinomycinmolekül in Methanol ein kontinuierliches Spektrum zahlreicher Konformationsübergänge zu beobachten ist (vgl. Abb. 5 in <sup>15</sup>).

#### Gramicidin A

Die Ultraschallabsorptionsspektren des Gramicidin A (Abb. 9b) zeigen, daß in Lösungsmitteln geringer Polarität im Zeitbereich unserer kinetischen Messungen (0,4  $\mu\text{s}$  bis 1 ns) keine Relaxationsprozesse zu beobachten sind, d. h. daß das Molekül vorwiegend in einem einheitlichen Konformationszustand vorliegt. Beim Übergang zu polarerer Medien tritt in zunehmendem Maße Ultraschallabsorption auf. Aus der Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit folgt, daß den entsprechenden Relaxationen neben Konformationsumlagerungen auch von der Polarität des Mediums abhängige Assoziationsprozesse zugeordnet werden müssen. Dieses kinetische Verhalten des Gramicidin A steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen spektroskopischer Untersuchungen <sup>21</sup>.

Wir danken Herrn Dr. R. O. STUDER, F. Hoffmann-La Roche & Co., Basel, für die Überlassung des Enniatin B, und Herrn Dr. E. GROSS, National Institutes of Health, Bethesda (Md.), für die Überlassung des Gramicidin A. Den Herren Dr. G. ENGLERT, F. Hoffmann-La Roche & Co., Basel, und Dr. H.-M. SCHIEBEL, Gesellschaft für molekularbiologische Forschung, Stöckheim, sind wir für die Zusammenarbeit bei der Messung der NMR-Spektren dankbar. Herrn Professor M. EIGEN danken wir für zahlreiche Diskussionen.

E. GRELL, F. EGGERS und Th. FUNCK

Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie,  
D-34 Göttingen-Nikolausberg

<sup>21</sup> B. E. ISBELL, C. RICE-EVANS und G. H. BEAVEN, *FEBS Letters* 25 (1972) 192.

## Kinetik und Mechanismus der selektiven Bindung von Ionen durch Cyclodepsipeptid-Antibiotika\*

### Summary

Stability constants for cation complexes of valinomycin and enniatin B were determined in methanol employing spectrophotometric titrations. Kinetic studies by relaxation methods led to the elucidation of the reaction mechanism of complex formation. Complexation of valinomycin with cations follows a multistep reaction characterized by two relaxation times. The rate constants observed for complex formation of approximately  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  are remarkably small compared to diffusion controlled reactions and correspond to the rate constants of the slow conformational changes of the uncomplexed depsiptide. Therefore, the rate limiting step of cation complexation is a ligand conformational change which occurs during the stepwise substitution of solvent molecules from the cation. Differences in the rates of complex formation of valinomycin with sodium and potassium ions are significant for the mechanism of ion selectivity which is related to conformational properties.

### Einleitung

Spezielle Funktionen biologischer Membransysteme, wie z. B. die Erregung der Nervenmembran, sind oft mit einem schnellen und spezifischen Austausch von  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  gekoppelt. Wegen der Komplexität solcher Systeme gelang eine Aufklärung der molekularen Mechanismen noch nicht. Hingegen wurden ionenspezifische Antibiotika, wie z. B. die Cyclodepsipeptide Va-

\* Vorläufige Mitteilung. Vorgetragen an der Herbstversammlung der Schweizerischen Chemischen Gesellschaft am 14. Oktober 1972 in Luzern.

linomycin<sup>1,2</sup> und Enniatin B<sup>3,4</sup> entdeckt, welche den passiven Transport von  $K^+$  durch Modell- als auch durch biologische Membransysteme selektiv beschleunigen<sup>5-11</sup>. Diese definierten Verbindungen sind zur Untersuchung der prinzipiellen Mechanismen der Alkaliionen-Selektivität geeignet. Da ferner diese membranaktiven Antibiotika sowohl im membranengebundenen Zustand<sup>12</sup> als auch in homogener Lösung<sup>13,14</sup> Komplexe mit Alkaliionen bilden, konnte die Unterscheidung von Ionen nach deren Größe auf eine selektive Komplexbildung zurückgeführt werden. Im Falle des  $K^+$ -Komplexes von Valinomycin gelang eine Kristallstrukturanalyse<sup>15</sup>. Das Antibiotikum umschließt das zentrale Kation durch eine Koordination der sechs Ester-Carbonylgruppen, entsprechend einem multidentalen Komplexbildner, wobei die Konformation des Liganden durch Ausbildung von sechs intramolekularen Wasserstoffbrücken zwischen den Amidgruppen stabilisiert wird.

Die Ionenspezifität für Alkaliionen bestimmter Größe wird durch den Unterschied in der Solvatisierungsenergie begrenzt. Um eine möglichst ausgeprägte Spezifität zu erreichen, ist eine vollständige Substitution der Solvatomoleküle durch den Liganden erforderlich. Die maximale Stabilität ist für ein Ion bestimmter Größe dann zu erreichen, wenn die Differenz zwischen der Ligandenbindungsenergie und der Solvatisierungsenergie für das entsprechende Kation ein Maximum aufweist, was nur durch besondere Konformationseigenschaften des Liganden ermöglicht werden kann<sup>16</sup>. Damit eine hohe Komplexbildungsgeschwindigkeit erreicht werden kann, forderten EIGEN und WINKLER eine schrittweise Substitution der Solvatomoleküle, was mit kinetischen Messungen am  $Na^+$ -Komplex des Monactins in Übereinstimmung steht<sup>16</sup>.

Da Valinomycin die ausgeprägteste  $K^+/Na^+$ -Selektivität aller untersuchten Antibiotika aufweist, war eine Aufklärung des Mechanismus der Komplexbildung sowie der Ionenspezifität im Hinblick auf die biologische Bedeutung dieser Prozesse von Interesse.

### Experimentelle Methodik

**Gleichgewichtsuntersuchungen und spektroskopische Methoden.** Die scheinbaren Stabilitätskonstanten der Kationenkomplexe von Valinomycin und Enniatin B wurden in wasserfreiem Methanol durch spektralphotometrische Titration im UV-Bereich mit Hilfe eines Cary-14-Spektrometers bestimmt. Die Messung der IR-Absorption erfolgte in NaCl- und Irtran-5-Zellen an einem Perkin-Elmer-IR-Spektrophotometer 521 und des Zirkulardichroismus an einem Roussel-Jouan-Dichrograph (Modèle CD 185).

**Kinetische Messungen.** Die Kinetik der Komplexbildung in Methanol ließ sich unter Anwendung der Ultraschallabsorptionsmethode im Frequenzbereich von 0,4 bis 100 MHz<sup>17</sup> sowie der Temperatursprung-Relaxationsspektrometrie<sup>18</sup> untersuchen. Bei der letzteren Methode wurde das chemische Komplexe-Gleichgewicht in Methanol, enthaltend Tetrabutylammoniumperchlorat (0,1 m), durch eine sprunghafte Änderung der Temperatur innerhalb von wenigen Mikrosekunden ( $\mu s$ ) gestört. Da sich die Absorptionseigenschaften des komplexierten von denen

des unkomplexierten Valinomycins unterscheiden, kann man die Zeitkonstante der Anpassung des Gleichgewichtssystems an die neuen äußeren Bedingungen (Relaxationszeit  $\tau$ ) mit einem UV-empfindlichen Detektionssystem messen. Der Aufbau des UV-Temperatursprung-Relaxationsspektrometers geht aus dem Blockschaltbild in Abb. 1 hervor.

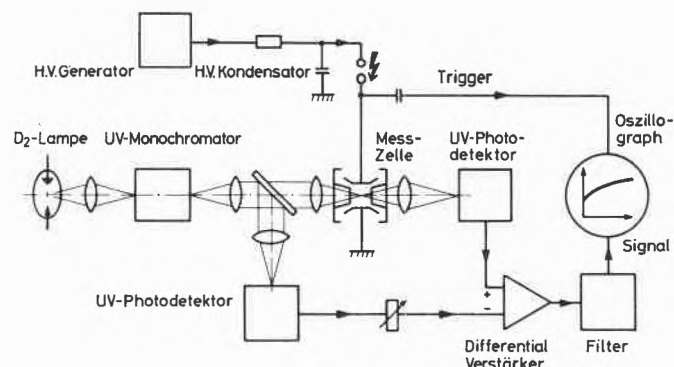


Abb. 1. Blockschaltbild des UV-Temperatursprung-Relaxationsspektrometers

In Abb. 2 ist ein Oszillogramm eines Temperatursprung-experiments mit Valinomycin in Gegenwart von KCl dargestellt. Neben einer schnellen, zeitlich nicht mehr auflösbaren Relaxation ( $\tau_1 < 5 \mu s$ ) beobachtet man einen zweiten, langsameren Prozeß ( $\tau_2 = 185 \mu s$ ). Das folgende kinetische Reak-

- M. M. SHEMYAKIN, N. A. ALDANOVA, E. I. VINOGRADOVA und M. YU. FEIGINA, *Tetrahedron Letters* 1963, 1921.
- H. BROCKMANN, M. SPRINGORUM, G. TRÄXLER und I. HÖFER, *Naturwiss.* 50 (1963) 689.
- P. A. PLATTNER, K. VOGLER, R. O. STUDER, P. QUITT und W. KELLER-SCHIERLEIN, *Helv. Chim. Acta* 46 (1963) 927.
- M. M. SHEMYAKIN, YU. A. OVCHINNIKOV, A. A. KIRYUSHKIN und V. T. IVANOV, *Tetrahedron Letters* 1963, 885.
- H. A. LARDY, S. N. GRAVEN und S. ESTRADA-O, *Fed. Proceed.* 26 (1967) 1355.
- C. MOORE und B. C. PRESSMAN, *B. B. Res. Comm.* 15 (1964) 562.
- P. MUELLER und D. O. RUDIN, *B. B. Res. Comm.* 26 (1967) 398.
- D. C. TOSTESON, P. COOK, TH. ANDREOLI und M. TIEFFENBERG, *J. Gen. Physiol.* 50 (1967) 2513.
- G. EISENMAN, S. M. CIANI und G. SZABO, *Fed. Proceed.* 27 (1968) 1289.
- B. C. PRESSMAN und D. H. HAYNES, in *Symposium on the Molecular Basis of Membrane Functions* (Ed. D. C. TOSTESON), Prentice Hall, Englewood Cliffs (N. J.), S. 221.
- P. LÄUGER, in *Molecular Mechanisms of Antibiotic Action on Protein Biosynthesis and Membranes* (Ed. E. MUÑOZ, F. GARCÍA-FERRÁNDIZ und D. VÁSQUEZ), Elsevier Publ. Co., 1972.
- E. GRELL, TH. FUNCK und F. EGGERS, in *Molecular Mechanisms of Antibiotic Action on Protein Biosynthesis and Membranes* (Ed. E. MUÑOZ, F. GARCÍA-FERRÁNDIZ und D. VÁSQUEZ), Elsevier Publ. Co., 1972, S. 646.
- H. K. WIPF, L. A. R. PIODA, Z. ŠTEFANAC und W. SIMON, *Helv. Chim. Acta* 51 (1968) 377.
- M. M. SHEMYAKIN, YU. A. OVCHINNIKOV, V. T. IVANOV, V. K. ANTONOV, E. I. VINOGRADOVA, A. M. SHKROB, G. G. MALENKOV, A. V. EVSTRATOV, I. A. LAINE, E. I. MELNIK und I. D. RYABOVA, *J. Membrane Biol.* 1 (1969) 402.
- M. PINKERTON, L. K. STEINRAUF und P. DAWKINS, *B. B. Res. Comm.* 35 (1969) 512.
- M. EIGEN und R. WINKLER, in *The Neurosciences, Second study program* (Ed. F. O. SCHMITT), The Rockefeller University Press, New York 1970, S. 685.
- E. GRELL, F. EGGERS und TH. FUNCK, *Chimia* 26 (1972) 632.
- M. EIGEN und L. DE MAEYER, in *Techniques of Organic Chemistry*, Vol. 8, Part 2, Interscience, New York 1963, S. 895.



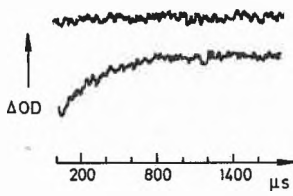
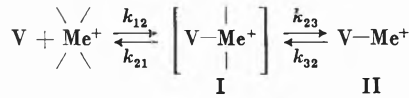


Abb. 2. Kinetik der Komplexbildung von Valinomycin mit  $K^+$  in Methanol, enthaltend  $0,1\text{ M}$  Tetrabutylammoniumperchlorat: Oszillogramm eines Temperatursprung-Relaxationsexperimentes (experimentelle Bedingungen:  $\lambda = 224\text{ nm}$ ,  $T = 25^\circ\text{C}$ ,  $\Delta T = 3,5^\circ\text{C}$ ,  $c_V + c_{KCl} = 1,17 \cdot 10^{-4}\text{ M}$ )

tionsschema genügte den experimentellen Befunden (V: Valinomycin):



Die Geschwindigkeitskonstanten der gesamten Bildungsreaktion  $k_{on}$  (1) und Zerfallsreaktion  $k_{off}$  (2) werden zu (3) und (4) vereinfacht, falls der Zerfall des Zwischenzustandes I schneller erfolgt als die Umwandlung zum Endzustand II ( $k_{21} \gg k_{23}$ ):

$$k_{on} = \frac{k_{12}k_{23}}{k_{21} + k_{23}}; \tag{1}$$

$$k_{off} = \frac{k_{21}k_{32}}{k_{21} + k_{23}}; \tag{2}$$

$$k_{on} = \frac{k_{12}k_{23}}{k_{21}}; \tag{3}$$

$$k_{off} = k_{32}. \tag{4}$$

Für die beiden reziproken Relaxationszeiten gilt unter diesen vereinfachenden Bedingungen (vgl. EIGEN und DE MAEYER<sup>18</sup>):

$$1/\tau_1 = k_{21} + k'_{12}; \tag{5}$$

$$1/\tau_2 = k_{32} + \frac{k_{23}k'_{12}}{k_{21} + k'_{12}}; \tag{6}$$

$$k'_{12} = k_{12}(c_V + c_{Me^+}).$$

Nach Gl. (5) wird eine lineare Konzentrationsabhängigkeit für  $1/\tau_1$  und nach (6) ein Sättigungsverhalten für  $1/\tau_2$  erwartet. Unter den Grenzbedingungen  $k_{21} \gg k'_{12}$  bzw.  $k_{21} \ll k'_{12}$  folgt für  $1/\tau_2$ :

$$\frac{1}{\tau_2} = k_{32} + \frac{k_{23}k'_{12}}{k_{21}}; \tag{7}$$

$$\frac{1}{\tau_2} = k_{32} + k_{23}. \tag{8}$$

**Ergebnisse und Diskussion**

Die durch spektralphotometrische Titration ermittelten Stabilitätskonstanten ( $K'$ : scheinbare Stabilitätskonstante unter Vernachlässigung der Aktivitätskoeffizienten) der Komplexe des Valinomycins und des Enniatin B mit verschiedenen einwertigen Kationen sind in Abb. 3 zusammengefaßt. In Übereinstimmung mit den durch andere Methoden gewonnenen Gleichgewichtsdaten<sup>14</sup> findet man für die Komplexe des Valinomycins mit den Kationen  $K^+$  und  $Rb^+$  ein ausgeprägteres Stabilitätsmaximum als beim Enniatin B. Diese unterschiedlichen Spe-

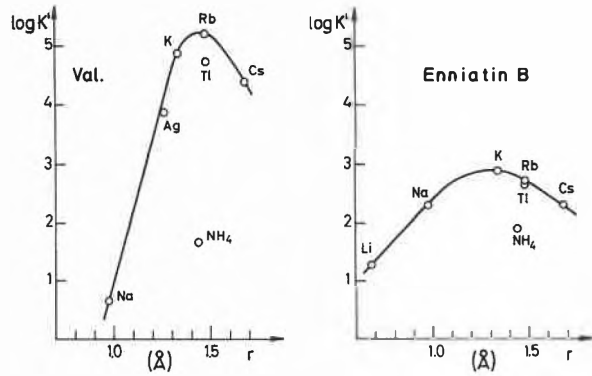


Abb. 3. Stabilitätskonstanten ( $K'$ ) der Komplexe von Valinomycin und Enniatin B mit einwertigen Kationen in Methanol als Funktion des Ionenradius ( $r$ ).  $T = 25^\circ\text{C}$

zifizitäten des Valinomycins und des Enniatin B bilden die Grundlagen einer Erklärung der verschiedenartigen Einflüsse dieser Antibiotika auf den Ionentransport in natürlichen Membranen und Modellmembranen.

Wesentliche Unterschiede zwischen Valinomycin und Enniatin B sind an der Konformation des Depsipeptidliganden in den Komplexen mit verschiedenen Kationen zu beobachten. Während die Komplexe des Enniatin B mit verschiedenen Kationen vergleichbare spektroskopische Eigenschaften aufweisen<sup>12</sup>, treten bei den Komplexen des Valinomycins auffällige Unterschiede auf, die auf verschiedenartige Strukturen dieser Komplexe hinweisen. Für den Valinomycin- $K^+$ -Komplex ist nach seinen spektroskopischen Eigenschaften (vgl. Abb. 4) in Lösung eine Struktur anzunehmen, die der durch Röntgenstrukturanalyse für den kristallinen Komplex ermittelten<sup>15</sup> weitgehend ähnlich ist und die durch eine kompakte, durch innermolekulare Wasserstoffbrücken zwischen den Amidgruppen stabilisierte Konformation des Depsipeptids charakterisiert ist. Auch in den Komplexen des  $Rb^+$  und  $Cs^+$  liegt nach ihren Spektren eine sehr ähnliche Konformation des Depsipeptids vor (vgl. Abb. 4b). Dagegen findet man nach den spektralen Eigenschaften im Valinomycin-Komplex des wesentlich kleineren  $Na^+$ -Ions, das sehr viel schwächer gebunden wird, eine völlig andersartige Konformation des Depsipeptids, die z. B. im unterschiedlichen Zirkulardichroismus (vgl. Abb. 4 a)

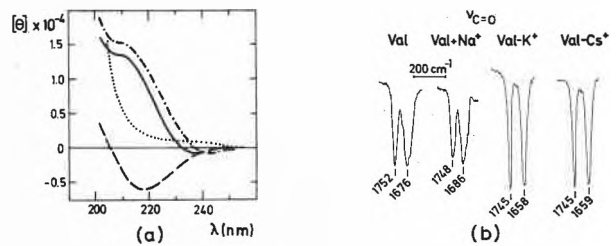


Abb. 4a) Zirkulardichroismus von Valinomycin in Methanol ( $\cdots\cdots$ ) sowie in Gegenwart von  $1,5\text{ M NaClO}_4$  ( $-----$ ),  $10^{-2}\text{ M KCl}$  ( $——$ ),  $1,2 \cdot 10^{-2}\text{ M CsCl}$  ( $- - - - -$ ).  $[\theta]$ : molare Elliptizität

Abb. 4b) IR-Absorption von  $3,2 \cdot 10^{-2}\text{ M Valinomycin}$  in Methanol, Schichtdicke  $d = 0,1\text{ mm}$ ;  $1,5 \cdot 10^{-2}\text{ M Valinomycin}$  mit  $1,7\text{ M NaClO}_4$  in Methanol,  $d = 0,2\text{ mm}$ ;  $3,2 \cdot 10^{-2}\text{ M Valinomycin}$  mit  $5 \cdot 10^{-2}\text{ M KCl}$  bzw.  $6,7 \cdot 10^{-2}\text{ M CsCl}$  in Methanol,  $d = 0,1\text{ mm}$

und in der veränderten IR-Absorption der Amid- und Estergruppen (vgl. Abb. 4b) zum Ausdruck kommt. Offenbar ist für die Komplexbildung mit dem  $\text{Na}^+$ -Ion eine starke Abwandlung der Konformation des Valinomycins im Vergleich zum Valinomycin- $\text{K}^+$ -Komplex erforderlich, die in die Richtung der in polaren Lösungsmitteln beobachteten Konformationen des Valinomycins<sup>17</sup> erfolgt. Diese Konformationsunterschiede des Depsipeptidliganden in Komplexen mit Kationen stark unterschiedlicher Größe dürften ein wesentliches Element der hohen  $\text{K}^+/\text{Na}^+$ -Selektivität des Valinomycins sein.

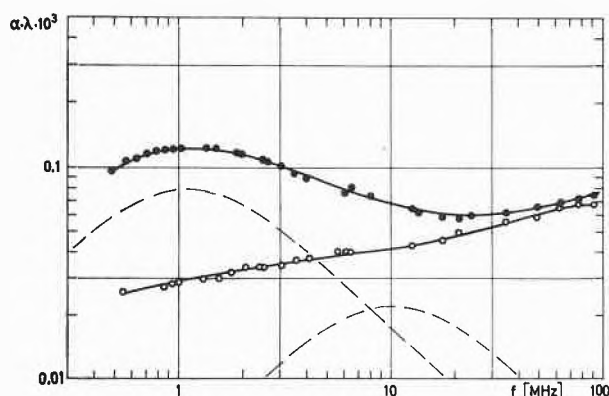


Abb. 5. Kinetik der Komplexbildung von Valinomycin mit  $\text{Na}^+$ : Ultraschallabsorptionsspektren von  $2,0 \cdot 10^{-2}$  m Valinomycin in Methanol (○) sowie in Gegenwart von 0,4 m  $\text{NaClO}_4$  (●).  $T = 25^\circ\text{C}$

Die Kinetik der Komplexbildung des Valinomycins wurde für die  $\text{K}^+$ -,  $\text{Rb}^+$ - und  $\text{Cs}^+$ -Komplexe wie oben beschrieben mit einem UV-Temperatursprung-Relaxationsspektrometer untersucht (vgl. Abb. 1 und 2), während für kinetische Messungen an den Komplexen mit geringerer Stabilität ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ) Ultraschallrelaxationsmethoden<sup>17,18</sup> angewandt wurden. Die Schallabsorptionsspektren (vgl. <sup>17</sup>) eines Experiments über die Komplexbildung von Valinomycin mit  $\text{Na}^+$  sind in Abb. 5 wiedergegeben. Die Gesamtabsorption des Valinomycin- $\text{NaClO}_4$ -Reaktionsgemisches läßt sich in die charakteristischen Absorptionsanteile zweier einzelner Relaxationsprozesse mit den entsprechenden Relaxations-

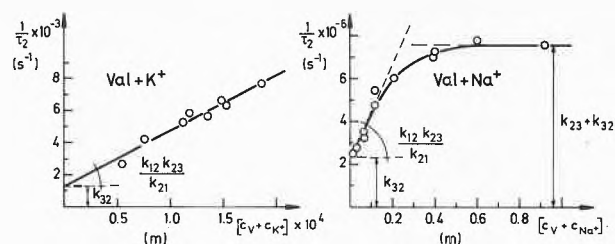


Abb. 6. Kinetik der Komplexbildung von Valinomycin mit  $\text{K}^+$  bzw.  $\text{Na}^+$  in Methanol: Konzentrationsabhängigkeiten der reziproken Relaxationszeiten  $\frac{1}{\tau_2}$ .  $T = 25^\circ\text{C}$

zeiten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  zerlegen (vgl. <sup>17</sup>). Als Beispiele für die Ergebnisse der Relaxationsmessungen sind in Abb. 6 die Konzentrationsabhängigkeiten von  $1/\tau_2$  für die Komplexbildung mit  $\text{K}^+$  und  $\text{Na}^+$  dargestellt. Die für den oben beschriebenen zweistufigen Reaktionsmechanismus gültigen Beziehungen sind bei der Komplexbildung mit  $\text{K}^+$  [vgl. Gl. (7)] und bei der Komplexbildung mit  $\text{Na}^+$  in einem weiten Konzentrationsbereich [vgl. Gl. (6)] erfüllt.

Die in Tabelle I für verschiedene Kationen zusammengestellten einzelnen Geschwindigkeitskonstanten zeigen weitere Einzelheiten dieses Reaktionsmechanismus. Die Geschwindigkeitskonstanten für den bimolekularen Reaktionsschritt, in dem die ersten, zu einem wenig stabilen Vorkomplex I führenden Schritte der Bindung des Kations zusammengefaßt sind, sind nur wenig niedriger als die Konstanten für einen Ligandenaustausch, dessen Geschwindigkeit nur durch die Diffusion begrenzt ist. Sie sind kennzeichnend für einen raschen, schrittweisen Ligandenaustausch am Kation, wie er für die Komplexbildung von Monactin mit  $\text{Na}^+$  diskutiert worden ist<sup>16</sup>. Schon diese ersten Bindungsschritte können zur Spezifität beitragen, wie aus einem Vergleich zwischen den Daten für  $\text{Na}^+$  und  $\text{NH}_4^+$  hervorgeht. Trotz vergleichbarer Gleichgewichtskonstante ( $K_{12}$ ) für die primäre Bindung des Kations ist die Bildungsgeschwindigkeit dieses Vorkomplexes (I) beim stabileren  $\text{NH}_4^+$ -Komplex wesentlich höher.

Die für alle untersuchten Kationen bestimmbar Geschwindigkeitskonstanten der gesamten Bildungsreak-

Tabelle I. Kinetische Parameter der Komplexbildung von Valinomycin mit Kationen in Methanol ( $T = 25^\circ\text{C}$ )

(Die hier angegebenen Stabilitätskonstanten der  $\text{K}^+$ -,  $\text{Rb}^+$ - und  $\text{Cs}^+$ -Komplexe wurden in Gegenwart von 0,1 m Tetrabutylammoniumperchlorat bestimmt)

Kation	$K'$ ( $\text{m}^{-1}$ )	$k_{12}$ ( $\text{m}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	$k_{21}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_{12} = \frac{k_{12}}{k_{21}}$ ( $\text{m}^{-1}$ )	$k_{23}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{32}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_{23} = \frac{k_{23}}{k_{32}}$
$\text{NH}_4^+$	47	$1 \cdot 10^9$	$1,5 \cdot 10^8$	6,5	$2 \cdot 10^6$	$2,5 \cdot 10^5$	8
$\text{Na}^+$	4,7	$7 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^7$	3,5	$4 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^6$	2
$\text{K}^+$	$3 \cdot 10^4$	$k_{\text{on}}$ ( $\text{m}^{-1}\text{s}^{-1}$ ): $3,5 \cdot 10^7$				$1,3 \cdot 10^3$	
$\text{Rb}^+$	$6,5 \cdot 10^4$					$7,5 \cdot 10^2$	
$\text{Cs}^+$	$8 \cdot 10^9$					$2,2 \cdot 10^3$	

tion ( $k_{on}$ ) sind wesentlich niedriger und stimmen ungefähr mit den Geschwindigkeitskonstanten überein, die für die langsamsten Konformationsänderungen des Valinomycins beobachtet worden sind<sup>12, 17</sup>. Dies zeigt, daß die Geschwindigkeit der Komplexbildung durch den nach der Bildung des Vorkomplexes I folgenden monomolekularen Schritt bestimmt wird, bei dem eine Änderung der Depsipeptidkonformation erforderlich ist.

Die für die Dynamik der Komplexbildung charakteristischen Geschwindigkeitskonstanten der gesamten Hin- und Rückreaktion ( $k_{12}k_{23}/k_{21}$  bzw.  $k_{32}$ ) sind in Abb. 7 für Alkaliionen verschiedener Größe dargestellt. Beide kinetischen Parameter tragen zu einer optimalen Sta-

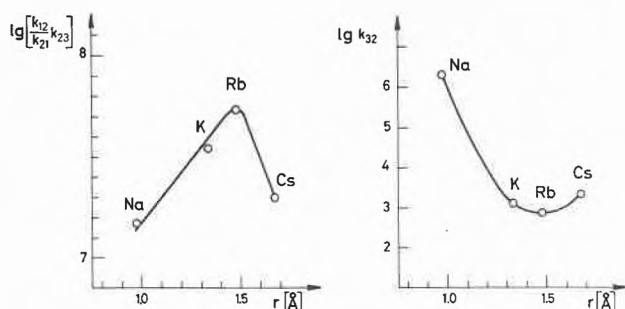


Abb. 7. Kinetische Parameter für die Bildung ( $k_{12}/k_{21}k_{23}$ ) und den Zerfall ( $k_{32}$ ) von Komplexen zwischen Valinomycin und Alkaliionen, dargestellt als Funktion des Ionenradius ( $r$ )

bilität des  $Rb^+$ -Komplexes bei. Einerseits erreicht  $k_{12}k_{23}/k_{21}$  für dieses Ion ein Maximum, während  $k_{32}$  ein Minimum durchläuft. Offenbar ist das Valinomycin an Kationen dieser Größe nicht nur in thermodynamischer Hinsicht, sondern auch kinetisch angepaßt. Die abgestuften Stabilitäten der Komplexe mit Kationen verschiedener Größe kommen im wesentlichen in den Geschwindigkeitskonstanten der Zerfallsreaktion zum Ausdruck. Darüber hinaus wird die Spezifität dadurch erhöht, daß die Komplexbildungsgeschwindigkeit für Kationen, deren Größe vom Optimum abweicht, deutlich verringert ist. Als Ursachen dafür sind die von der Ionengröße abhängigen Solvatisierungsenergien und, insbesondere für das wesentlich kleinere  $Na^+$ -Ion, die Anpassung der Depsipeptidkonformation an die unterschiedliche Größe des Kations anzusehen, wie sie in den spektralen Eigenschaften des Valinomycin- $Na^+$ -Komplexes zu erkennen ist. Beide Einflüsse tragen zu der beim Valinomycin beobachteten hohen Spezifität bei.

Wir danken Herrn Dr. R. O. STUDER, F. Hoffmann-La Roche & Co., Basel, für seine hilfreiche Zusammenarbeit und die Überlassung des Enniatin B. Herrn Professor M. EIGEN sind wir für zahlreiche Diskussionen dankbar.

TH. FUNCK, F. EGGERS und E. GRELL

Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie,  
D-34 Göttingen-Nikolausberg

## Induction of Development as Determined by a Chemical Criterion

### Part II\*

#### Abstract

In earlier papers<sup>1, 2</sup> we reported that we could not find any induction period in a monodisperse liquid AgBr emulsion, using a uniform exposure and a locus- and orientation independent development. This applied to only one system: a pure AgBr emulsion in a simple hydroquinone developer containing no bromide ions ( $pH$  12.1). In an attempt to obtain data which would allow us to generalize this finding we repeated this experiment first with a AgBrI-emulsion, containing 4 Mol-% iodide, secondly with a hydroquinone developer containing KBr ( $10^{-3}N$ ), and obtained essentially the same results.

#### Procedure

For the discussion of the onset of development we use the quotient  $n_{PD}/n_D$ , in which

$n_{PD}(t_D)$  = the number of grains which have started the reaction, i. e. which are part-developed after a time  $t_D$ ;  
 $n_D$  = the total number of grains which are "developable", i. e. carry a latent-image centre.

It is simple to find  $n_D$ . For the determination of  $n_{PD}$  we have utilized the following operating scheme:

1. liquid emulsion placed in a flow system;
2. exposure;
3. first development (short) for a time  $t_D$ ;
4. stop;
5. preparation of coated samples: addition of gelatin and hardener, coating, drying, washing, drying again;

6. bleach (followed by washing and drying): to remove any unchanged latent image;
7. total development: to determine  $n_{PD}$  from measurements of density.

Two different systems were examined:

I. emulsion:	developer:	
silver bromo-iodide	Ascorbic acid	24 g
containing 4 Mol-% iodide,	Hydroquinone	45 g
monodisperse, cubic	Sodium hydroxide	60 g
0,44 $\mu$ side length	Water to make	1000 ml
S-digested to optimum		
sensitivity**		
II. emulsion:	developer:	
pure silver bromide	Ascorbic acid	24 g
monodisperse, cubic	Hydroquinone	45 g
0,44 $\mu$ side length	Sodium hydroxide	60 g
S-digested to optimum**	Potassium bromide	2.638 g
sensitivity	Water to make	1000 ml

For use the developer was diluted 1 + 10 (together with the emulsion 1 + 20).

\* Received October 15, 1972. Part I: see References 1 and 2.

\*\* Kindly supplied by Ciba-Geigy Photochemical Ltd., Marly.

<sup>1</sup> J. KARRER, *Das Einsetzen der chemischen Entwicklung in einer flüssigen photographischen Emulsion*, Diss. ETH Zürich, Nr. 4744 (1972).

<sup>2</sup> J. KARRER and W. F. BERG, *J. Phot. Sci.* 19 (1971) 143.

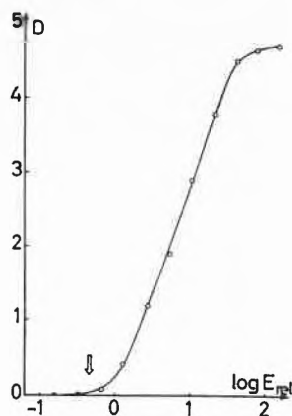


Fig. 1. Characteristic ( $D - \log E$ ) curve of layer coated with emulsion I (AgI/Br). The arrow indicates the exposure applied to the liquid emulsion in the present experiments

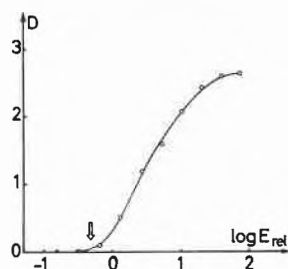


Fig. 2. As fig. 1, for emulsion II (AgBr)

**Exposure:** System I was exposed 0.35 sec, 1.12 lux in the liquid state resulting in 40% of all grains being "developable" i. e. carrying a latent-image centre.

In system II the exposure was 0.35 sec, 2.56 lux. In this case 47% of all grains carried a latent-image centre in the liquid phase. This corresponds to an exposure in the toe of the characteristic curve for a coated plate, as shown in figs. 1 and 2 (arrow).

All other treatments were identical with those in the earlier experiments<sup>1, 2</sup>.

## Results

The onset of development is best discussed<sup>1, 2</sup> with the function

$$n_{PD}/n_D = f(t_D, t_B),$$

in which:  $t_D$  = time of first development,  
 $t_B$  = time of bleaching.

In the system used, as shown earlier,  $n_{PD}$  is proportional to the density.  $n_D$  is constant and corresponds to the density  $D_0$ . So the above function can also be written as

$$D/D_0 = f(t_D, t_B).$$

We will first consider the same model as in the previous publications<sup>1, 2</sup>. Fig. 3 shows the expected normalized density as a function of bleaching time and first development time. In model (a) we assume that an induction period exists in the sense of a delayed onset of development. In that case the curves

$$D/D_0 = f(t_B, t_D = 0) \quad \text{and} \quad D/D_0 = f(t_B, \Delta t_D),$$

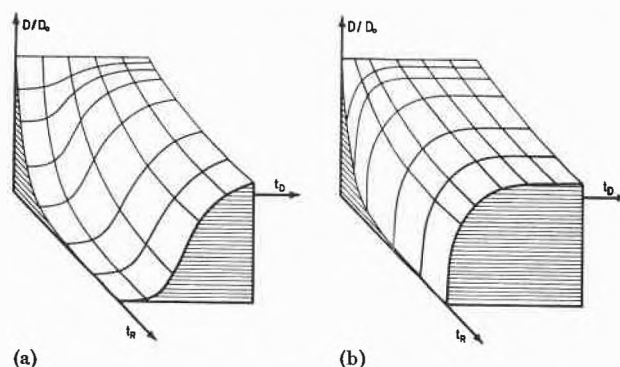


Fig. 3. Schematic representation of the effect of time of bleaching  $t_B$  and of development  $t_D$  on normalized density  $D/D_0$

(a) for a system with, and  
(b) without an induction period in the onset of development

Note:  $t_R \equiv t_B$

in which  $\Delta t_D$  means the delayed onset of development, must be identical, i. e. the gradient

$$\left( \frac{\partial (D/D_0)}{\partial t_D} \right)_{t_B} = 0 \quad \text{for} \quad t_D = 0.$$

In model (b) we assume that the development reaction starts at all centers at once. That means that all latent-image centers are enlarged at the time  $\Delta t_D$ . There will be a clear difference in bleaching between such part-developed centers and unchanged latent-image centers. In this case the gradient

$$\left( \frac{\partial (D/D_0)}{\partial t_D} \right)_{t_B} > 0 \quad \text{for} \quad t_D = 0.$$

In fig. 4 the experimental results of system I (i. e. a silver-bromo-iodide emulsion) are shown in the same manner as in the model diagramm. Normalized density is plotted as a function of both bleaching time and time

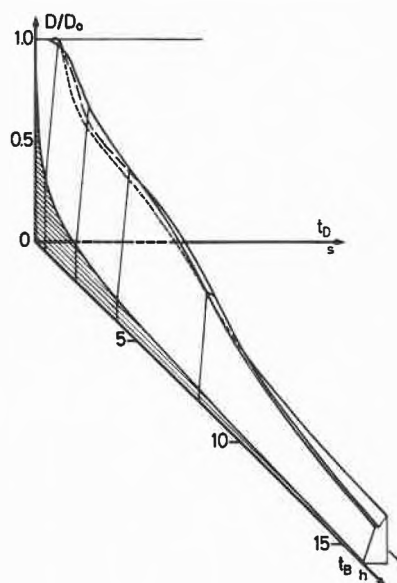


Fig. 4. Experimental data represented as in fig. 3, for emulsion I (AgI/Br); no KBr in the developer. The results correspond to case (b) in fig. 3: no induction period

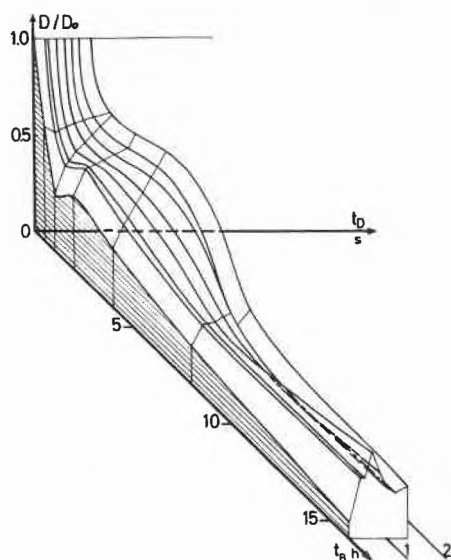


Fig. 5. Experimental data represented as in figs. 3 and 4, for emulsion II (AgBr), with KBr in the developer. Again there is no induction period

of first development. The gradient at  $t_D = 0$  is evidently greater than zero.

In fig. 5 the experimental results of system II (i.e. a pure silver-bromide emulsion developed with a bromide ion containing hydroquinone developer), are shown. Here also normalized density is plotted as a function of time of bleaching and first development. Here also the gradient  $\left(\frac{\partial(D/D_0)}{\partial t_D}\right)$  is greater than zero.

### Conclusion

In the liquid emulsion systems investigated development started at once at all grains carrying a latent-image cen-

ter in a hydroquinone-ascorbic acid solution at pH 12.1, so that the hydroquinone molecules are essentially doubly charged. No delay in the onset of the reaction could be found. An induction period in this sense did not exist or was at least shorter than 0.3 sec, which is in the order of 1/1000 of the time needed for complete development in the liquid emulsion; these findings apply for:

- a pure monodisperse cubic silver-bromide emulsion developed with a hydroquinone-ascorbic acid developer, pH 12.1 (without potassium bromide)<sup>1, 2</sup>;
- the same emulsion developed with the above developer containing potassium bromide ( $10^{-3}N$ );
- a silver-bromo-iodide emulsion developed with the same developer without potassium bromide.

It is normally assumed<sup>3, 4, 5, 6</sup>, that a high charge on the developer molecule as well as bromide ion adsorbed to the grain surface are responsible for the induction period. From the fact that even a developer containing essentially doubly charged hydroquinone molecules and potassium bromide in a concentration of  $10^{-3}M$ , shows no delay in the onset of photographic development, we assume that this statement may be generalized. When an induction period is seen in development of coated layers we believe this to be the result of secondary effects.

J. KARRER and W. F. BERG

Department of Photography, Swiss Federal Institute of Technology (ETH), Zürich

<sup>3</sup> G. M. SCHWARZ and F. URBACH, *Z. wiss. Phot. Photophys. Photochem.* 31 (1932) 77.

<sup>4</sup> T. H. JAMES, *J. Franklin Inst.* 240 (1945) 15.

<sup>5</sup> T. H. JAMES, *J. Franklin Inst.* 240 (1945) 83, 229.

<sup>6</sup> T. H. JAMES, *J. Franklin Inst.* 240 (1945) 327.

## Thermische Umlagerung von Benzyl-1-alkinyl-äthern in Gegenwart von Aminen\*

### Summary

The benzyl-1-alkynyl ethers **1a** and **1b** in the presence of ammonia or diethylamine at 50 to 80° are transformed into the corresponding *o*-tolyl-acetamides **4** to **6** (scheme 1). This observation gives good evidence that benzyl-1-alkynyl ethers **1** rearrange by a [3,3] sigmatropic process to ketene intermediates **3**—as suggested by ARENS *et al.*<sup>1</sup>—which then react with the amine present. In the absence of ammonia and diethylamine, respectively, **3** yield 2-indanones **2** (scheme 1).

Während Benzyl-vinyläther, abgesehen von einer Ausnahme\*\*, keine aromatische Claisen-Umlagerung eingehen, sondern sich über einen Radikalmechanismus in  $\gamma$ -Oxo-propylbenzole umwandeln<sup>3</sup>, wurde von ARENS *et al.*<sup>1</sup> berichtet, daß Benzyl-1-alkinyl-äther (**1**,  $R^1 = CH_3$ ,  $C_2H_5$ ,  $R^2 = H, CH_3$ ) (Schema 1) bereits bei 60°

über eine [3,3] sigmatropische Umlagerung und nachfolgende Zyklisierung zu 2-Indanonen **2** abreagieren. Der postulierte Mechanismus ist im Schema 1 angegeben. Das Ketten-Zwischenprodukt **3** wurde nicht direkt nachgewiesen.

Im Zusammenhang mit unseren Arbeiten zum Mechanismus der thermischen<sup>4, 5</sup> und photochemischen<sup>5, 6</sup>

<sup>1</sup> H. OLSMAN, A. GRAVELAND und J. F. ARENS, *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* 83 (1964) 301.

<sup>2</sup> W. J. LE NOBLE und P. J. CREAM, *J. Amer. Chem. Soc.* 86 (1964) 1649.

<sup>3</sup> K. B. WIBERG, R. R. KINTNER und E. L. MOTELL, *J. Amer. Chem. Soc.* 85 (1963) 450. A. BURGSTALLER, L. K. GIBBONS und J. C. NORDINS, *J. Chem. Soc.* 1963, 4986.

<sup>4</sup> J. ZSINDELY, Dissertation Universität Zürich, 1971.

<sup>5</sup> H. SCHMID, J. ZSINDELY und H.-J. HANSEN, *XXIIIrd International Congress of Pure and Applied Chemistry, Boston 1971*, Vol. 1, S. 251.

<sup>6</sup> P. GILGEN, Diplomarbeit Universität Zürich, 1971.

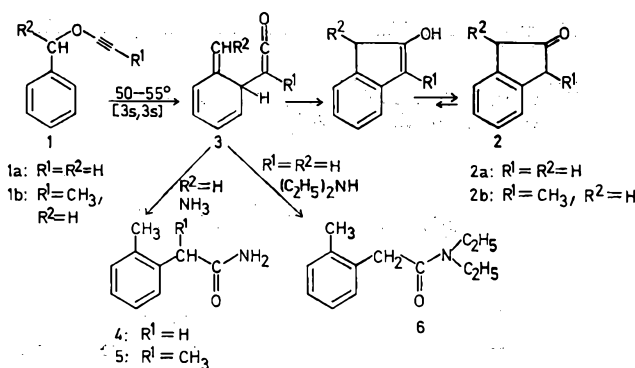
\* Eingegangen am 27. Oktober 1972.

\*\* Nach LE NOBLE und CREAM<sup>2</sup> lagert sich 3,5-Dimethoxybenzylisopropenyläther bei 240° in 2,4-Dimethoxy-6-methylphenylaceton um.

Bildung von 2-Indanonon aus 6-Methylen-tricyclo-[3.2.1.0<sup>2,7</sup>]oct-3-en-8-onen untersuchten wir die thermische Reaktion der Benzyl-1-alkinyl-äther **1a** und **1b** in Gegenwart von Aminen. Durch Abspaltung von Chlorwasserstoff und Benzylalkohol aus Chloracetaldehyd-dibenzylacetal (vgl. hierzu<sup>7,8</sup>) erhielt man den noch unbekannt Benzyl-äthynyl-äther (**1a**) und durch Umsetzung des Natriumsalzes von **1a** mit Methyljodid den Benzyl-propinyläther **1b**. **1a** konnte infolge seiner thermischen Labilität nur in Lösung (CCl<sub>4</sub>) erhalten werden.

Die Umlagerung von **1a** in Tetrachlorkohlenstofflösung bei 50 bis 55° lieferte als einziges isolierbares Produkt in etwa 45% präparativer Ausbeute 2-Indanon (**2a**) (Schema 1). Desgleichen ergab die schon bekannte Umlagerung von **1b** 1-Methyl-2-indanon (**2b**) in vergleichbarer Ausbeute<sup>1</sup>. Wurde **1a** oder **1b** in wässriger Ammoniaklösung während 3 Stunden auf 80 bis 90° erwärmt, so resultierten 2-Tolyl-acetamid (**4**)\* bzw. 2-(2'-Methylphenyl)-propionsäureamid (**5**) als einzige isolierbare Produkte in etwa 20% bzw. 54% präparativer Ausbeute. Entsprechend ergab die Umlagerung von **1a** in Diäthylamin bei 56° 17% N,N-Diäthyl-2-tolyl-acetamid (**6**). Bei der Umlagerung der Acetylenäther **1a** und **1b** in Gegenwart der Amine traten die entsprechenden Indanone **2a** bzw. **2b** nicht mehr auf.

Wir werten diese Befunde als Beweis für das Auftreten der schon von ARENS *et al.*<sup>1</sup> postulierten Keten-Zwischenstufen **3**, die mit den Aminen zu den beobachteten Amiden rascher abreagieren, als sie sich zu den Indanonon cyclisieren (Schema 1).

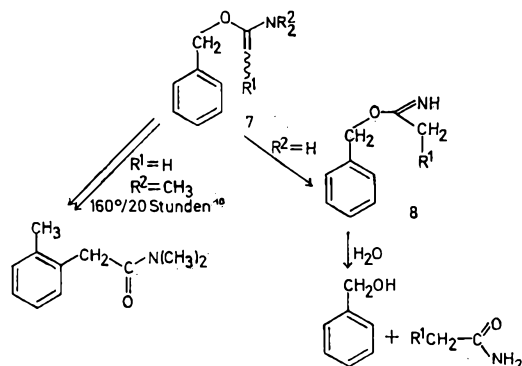


Schema 1

Für die Bildung der Amide **4** bis **6** aus den Äthern **1a** und **1b** in Gegenwart von Ammoniak bzw. Diäthylamin ist noch ein anderer Weg denkbar. Es ist bekannt, daß Äthoxyacetylen mit Diäthylamin bei 20stündigem Rückflußkochen 1-Äthoxy-1-diäthylaminoäthylen und 1,1-Bisdiäthylaminoäthylen liefert<sup>9</sup>. Entsprechend könnte aus **1a** mit Diäthylamin 1-Benzoyloxy-1-diäthylaminoäthylen (**7**, R<sup>1</sup>=H, R<sup>2</sup>=C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>) entstehen (Schema 2). Die thermische Umlagerung solcher Benzyl-dialkyl-amino-keten-acetale **7** in N,N-Dialkyl-tolyl-acetamide tritt nach ESCHENMOSER *et al.*<sup>10</sup> in der Regel erst bei

\* **4** entstand auch, wenn **1** in wässriger Ammoniaklösung bei Raumtemperatur während 16 Stunden stehengelassen wurde.

Temperaturen > 120° und Reaktionszeiten von 14 bis 24 Stunden ein. Weiterhin ist zu erwähnen, daß bei der Umsetzung von Äthoxyacetylen mit primären Aminen (wie z. B. Benzylamin oder auch Ammoniak) die primär zu erwartenden Ketenaminoacetale rasch zu den entsprechenden N-Alkyl-acetiminooäthyläthern vom Typ **8** tautomerisieren<sup>9</sup>, die mit Wasser zu N-Alkyl-acetamiden weiterreagieren<sup>11</sup>.



Schema 2

Die Reaktion der Acetylenäther **1a** und **1b** in Gegenwart von wässrigem Ammoniak sollte demnach bei einer vorgängigen Addition des Ammoniaks an die Acetylenbindung zu Acetamid bzw. Propionamid führen.

Die Bildung von **4** und **5** kann somit nur durch eine Claisen-Umlagerung der Acetylenäther und nachfolgende Addition des Ammoniaks an die Keten-Zwischenstufe erklärt werden. Das gleiche gilt sicher auch für die Bildung des Diäthylamids **6**.

## Experimenteller Teil

### 1. Benzyl-äthynyläther (**1a**) (vgl. 7)

Zu 40 ml flüssigem Ammoniak gab man 0,28 g Natrium und etwas Eisen(III)-nitrat und wartete die Amidbildung ab. Man fügte 1,1 g Chloracetaldehyd-dibenzylacetal (hergestellt aus Chloracetaldehyd-dimethylacetal und Benzylalkohol in Gegenwart katalytischer Mengen *p*-Toluolsulfonsäure\*) hinzu und hielt unter Schwenken 30 min auf -35°. Der Ammoniak wurde im Stickstoffstrom abgetrieben und der Rückstand bei -20° mit auf -20° gekühlter Natriumchloridlösung versetzt und anschließend mit Natriumdihydrogenphosphatlösung auf pH = 7 gebracht. Anschließend wurde mit 50 ml eisgekühltem Tetrachlorkohlenstoff extrahiert. Die erhaltene Tetrachlorkohlenstofflösung (Stammflösung) zeigte im IR-Spektrum\*\* zwei intensive, etwa gleich starke Banden bei 3330 (-C≡C-H) und 2155 (-O-C≡C-H). Eine schwächere Bande bei 3610

\* Das Dibenzylacetal enthält laut NMR-Spektrum etwa 30% des gemischten Chloracetaldehyd-benzyl-methylacetals.

\*\* Angaben in cm<sup>-1</sup>.

<sup>7</sup> *Organic Syntheses* 34 (1954) 46.

<sup>8</sup> J. F. ARENS, *Adv. Org. Chem.* 2 (1960) 117.

<sup>9</sup> J. F. ARENS und Th. R. RIX, *Proc. Kon. Ned. Akad. Wetenschap. B* 57 (1954) 275.

<sup>10</sup> A. E. WICK, D. FELIX, K. STEEN und A. ESCHENMOSER, *Helv. Chim. Acta* 47 (1964) 2425. D. FELIX, K. CSCHWEND-STEEN, A. E. WICK und A. ESCHENMOSER, *ibid.* 52 (1969) 1030.

<sup>11</sup> J. F. ARENS und Th. R. RIX, *Proc. Kon. Ned. Akad. Wetenschap. B* 57 (1954) 270.

zeigte noch die Anwesenheit von Benzylalkohol an. Der Benzylalkohol konnte zwar durch Chromatographie an Alox (Pentan/Äther 19:1) entfernt werden, jedoch wurde **1a** dabei zum großen Teil in 2-Indanon (**2a**) umgewandelt. IR (CCl<sub>4</sub>) nach Chromatographie an Alox: 3330 und 2155 schwach, 1760 (>C=O, 2-Indanon<sup>4</sup>).

1.1 Umlagerung von **1a** zu 2-Indanon (**2a**): 10 ml der Stammlösung von **1a** wurden 3,5 Stunden auf 50° bis 55° gehalten. Danach war dünn-schichtchromatographisch (Alox, Pentan/Äther 9:1) kein **1** ( $R_f = 0,59$ ) mehr nachweisbar; 2-Indanon (**2a**) ( $R_f = 0,18$ ) hatte sich gebildet. Es wurde durch präparative Dünn-schichtchromatographie (präp. DC) isoliert und destilliert; Ausbeute 45 mg (etwa 47%, bezogen auf eingesetztes Dibenzylacetal), Smp. 58°, Misch-Smp. mit authentischem 2-Indanon: keine Depression. Smp. des Oxims von **2a** 153°; Misch-Smp. mit authentischem 2-Indanon-oxim: keine Depression.

1.2. Umlagerung von **1a** in Ammoniaklösung: 20 ml der Stammlösung wurden bei 0° im Vakuum rasch eingengt und der Rückstand (etwa 200 mg) in 2 ml 30-prozentiger Ammoniaklösung und 0,5 ml Aceton 2 Stunden auf 80 bis 90° gehalten. Man versetzte mit Wasser und extrahierte mit Äther. Nach dem Abdestillieren des Äthers verblieb ein öliger Rückstand, der beim Lösen in Pentan kristallisierte. Man erhielt 23 mg (etwa 20%, bezogen auf eingesetztes Dibenzylacetal) 2-Tolyl-acetamid (**5**) vom Smp. 163 bis 164°. Eine Mischprobe mit authentischem 2-Tolyl-acetamid zeigte keine Smp.-Depression.

1.3. Umlagerung von **1a** in Diäthylamin: 20 ml der Stammlösung wurden bei 0° im Vakuum rasch eingengt und der Rückstand (etwa 200 mg) in 5 ml Diäthylamin 3 Stunden unter Rückflußkochen (56°) erwärmt. Man destillierte das Diäthylamin ab, reinigte den Rückstand durch präp. DC (Kieselgel, Pentan/Äther 7:3) und erhielt nach Kugelrohrdestillation bei 80 bis 90°/0,01 Torr 28 mg (etwa 17%, bezogen auf eingesetztes Dibenzylacetal) N,N-Diäthyl-2-tolyl-acetamid (**6**) als farbloses Öl. Die Identifikation erfolgte durch spektroskopischen Vergleich mit authentischem Material.

## 2. Benzyl-1-propinyläther (**1b**) (vgl. <sup>1</sup>)

Nach **1** wurden 1,1 g Chloracetaldehyd-dibenzylacetal mit Natriumamid in flüssigem Ammoniak umgesetzt. Nach 30 min Reaktionszeit gab man 2,0 g Methyljodid zur Reaktionslösung. Nach weiteren 15 min wurde wie unter **1** beschrieben aufgearbeitet und mit Äther extrahiert. Man engte ein und entfernte den Benzylalkohol und weitere Nebenprodukte durch Chromatographie an Alox (Pentan/Äther 7:1) und präp. DC an Kieselgel. Destillation im Kugelrohr bei 50 bis 60°/0,01 Torr gab 115 mg (20%) **1b** als farbloses Öl. IR: 2280 (—O—C≡C—, sehr stark), 1755 (>C=O, 2-Indanon, sehr schwach). NMR (CCl<sub>4</sub>)\*: 7,33 [s; 5 arom. H], 4,70 [s; 2H an C(1')], 1,65 [s; 3H an C(3)]. MS: 146 (M<sup>+</sup>, 23%), 91 (100). Die thermische Umlagerung von **2** in Tetrachlorkohlenstoff<sup>1</sup> lieferte 1-Methyl-2-indanon (**4**)<sup>12</sup>. IR (CCl<sub>4</sub>): 1755 (>C=O, 2-Indanon).

2.1. Umlagerung von **1b** in Ammoniaklösung: 25 mg **1b** wurden in 2 ml 30-prozentiger Ammoniaklösung und 0,5 ml Aceton während 3 Stunden auf 80 bis 90° erwärmt und wie unter 1.2 beschrieben aufgearbeitet. Man erhielt 15 mg (54%) 2-(2'-Methylphenyl)-propionsäureamid (**6**) vom Smp. 125° (Lit. 125 bis 126°<sup>13</sup>). IR (CHCl<sub>3</sub>): 3510, 3395 (—NH<sub>2</sub>), 1675 (Amid I), 1580 (Amid II). NMR (CDCl<sub>3</sub>): 7,4 bis 7,15 [m; 4 arom. H], 5,3 [sehr breites s; NH<sub>2</sub>], 3,81 [q, J = 7,5 Hz; H an C(2)], 2,34 [s; CH<sub>3</sub> an C(2')], 1,54 [d; 3H an C(3)]. MS: 163 (M<sup>+</sup>, 42%), 119 (100), 105 (30), 91 (33).

Wir danken dem Schweizerischen Nationalfonds für die Unterstützung dieser Arbeit.

A. WUNDERLI, J. ZSINDELY, H.-J. HANSEN  
und H. SCHMID

Organisch-Chemisches Institut der Universität Zürich

\* Angaben in ppm, relativ zu internem Tetramethylsilan, = 0; s = Singulett, d = Dublett, q = Quartett, m = Multiplett.

<sup>12</sup> A. T. BLUMQUIST und E. J. MORICONTI, *J. Org. Chem.* 26 (1961) 3761.

<sup>13</sup> M. S. GIBSON, *J. Chem. Soc.* 1956, 808.

## Studies on the primary structure of cow $\kappa$ -casein: the primary sequence of cow para- $\kappa$ -casein\*

### Summary

The present note indicates the primary structure of cow para- $\kappa$ -casein.

The primary action of rennin (EC 3.4.4.3) on casein is constituted by the split of a Phe → Met linkage, as shown by JOLLÈS *et al.*<sup>1,2</sup> and the release of the caseino-(glyco)-peptide from  $\kappa$ -casein; at the same time para- $\kappa$ -casein precipitates. The present Note deals with the establishment of the primary structure of cow para- $\kappa$ -casein. In two previous papers<sup>3,4</sup>, we have established in detail the structure of two long as well as of four shorter peptides from para- $\kappa$ -casein accounting for nearly all the amino acids<sup>5,6</sup> present in this molecule:

1. Gln-Gln-Gln-Asn-Glu-Glu-Glu-Pro-Ile-Arg-Cys-Glu-Lys-Asp-Glu-Arg-Phe-Phe-Ser-Asp-Lys-Ile-Ala-Lys-Tyr-Ile-Pro-Ile-Gln-Tyr-Val-Leu
2. Ile-Asn-Asn-Gln-Phe
3. Gln-Gln-Lys-Pro-Val-Ala-Leu
4. Tyr-Ala-Lys-Pro-Ala-Ala-Val-Arg

5. Val-Leu-Ser-Arg-Tyr-Pro-Ser-Tyr-Gly-Leu-Asn-Tyr-Tyr
6. (C-terminal sequence): Ser-Pro-Ala-Gln-Ile-Leu-Gln-Trp-Gln-Val-Leu-Ser-Asn-Thr-Val-Pro-Ala-Lys-Ser-Cys-Gln-Ala-Gln-Pro-Thr-Thr-Met-Ala-Arg-His-Pro-(Pro, His)-His-Leu-Ser-Phe. OH

We want briefly to indicate how these six sequences could be joined.

\* 28th communication on caseins. Received by the editor, November 11, 1972. — Note added in proof. A Note devoted to the same subject by G. BRIGNON, J.-C. BRIGNON, B. RIBADEAU-DUMAS and B. C. DAS appeared in November 1972 in the *FEBS Letters* 27 (1972) 301. Following our previous published data, both studies were thus completed quite independently at the same time.

<sup>1</sup> P. JOLLÈS, *Angew. Chem. (Internat. Ed.)* 5 (1966) 558.

<sup>2</sup> A. DELFOUR, J. JOLLÈS, C. ALAIS and P. JOLLÈS, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 19 (1965) 452.

<sup>3</sup> J. JOLLÈS, C. ALAIS and P. JOLLÈS, *Helv. Chim. Acta* 53 (1970) 1918.

<sup>4</sup> J. JOLLÈS, F. SCHOENTGEN, C. ALAIS, A.-M. FIAT and P. JOLLÈS, *Helv. Chim. Acta* 55 (1972) in the press (issue N° 8, December).

<sup>5</sup> H. A. MCKENZIE, *Adv. Prot. Chem.* 22 (1967) 122.

<sup>6</sup> J.-C. MERCIER, J. URO, B. RIBADEAU-DUMAS and F. GROSCLAUDE, *Eur. J. Biochem.* 27 (1972) 535.

*Alignment: peptide 1 → peptide 5*

The tryptic core peptide II (see Fig. 1, ref. <sup>4</sup>) was purified and submitted to an automatic degradation with a Beckman Sequencer, model 890 B. The following N-terminal sequence was established:

Tyr-Ile-Pro-Ile-Gln-Tyr-Val-Leu-Ser-X-Tyr-Pro-Ser-Tyr-Gly

(X = unidentified amino acid). This result allowed to join peptide 5 to peptide 1.

*Alignment: peptide 5 → peptide 3*

The tryptic core peptide III (see Fig. 1, ref. <sup>4</sup>) was also submitted after purification to an automatic EDMAN degradation. The N-terminal sequence was determined as: Tyr-Pro-Ser-Tyr-Gly-Leu-Asn-Tyr-Tyr-Gln-Gln-Lys-Pro-Val-Ala.

Thus peptide 5 could be lengthened by peptide 3.

*Lengthening of peptide 2: characterization of peptide 2\**

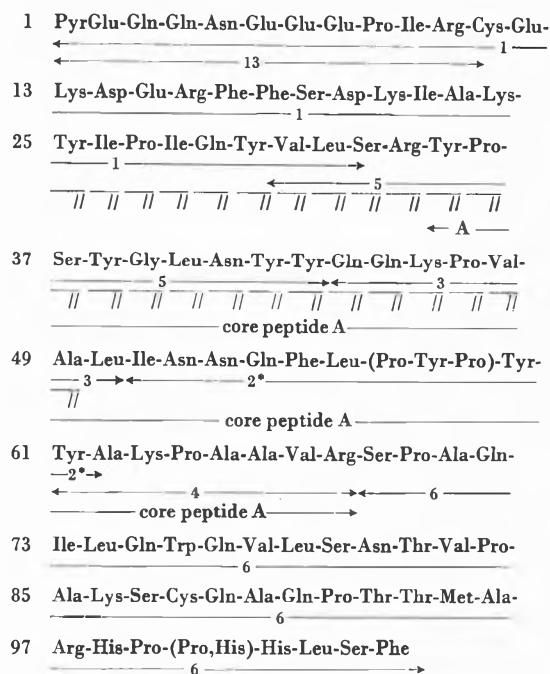
In the course of our study devoted to the chymotryptic peptides obtained from reduced aminoethylated cow  $\kappa_A$ -casein<sup>4</sup>, peptide 2 (C6c, ref. <sup>4</sup>) was found again in a longer sequence the structure of which was determined by the manual EDMAN-dansyl procedure and by digestion with carboxypeptidase A ( $R_f$  in solvent A [ref. <sup>4</sup>]: 0.75; mobility at pH 6.5 = 0):

Ile-Asn-Asn-Gln-Phe-Leu-(Pro, Tyr, Pro)-Tyr-Tyr (peptide 2\*)

The short sequence between parentheses was not yet entirely established; as several expected enzymic digestion products could not be obtained, the most probable sequence might be Pro-Tyr-Pro.

*Alignment: peptide 5 → peptide 3 → peptide 2\* → peptide 4*

In a second series of experiments, the tryptic core<sup>4</sup> obtained from 180 mg reduced aminoethylated  $\kappa_A$ -casein was no more filtered on Sephadex G-50<sup>4</sup>, but chromatographed on a very short column of Dowex 1  $\times$  2 (13  $\times$  1 cm) equilibrated with a solution containing 1% pyridine and 1% collidine, the pH of which was adjusted to 8.4 with acetic acid. Gradient elution was then begun by adding successively 0.5 M and 2 M acetic acid into a 150 ml mixing chamber containing the buffer solution of pH 8.4. A tryptic core peptide (A) with the following amino acid composition could thus be purified: Asp<sub>3</sub>, Ser<sub>1</sub>, Glu<sub>3</sub>, Pro<sub>5</sub>, Gly<sub>1</sub>, Ala<sub>4</sub>, Val<sub>2</sub>, Ile<sub>1</sub>, Leu<sub>3</sub>, Tyr<sub>7</sub>, Phe<sub>1</sub>, Lys<sub>2</sub>, Arg<sub>1</sub>. Its N-terminal sequence was characterized as Tyr-Pro-Ser-Tyr... and its C-terminal amino acid as Arg. Among the chymotryptic digestion products, peptides 2\*, 3 and 4 could be identified. These data and the results reported above allowed to conclude that the tryptic core peptide A contained the C-terminal moiety of peptide 5 as N-terminal sequence followed by peptides 3, 2\* and 4, successively. The sequence Lys-Pro which occurred twice in this core peptide (yield 30%) was not split by trypsin. However among the soluble tryptic



Peptides 1, 2, 3, 4, 5 and 6, see Table IV, ref. <sup>4</sup>.

Peptide 2\* and core peptide A, see present Note.

Peptide 13, see ref. <sup>3</sup>.

//, amino acid residue determined with a Beckman Sequencer PyrGlu, pyrrolidonecarboxylic acid; see ref. <sup>3</sup> and <sup>4</sup>.

Fig. 1. Primary sequence of cow  $\text{para-}\kappa_A$ -casein

peptides<sup>3</sup>, the sequence Pro-Ala-Ala-Val-Arg could be characterized (yield 20%). Thus the second Lys-Pro linkage is partly sensitive to the action of trypsin.

*Structure of cow  $\text{para-}\kappa_A$ -casein*

The alignment of peptides 1 → 5 → 3 → 2\* → 4 contains 68 amino acids and peptide 6, which constitutes the C-terminal sequence of  $\text{para-}\kappa_A$ -casein as previously established<sup>3,4</sup> 37 amino acids. All these peptides account thus for the totality of the amino acid residues ( $104 \pm 2$ ) characterized in cow  $\text{para-}\kappa_A$ -casein<sup>5,6</sup>. We propose thus for this latter the primary structure indicated in Fig. 1. Peptides 1 → 5 → 3 → 2\* → 4 constitute the N-terminal sequence. As several techniques did not allow the characterization of a N-terminal residue for  $\kappa_A$ -casein, the presence of a blocked N-terminal amino acid or of pyrrolidonecarboxylic acid was suggested<sup>4</sup>. After pretreatment with NaOH and dansylation (see also peptide 13, ref. <sup>3</sup>) Glu was determined. Thus the N-terminal residue of peptide 1 is pyrrolidonecarboxylic acid.

The chemical structure studies were carried out by J. JOLLÈS, F. SCHOENTGEN and P. JOLLÈS, the purification of  $\kappa_A$ -casein by C. ALAIS.

This research was supported in part by the C.N.R.S. (ER 102), I.N.S.E.R.M. (groupe 116) and D.G.R.S.T. (contrat 72.7.0470).

JACQUELINE JOLLÈS<sup>a</sup>, FRANCOISE SCHOENTGEN<sup>a</sup>, CHARLES ALAIS<sup>b</sup> and PIERRE JOLLÈS<sup>a</sup>

Laboratory of Biochemistry, University of Paris VI, 96, boulevard Raspail, F-75006 Paris<sup>a</sup> and Department of Biochemistry, University of Nancy, F-54 Nancy<sup>b</sup>