

Aus dem Institut für Makromolekulare Chemie der Technischen Hochschule Darmstadt
Sonderforschungsbereich 41 Chemie und Physik der Makromoleküle

Circulardichroismus bei gelösten Polysaccharid-Farbstoffkomplexen*)

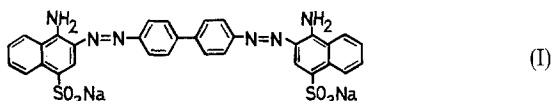
Von J. Adriani Trisnadi, Heide M. Bössler und Rolf C. Schulz

Mit 7 Abbildungen und 3 Tabellen

(Eingegangen am 7. April 1973)

Einleitung

Kongorot (I) bildet mit Dextrinen sowie mit Amylose und Amylopektin in wäßriger Lösung einen Komplex, der sich durch Veränderungen im Absorptionsspektrum bemerkbar macht (1, 2).



ORD- und CD-Messungen haben gezeigt, daß sich der komplex gebundene Farbstoff wie eine optisch aktive Verbindung verhält; die Spektren weisen nämlich zahlreiche Cotton-Effekte auf, die den Absorptionsbanden des Kongorot zuzuordnen sind (3, 4).

Ähnliche chirale Addukte zwischen Farbstoffen und optisch aktiven Polymeren wie Polypeptiden (5–7), Nucleinsäuren (8) und sauren Polysacchariden (9, 10) sind seit mehreren Jahren bekannt; sie haben beachtliches Interesse gefunden, da in einigen Fällen ein Zusammenhang zwischen der Sekundärstruktur des Polymeren und der Art der Cotton-Effekte nachgewiesen werden konnte.

Die Konformation der Amylose in Lösung ist bis heute umstritten; überwiegend helicale Strukturen (11) werden ebenso postuliert wie völlig ungeordnete (12). Unter diesem Gesichtspunkt erschien eine genauere Untersuchung des chiralen Amylose-Kongorotkomplexes sinnvoll.

Es konnte bereits gezeigt werden, daß der Amylose-Kongorotkomplex keine Kanaleinschlußverbindung nach Art des Jod-Amyloseadduktes darstellt (3, 4). Aus Konzentrationsuntersuchungen folgt, daß die Cotton-Effekte

isoliert gebundenen Farbstoffmolekülen zuzuordnen sind; eine Farbstoff-„Superhelix“, wie sie für bestimmte Polypeptidkomplexe gefordert wurde (5, 6), kann demnach ausgeschlossen werden. An der komplexen Bindung eines Kongorotmoleküls sind im Mittel 15 Glucosebausteine des Polysaccharids beteiligt. Die Gleichgewichtskonstante der Komplexbildung (13) wurde bestimmt zu $K = 3 \cdot 10^4$ [l/Mol].

Zwei wichtige Fragen blieben jedoch noch ungeklärt: 1. die Art der Bindungskräfte zwischen dem Farbstoff und dem Polymeren und 2. die Ursachen für die Chiralität der gebundenen Kongorotmoleküle. Wir haben drei verschiedene Wege beschritten, um Aufschlüsse über diese Fragen zu erhalten und hieraus Hinweise auf die Konformation der Polysaccharide in Lösung zu gewinnen. Zunächst wurde die chemische Struktur der Farbstoffe variiert, dann die Art des Polysaccharids und schließlich der Polymerisationsgrad. Über die Ergebnisse dieser Untersuchungen soll hier berichtet werden.

Der Einfluß der Farbstoffstruktur auf die Komplexbildung

Zusätzlich zu den bisher verwendeten vier Farbstoffen (4) (Kongorot, Methylorange, Naphtholorange und Chrysophenin G) wurden weitere 44 Farbstoffe auf eine eventuelle Fähigkeit zur Komplexbildung mit Amylose untersucht. Geeignet erschienen zunächst Substanzen, die in der Mikroskopie zum Anfärben von Stärke, aber auch von Cellulose und Amyloid eingesetzt werden und dementsprechend eine gewisse Affinität zu Amylose erwarten lassen. Weiterhin wurden speziell solche Farbstoffe verwendet, die in ihrer Struktur dem Kongorot mehr oder weniger ähnlich sind. Als Kriterium für erfolgte Kom-

*) Herrn Prof. Dr. O. Wichterle zum 60. Geburtstag in Verehrung gewidmet.

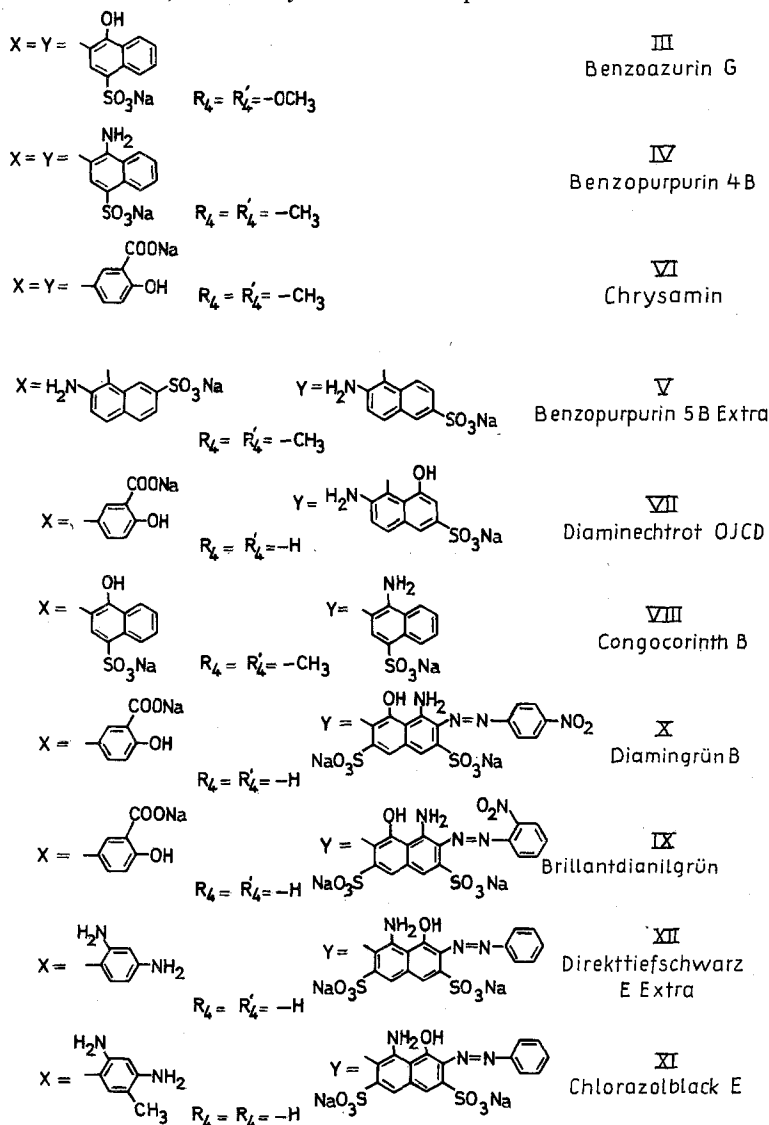
plexbildung wurde eine Veränderung des Absorptionsspektrums bei Zusatz von Amylose angesehen; induzierte Cotton-Effekte wurden durch CD-Messungen nachgewiesen.

Die untersuchten Mikroskopierfarbstoffe entstammten verschiedenen Farbstoffklassen; es waren beispielsweise Stilben- und Thiazin- sowie Kresylfarbstoffe, aber auch verschiedene Azofarbstoffe vertreten. Die „kongorot-ähnlichen“ Farbstoffe waren sämtlich Azofarbstoffe. Insgesamt wurden acht Nicht-Azofarbstoffe und 36 Azofarbstoffe ausgewählt. Für alle verwendeten Farbstoffe sind die Trivialnamen und die Nummern des Colour Index (1956) oder der Farbstoff-Tabellen (6. Aufl.) in Tab. 3 im experimentellen Teil angegeben.

Die Absorptionsspektren der Amylose-Farbstofflösungen lieferten in 15 Fällen Hinweise auf eine Komplexbildung; tatsächlich zeigten 13 dieser vermuteten Farbstoffkomplexe die erwarteten Cotton-Effekte. Da die spektralen Verschiebungen aber stets ziemlich gering sind, können die zwei beobachteten Ausnahmen nicht als Hinweis auf die Existenz nicht-chiraler Amylose-Farbstoffkomplexe gewertet werden. Man kann im Gegenteil als Regel aufstellen, daß eine im Absorptionsspektrum erkennbare Komplexbildung auch zu mehreren induzierten Cotton-Effekten führt.

Jeder der als komplexbildend erkannten Farbstoffe gehörte zur Gruppe der Azofarbstoffe. Da nur 8 Nicht-Azofarbstoffe untersucht wurden,

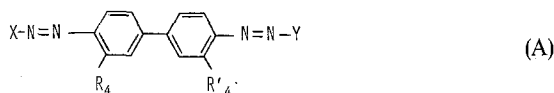
Tab. 1. Farbstoffe der Struktur A, die mit Amylose chirale Komplexe bilden



kann man aus diesem Befund wohl noch nicht folgern, daß ausschließlich Azofarbstoffe zur Komplexbildung mit Amylose in Lösung befähigt sind. Die Tatsache, daß speziell solche Nicht-Azofarbstoffe ausgewählt wurden, die eine gewisse Affinität zu Amylose erwarten ließen, legt eine solche Vermutung jedoch nahe.

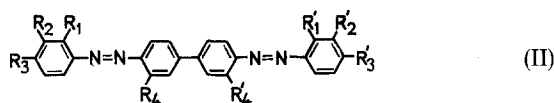
Zugleich wurde die bereits getroffene Feststellung (4) bestätigt, daß keineswegs jeder beliebige Azofarbstoff zu einer Komplexbildung befähigt ist. Das Vorhandensein von Azogruppen ist also allenfalls eine notwendige, aber keine hinreichende Voraussetzung.

Die weitaus meisten, nämlich zehn der 13 komplexierenden Farbstoffe, sind in ihrer Struktur dem Kongorot sehr nahe verwandt und lassen sich durch die allgemeine Formel A beschreiben.



Es sind die in Tab. 1 zusammengefaßten Verbindungen III bis XII, die bei Anwesenheit von Amylose im Circular dichroogramm mehrere induzierte Cotton-Effekte aufweisen.

Diesen zehn komplexbildenden Benzidinfarbstoffen stehen vierzehn andere gegenüber, die trotz des gleichen Grundgerüsts A keine induzierten Cotton-Effekte zeigten. Eine Komplexbildung ist offenbar nur dann möglich, wenn bestimmte Substituenten in definierten Positionen des Farbstoffgerüsts vorkommen. Das allgemeine Grundgerüst ist folglich bezüglich der Substituenten gemäß II zu modifizieren (wobei anstelle der Phenylringe auch Naphthylringe stehen können).



Es zeigt sich nun, daß eine Komplexbildung immer dann möglich ist, wenn die Substituenten R_1 und R'_1 primäre Aminogruppen sind wie im Fall des Kongorot (I). Weiterhin sind auch solche Farbstoffe zur Komplexbildung befähigt, die in den Positionen R_2 und R'_2 Carboxylatgruppen besaßen; diese Farbstoffe trugen stets Hydroxylgruppen in den Stellungen R_3 und R'_3 . Unsymmetrisch substituierte Farbstoffe, die also einerseits als R_2 eine Carboxylat- und als R_3 eine Hydroxylgruppe und andererseits als R'_1 eine primäre Aminogruppe tragen, bilden ebenfalls chirale Amylosekomplexe.

Auch der Austausch einer Amino- gegen eine Hydroxylgruppe beeinträchtigt die Komplexbildung nicht. Dagegen sind Farbstoffe, die sowohl als R_1 als auch als R'_1 Hydroxylgruppen tragen, nur unter speziellen Bedingungen geeignet. Cotton-Effekte treten hier nur dann auf, wenn zugleich in den Positionen R_4 und R'_4 Methoxygruppen angetroffen werden. In Tab. 2 sind die geschilderten Voraussetzungen zusammengefaßt.

Die große Zahl der untersuchten Farbstoffe erlaubte es, jede dieser Voraussetzungen mehrfach zu überprüfen; die in Tab. 2 zusammengestellten Kombinationen können deshalb als gesichert angesehen werden. Das gleiche gilt für die im folgenden aufgezählten weiteren Befunde.

Neben unbedingt erforderlichen und also wohl an der Komplexbildung beteiligten Gruppen konnten nämlich auch störende und schließlich wirkungslose Substituenten identifiziert werden. So hat sich beispielsweise gezeigt, daß die Zahl und Lage der Sulfonsäuregruppen ohne erkennbaren Einfluß auf die Komplexbildung ist (so enthält z. B. VI keine Sulfogruppe); sie sind mithin offenbar an der Reaktion nicht beteiligt. Andererseits war immer dann, wenn Sulfonsäuregruppen mit den in R_4 und R'_4 vorhandenen CH_3 - oder H_3CO -Gruppen kollidieren können,

Tab. 2. Art und Lage der für eine Komplexbildung mit Amylose erforderlichen Substituenten bei Farbstoffen der allgemeinen Struktur (II)

Verbindung	R_1	R_2	R_3	R'_1	R'_2	R'_3	$R_4^*)$	$R'_4^*)$
I, IV, V, XI, XII	NH_2	—	—	NH_2	—	—	—	—
VI	—	COONa	OH	—	COONa	OH	—	—
VII	—	COONa	OH	NH_2	—	—	—	—
VIII	NH_2	—	—	OH	—	—	—	—
IX, X	—	COONa	OH	OH	—	—	—	—
III	OH	—	—	OH	—	—	OCH_3	OCH_3

*) Vorhandene, aber wirkungslose Substituenten sind hier nicht aufgeführt.

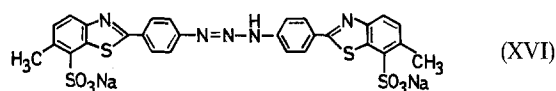
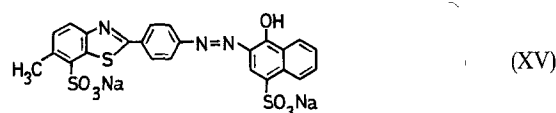
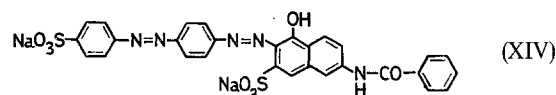
keine Komplexbildung zu beobachten, selbst wenn sonst alle Voraussetzungen nach Tab. 2 erfüllt sind. So bildet beispielsweise Benzoazurin G (III) einen Komplex, nicht aber Benzoazurin FBS und 3 RS, die eine SO_3Na -Gruppe in 3-Stellung des Naphthylringes tragen.

Weiterhin ist es, wie bereits angedeutet, bedeutungslos, ob in der Formel A X und/oder Y Phenyl- oder Naphthylringe sind. Auch zusätzliche Substituenten an diesen aromatischen Resten in anderen als den oben angegebenen Positionen sind offenbar ohne Einfluß. Wenn allerdings wie in III die Positionen R_1 und R'_1 durch OH-Gruppen besetzt sind, verhindern benachbarte Aminogruppen eine Komplexbildung, wie dies am Beispiel des Chicagoblau B beobachtet wurde.

Methyl- und Methoxylsubstituenten an der Diphenylgruppe sind ebenfalls meist ohne Einfluß auf die Komplexbildung, sofern keine sterische Hinderung mit benachbarten Sulfo- gruppen eintreten kann.

Unter den untersuchten Azofarbstoffen befanden sich auch fünf Substanzen, die sich durch Halbierung des Grundgerüsts A ergeben. Keiner dieser Monoazofarbstoffe zeigte Anzeichen einer Komplexbildung mit Amylose. Dieser Befund ist insbesondere deshalb von Interesse, weil einer der Farbstoffe, das Azoeosin (XIII) genau die Hälfte des komplexbildenden Benzoazurin G (III) darstellt. Ursachen für das Ausbleiben der Komplexbildung bei Azoeosin können entweder die fehlende Diphenylgruppe, die Abwesenheit der zweiten Azogruppe, die geringere Länge des Moleküls sowie schließlich das Fehlen einer zweiten „bindenden“ Gruppierung nach Tab. 2 sein.

Außer den genannten 10 Verbindungen des allgemeinen Typs A wurden drei Farbstoffe gefunden, die trotz abweichender Struktur chirale Komplexe mit Amylose bilden. Es sind dies Diphenylechtrot 5 BLN (XIV), Thiazinrot R (XV) und Thiazolgelb (XVI).



Von diesen besitzt Diphenylechtrot 5 BLN keine Diphenylgruppe, aber zwei Azogruppierungen. Dagegen weisen die Thiazinfarbstoffe weder das eine noch das andere Charakteristikum auf – allerdings enthalten sie dem Diphenylsystem vergleichbare Gruppierungen und der Azogruppe möglicherweise entsprechende Iminogruppen. Da aber keine weiteren Farbstoffe mit ähnlicher Struktur untersucht werden konnten, sind hier keine allgemeinen Regeln abzuleiten.

In den Abb. 1 und 2 wurden einige der an den beschriebenen Farbstoff-Amylosekomplexen gemessenen Circular dichroogramme zusammengefaßt.

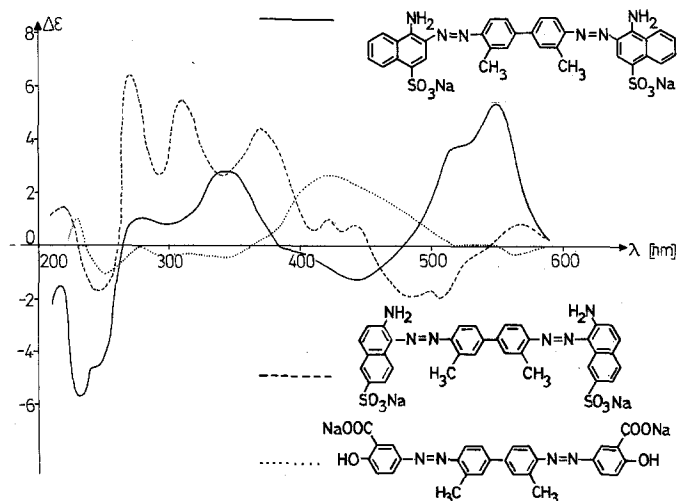


Abb. 1. CD-Spektren der Amylosekomplexe von Benzopurpurin 4B (IV) (—), Benzopurpurin 5B Extra (V) (---) und Chrysamin (VI) (···). (Amylosekonzentration: $C_A = 2,38 \cdot 10^{-3}$ Grundmol/l; Farbstoffkonzentration: $C_F = 1,13 \cdot 10^{-4}$ Mol/l)

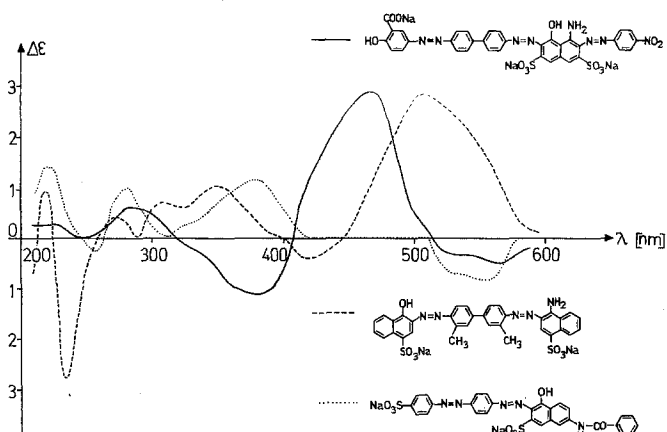


Abb. 2. CD-Spektren der Amylosekomplexe von Congocorinth B (VIII) (---), Diamingrün B (X) (—) und Diphenylechtrot 5 BLN (XIV) (···). (Amylosekonzentration: $C_A = 2,38 \cdot 10^{-3}$ Grundmol/l; Farbstoffkonzentration: $C_F = 1,13 \cdot 10^{-4}$ Mol/l)

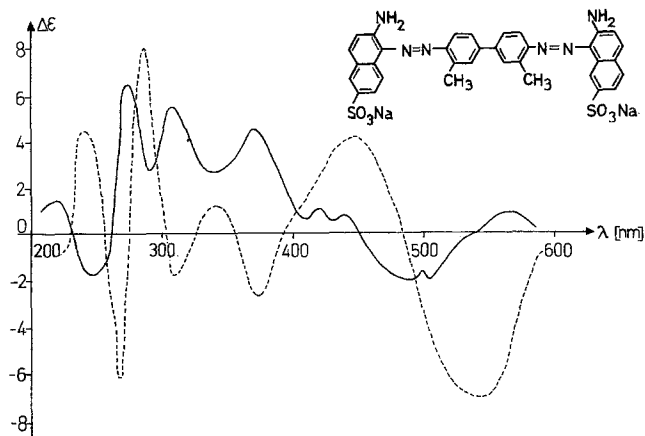


Abb. 3. CD-Spektren des Amylose- (—) und des Mannan-Komplexes (---) von Benzoporpurin 5B Extra (V). (Polysaccharidkonzentration: $C_P = 2,38 \cdot 10^{-3}$ Grundmol/l; Farbstoffkonzentration: $C_F = 0,99 \times 10^{-4}$ Mol/l)

Der Einfluß der Polymerstruktur auf die Komplexbildung

Mannan aus tubera salep ist ein der Amylose sehr nahe verwandtes, lineares Polysaccharid. Es besteht aus 1,4- β -glykosidisch verknüpften D-Mannoseresten und unterscheidet sich folglich von Amylose durch die Konfiguration an den Kohlenstoffatomen 1 und 2; es hat daher eine gestreckte Konformation, ähnlich wie Cellulose. Darüber hinaus ist Salepmannan am C-2 oder C-3 etwa jedes zehnten Grundbausteines acetyliert und deshalb im Gegensatz zur Cellulose wasserlöslich.

Frühere Untersuchungen hatten gezeigt (13), daß Kongorot auch mit Salepmannan einen chiralen Komplex bildet. Das CD-Spektrum dieses Komplexes war dem des Amylosekomplexes hinsichtlich der Lagen und der Intensitäten der peaks sehr ähnlich; interessanterweise waren jedoch die Vorzeichen der Cotton-Effekte jeweils entgegengesetzt und die Spektren somit annähernd spiegelbildlich. Dieser Befund führte zu der Vermutung, daß die induzierte optische

Aktivität der Kongorotmoleküle durch Wechselwirkung mit der OH-Gruppe an einem bestimmten, asymmetrischen Kohlenstoffatom zustande kommt. Hierbei müßte es sich dann gerade um eines der beiden Atome handeln, deren Konfiguration in den betrachteten Polysacchariden unterschiedlich ist, also um das C-1 oder C-2.

Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden neun weitere Farbstoffe auf ihre Fähigkeit zur Komplexbildung mit Mannan untersucht. Dabei wurden nur solche Farbstoffe eingesetzt, die mit Amylose Komplexe bilden.

Acht dieser Farbstoffe bilden auch mit Salepmannan chirale Komplexe, die induzierte Cotton-Effekte aufweisen. Die Intensität der CD-peaks ist jedoch fast durchweg geringer als im Falle der Amylosekomplexe. Darüber hinaus wird hier keine generelle Vorzeichenumkehr beobachtet. Ein Teil der Farbstoffe liefert vielmehr bei Anwesenheit von Amylose und Mannan gleichgerichtete Cotton-Effekte. Andere wiederum zeigen vorwiegend entgegengerich-

tete Cotton-Effekte. Hier treten jedoch zumeist die CD-peaks des Amylose- und des Mannan-komplexes im langwelligen Gebiet bei deutlich unterschiedlichen Wellenlängen auf, wie dies in Abb. 3 am Beispiel des Benzopurpurin 5 B Extra zu erkennen ist. In einigen Fällen legt ein Vergleich der Absorptions- und der CD-Spektren die Vermutung nahe, daß es sich hier um multiple Cotton-Effekte handelt, wie sie durch eine Exciton-Aufspaltung zustande kommen.

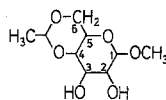
Diese Ergebnisse lassen sicher keine endgültige Deutung zu. Sie zeigen jedoch, daß die Asymmetrie der komplex gebundenen Farbstoffmoleküle nicht grundsätzlich auf die Wechselwirkung mit einem bestimmten asymmetrischen Kohlenstoffatom des Polysaccharids zurückzuführen ist, wie die Spektren der Kongorotkomplexe dies hatten erwarten lassen.

Einer der untersuchten Farbstoffe, nämlich Thiazinrot R (XV), ließ keine Anzeichen einer Komplexbildung mit dem Mannan erkennen. Dieser Befund ist von besonderer Bedeutung, da abgesehen vom geringen Acetylgruppengehalt des Mannans die beiden untersuchten Polysaccharide sich lediglich in Konfiguration und Konformation unterscheiden. Hieran zeigt sich die Spezifität der Komplexbildung, die offenbar nicht allein von der chemischen Struktur der Komponenten abhängt.

Der Einfluß des Polymerisationsgrades auf die Komplexbildung

Aus Absorptionsspektren von Kongorot-Dextrinkomplexen hatten Carroll u. Mitarb. (1) geschlossen, daß die Neigung zur Komplexbildung erst bei niedrigen Polymerisationsgraden, nämlich unterhalb $\bar{P}_n = 17$, meßbar abnimmt und schließlich bei Polymerisationsgraden von etwa 6 ganz verschwindet. Dieser Befund stimmt mit der von uns gefundenen Zusammensetzung des Komplexes, nämlich Kongorot: $C_6H_{10}O_5 = 1:15$ (13), recht gut überein.

Nach Sensse und Cramer (3) treten jedoch auch bei Anwesenheit von α -Methylglucosid Veränderungen des Kongorotspektrums auf; allerdings sind hier keine induzierten Cotton-Effekte zu beobachten. Es würde demnach ein Komplex entstehen, in dem der Farbstoff nicht asymmetrisch induziert ist. Dieser Befund wurde nun anhand einer möglicherweise besser geeigneten Modellverbindung, des 4,6-Äthyliden- α -Methylglucosids (XVII), überprüft.



(XVII)

Tatsächlich lieferten weder Absorptions- noch CD-Spektren Hinweise auf eine Wechselwirkung zwischen dieser Modellverbindung und dem Farbstoff. Offenbar sind also zur komplexen Bindung des Kongorot erst Polysaccharidketten einer bestimmten Mindestlänge fähig.

So ist beispielsweise bekannt, daß bereits Cyclodextrine mit Kongorot Komplexe bilden, die induzierte Cotton-Effekte aufweisen (3). Lagen und Vorzeichen der Cotton-Effekte stimmen mit denen des Amylosekomplexes überein. Dagegen wurde bisher nicht untersucht, ob Kongorotkomplexe linearer Oligomere der Amylose ebenfalls Cotton-Effekte zeigen. Wir haben deshalb eine enzymatisch synthetisierte Amylose hoher Einheitlichkeit mit einem Polymerisationsgrad von 38 geprüft. Tatsächlich bildet dieses Oligosaccharid mit Kongorot den erwarteten chiralen Komplex. Lagen und Vorzeichen der CD-peaks stimmen mit denen des Amylosekomplexes überein; dagegen sind die Intensitäten bemerkenswerterweise durchweg zwar nur wenig, aber doch eindeutig höher als bei Anwesenheit von Amylose.

Diese interessante Feststellung regte uns an, weitere geeignete Farbstoffe zur Komplexbildung mit dem niedermolekularen „Modellpolymeren“ heranzuziehen. Tatsächlich bilden die ausgewählten Farbstoffe, Benzoazurin G (III) und Diaminechtrot OJCD (VII), ebenfalls chirale Komplexe mit dem Polymeren; und wiederum sind die induzierten Cotton-Effekte deutlich stärker als die der entsprechenden Amylosekomplexe.

Quantitative Untersuchungen

Man wird selbstverständlich nicht ohne weiteres annehmen dürfen, daß jeder Farbstoff-Polysaccharidkomplex eine dem Kongorot-Amyloseaddukt vergleichbare Struktur besitzt. Statt isoliert gebundener Farbstoffmoleküle können beispielsweise auch chirale Farbstoffaggregate die Ursache der induzierten Cotton-Effekte sein (13).

Im Falle der Kongorot-Amylose war diese Frage durch eine Variation des Konzentrationsverhältnisses der Komplexpartner geklärt worden. Handelt es sich nämlich um asymmetrisch

induzierte Einzelmoleküle, so sollten maximale Cotton-Effekte bei großem Polymerüberschuß und damit annähernd vollständiger Adsorption auftreten; liegen jedoch gebundene, chirale Farbstoffaggregate vor, so müßten maximale Effekte bei relativ hohen Farbstoffkonzentrationen entstehen. Variation der Farbstoffkonzentration bei konstanter Amylosekonzentration und Auftragung des gemessenen Circular-dichroismus gegen das Amylose-Kongorotverhältnis C_A/C_K ergab eine nahezu linear ansteigende Kurve, bis bei hohem Amyloseüberschuß schließlich ein konstanter Endwert erreicht wurde (13). Dieser Verlauf ist konsistent mit einem Modell isoliert gebundener, asymmetrisch induzierter Farbstoffmoleküle.

Analoge Meßreihen wurden nun für die Farbstoffe Benzoazurin G (III), Diaminechtrot OJCD (VII) und Thiazinrot R (XV) durchgeführt. In den Abb. 4, 5 und 6 sind die Absorptions- und CD-Spektren der zugehörigen Amylosekomplexe wiedergegeben. Abb. 7 zeigt die Auftragung des Circular-dichroismus $\Delta\epsilon$ gegen das grundmolare Amylose-Farbstoffverhältnis für diese drei Farbstoffe. Es wurde jeweils der ausgeprägteste peak des CD-Spektrums ausgewertet; andere Wellenlängen hätten das gleiche Ergebnis, aber zugleich eine größere Fehlerbreite geliefert. Der Kurvenverlauf gleicht in allen Fällen dem des Kongorot-Amylosekomplexes (13); folglich stellen auch hier isoliert gebundene Farbstoffmoleküle die asymmetrisch induzierten Chromophore dar.

Der bei hohem Polymerüberschuß erreichte Grenzwert entspricht unter dieser Voraussetzung dem molaren Circular-dichroismus $\Delta\epsilon$ der komplex gebundenen Farbstoffmoleküle bei der jeweils betrachteten Wellenlänge. Die Werte

sind, wie Abb. 7 zeigt, stark unterschiedlich. Durch Division durch den Extinktionskoeffizienten bei der betreffenden Wellenlänge erhält man den „Dissymmetriefaktor“ g :

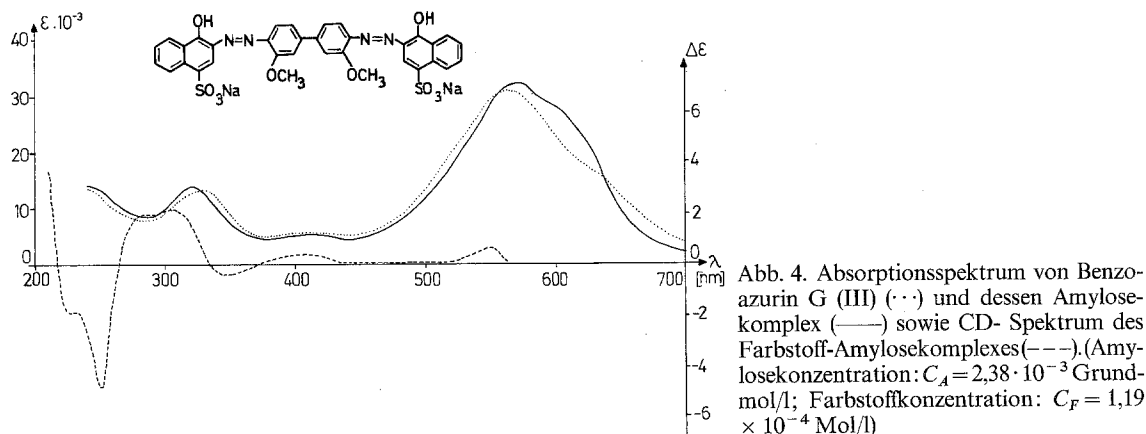
$$g_\lambda = \frac{\Delta\epsilon_\lambda}{\epsilon_\lambda}$$

Die Berechnung der Dissymmetriefaktoren für Amylose-Farbstoffkomplexe wird, wie die Abb. 4 bis 6 erkennen lassen, durch die Vielzahl sich überlagernder Cotton-Effekte und ein zumeist ebenso komplexes Absorptionsspektrum erschwert. Für die drei untersuchten Farbstoffe ergaben sich für jeweils ausgewählte Cotton-Effekte die folgenden Werte:

Benzoazurin G:	$g_{310} = 1,51 \cdot 10^{-4}$
Diaminechtrot OJCD:	$g_{500} = 3,15 \cdot 10^{-4}$
Thiazinrot R:	$g_{510} = 0,314 \cdot 10^{-4}$

Dabei zeigt sich, daß die Dissymmetriefaktoren der der Formel A entsprechenden Farbstoffe in der gleichen Größenordnung liegen wie der für Kongorot gefundene Wert von $2,6 \cdot 10^{-4}$ (13). Der Dissymmetriefaktor des komplex gebundenen Thiazinrot ist dagegen deutlich geringer.

Aus Abb. 7 läßt sich durch Extrapolation der Anfangssteigung auf den Grenzwert die Zahl der Amylosegrundbausteine bestimmen, die formal zur Bindung eines Farbstoffmoleküls erforderlich sind. Es ergeben sich für Benzoazurin 42, für Diaminechtrot 12 und für Thiazinrot 7 Glucosereste. Diese Ergebnisse konnten aus den CD-Spektren bei kontinuierlich veränderten Molverhältnissen (JOB-Methode (14)) auf unabhängigen Wege überprüft und im Rahmen der Fehlerbreite bestätigt werden. Für Kongorot



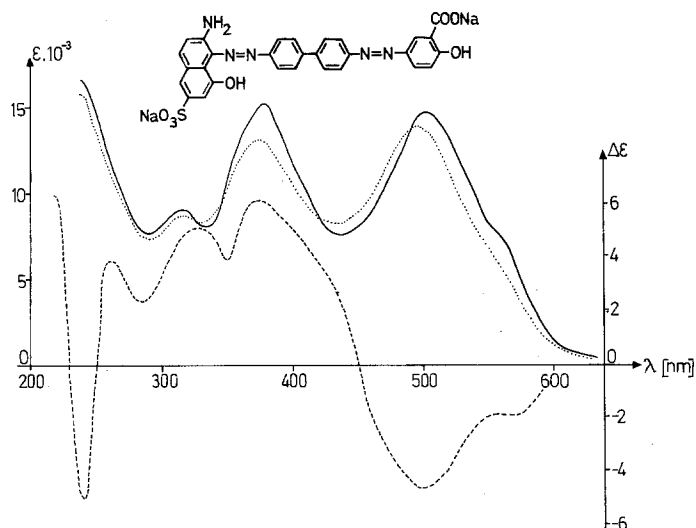


Abb. 5. Absorptionsspektrum von Diaminechtrot OJCD (VII) (···) und dessen Amylosekomplex (—) sowie CD-Spektrum des Farbstoff-Amylosekomplexes (---). (Amylosekonzentration: $C_A = 2,38 \cdot 10^{-3}$ Grundmol/l; Farbstoffkonzentration: $C_F = 1,19 \cdot 10^{-4}$ Mol/l)

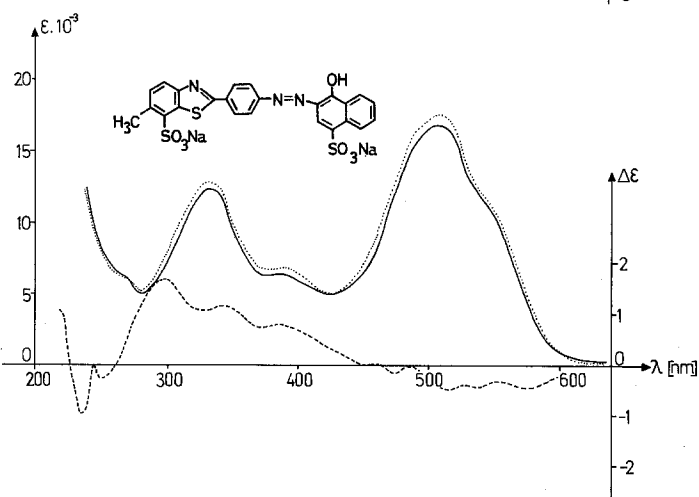


Abb. 6. Absorptionsspektrum von Thiazinrot R (XV) (···) und dessen Amylosekomplex (—) sowie CD-Spektrum des Farbstoff-Amylosekomplexes (---). (Amylosekonzentration: $C_A = 2,38 \cdot 10^{-3}$ Grundmol/l; Farbstoffkonzentration: $C_F = 1,19 \cdot 10^{-4}$ Mol/l)

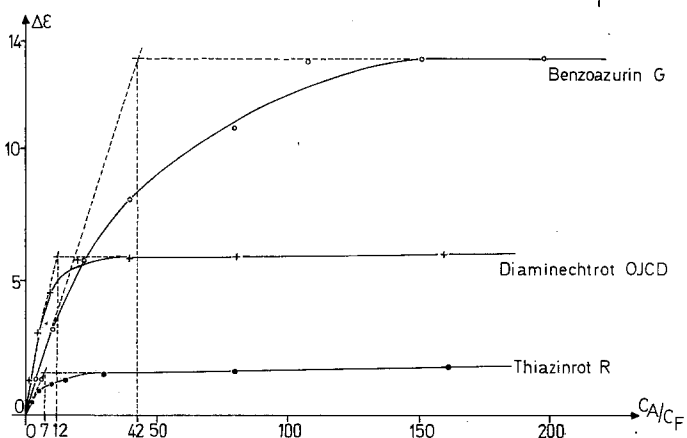


Abb. 7. Abhängigkeit des molaren Circular dichroismus $\Delta\epsilon$ bei Farbstoff-Amyloselösungen vom Amylose-Farbstoffverhältnis C_A/C_F . (Messung für Benzoazurin G (III) bei $\lambda = 250$ nm, für Diaminechtrot OJCD (VII) bei $\lambda = 375$ nm und für Thiazinrot R (XV) bei $\lambda = 300$ nm)

ergab sich nach den gleichen Methoden ein Wert von 15 (13).

Allerdings sind diese Verhältniszahlen nicht als unmittelbares Maß für die Zahl der Glucoseeinheiten, die direkt an der Farbstoffbindung beteiligt sind, zu betrachten; sie charakteri-

sieren vermutlich eher den Platzbedarf der Farbstoffmoleküle auf dem Makromolekül. Als Hinweis auf die Zahl der tatsächlich bindenden Glucoseeinheiten wäre beispielsweise der Polymerisationsgrad des niedrigsten Oligomeren zu werten, das noch zu einer Komplexbildung be-

fähigt ist. Wir haben deshalb die Fähigkeit der drei untersuchten Farbstoffe zur Komplexbildung mit Cyclodextrinen untersucht und festgestellt, daß neben Kongorot nur Diaminechtrot einen chiralen Komplex bildet. Die gemessenen Cotton-Effekte sind allerdings deutlich schwächer als die des Amylosekomplexes; folgerichtig liefert β -Cyclodextrin noch etwas stärkere Effekte als das α -Cyclodextrin. Im Falle von Benzoazurin und Thiazinrot konnte kein Hinweis auf eine Komplexbildung mit den Cyclodextrinen festgestellt werden; in Anbetracht des „Äquivalenzwertes“ für Thiazinrot hätte man allein von der Stöchiometrie her einen Komplex erwarten können.

Unter der Voraussetzung, daß die aus Abb. 7 erhaltenen Grenzwerte den molaren Circular-dichroismus des gebundenen Farbstoffs darstellen, läßt sich für jede eingesetzte Farbstoffkonzentration der Bruchteil der jeweils gebundenen und der freien Farbstoffmoleküle berechnen. Diese Werte ergeben in der *Langmuir*-Auftragung Geraden, aus deren Neigung und Achsenabschnitt einerseits die Gleichgewichtskonstanten der Komplexbildung und andererseits wiederum die Zahl der einem Farbstoffmolekül zugeordneten Glucoseeinheiten bestimmt wurden. Die so bestimmten „Äquivalenzwerte“ von 42,2, 7,9 und 14,4 stimmten recht gut mit den aus Abb. 7 und den nach *JOB* erhaltenen überein. Für die Gleichgewichtskonstanten der Komplexe ergaben sich:

Benzoazurin G: $K = 3,9 \cdot 10^4$ l/Mol
 Diaminechtrot OJCD: $K = 5,6 \cdot 10^4$ l/Mol
 Thiazinrot R $K = 6,0 \cdot 10^4$ l/Mol

Für den Kongorotkomplex wurde gefunden $K = 3 \cdot 10^4$ l/Mol (13).

Diskussion der Ergebnisse

Die Art der Bindungskräfte, die zwischen Amylose und Kongorot wirksam sind, ist bis heute nicht geklärt. *Carroll* u. Mitarb. haben sowohl Wasserstoffbrückenbindungen als auch hydrophobe Wechselwirkungen postuliert (1, 15).

Die nahe chemische Verwandtschaft von Amylose und Cellulose sowie die Tatsache, daß Kongorot ein substantiver Baumwollfarbstoff ist, ließ uns vermuten, daß in Amylose-Farbstoffkomplexen ähnliche Kräfte wirksam sind wie bei der Adsorption von Farbstoffen an Cellulose. Aber auch diese Kräfte und damit die

Ursachen der Substantivität von Farbstoffen sind keineswegs völlig geklärt (16).

Als „substantiv“ (im Sinne der Baumwollfärbung) waren 24 der 44 hier untersuchten Farbstoffe bekannt, und zwar 22 der insgesamt 24 Benzidin- sowie die beiden Thiazinfarbstoffe. Interessant ist nun, daß die 13 komplexbildenden Farbstoffe ausnahmslos dieser Gruppe entstammten. Substantivität, wie auch immer sie zustande kommen mag, ist also offenbar eine notwendige Voraussetzung der Komplexbildung zwischen Amylose und Farbstoffen.

Die Tatsache, daß nicht alle substantiven Farbstoffe in der gewünschten Weise reagieren, läßt sich folgendermaßen erklären. Substantive Baumwollfarbstoffe zeichnen sich dadurch aus, daß sie feste Cellulose irreversibel anfärben. Sicher spielt der hohe Ordnungsgrad der kristallinen Cellulose bei der Bindung der Farbstoffe eine entscheidende Rolle. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch die Komplexbildung mit gelöster Amylose untersucht; hier entfällt der Beitrag, den die Kristallinität zur Farbstoffbindung leistet. Demnach sind nur solche substantiven Farbstoffe zur Komplexbildung mit Amylose fähig, bei denen Gitterkräfte nicht an der Bindung beteiligt sind.

Für die Bindung substantiver Farbstoffe an Cellulose werden nach *Gerstner* (16) Restvalenzen des aromatischen Systems und bei Anwesenheit geeigneter, „auxochromer“ Substituenten Wasserstoffbrückenbindungen postuliert. Ein ähnliches Modell hat *Carroll* zunächst auch für den Kongorot-Amylosekomplex vorgeschlagen (1). Dagegen nehmen *Sensse* und *Cramer* (3) an, daß es sich um Charge-transfer-Wechselwirkungen zwischen dem aromatischen π -Elektronensystem des Kongorot und dem Polysaccharid handelt. In der vorliegenden Untersuchung konnte nachgewiesen werden, daß für eine komplexe Farbstoffbindung die Anwesenheit bestimmter Substituenten in definierten Positionen des Farbstoffgerüsts erforderlich ist. Die aufgefundenen Zusammenhänge sind jedoch mit der Existenz von Wasserstoffbrückenbindungen ebenso zu vereinbaren wie mit dem Vorliegen von CT-Wechselwirkungen und lassen deshalb die Entscheidung für einen der vorgeschlagenen Bindungsmechanismen nicht zu.

Charge-transfer-Beziehungen zwischen dem langgestreckten aromatischen System der Farbstoffe und den Hydroxylgruppen des Poly-

saccharids hätten leicht erklärt, weshalb erst Oligosaccharide einer bestimmten Mindestlänge Farbstoffe zu binden vermögen. Dagegen sollte eine Bindung über Wasserstoffbrücken, also eine Wechselwirkung mit bestimmten Atomen des Farbstoffes, sowohl mit niedermolekularen Polysaccharidmodellen wie z.B. XVII als auch mit „kurzen“ Farbstoffmolekülen von der Art des Azoesins (XIII) möglich sein. Die Tatsache, daß dies nicht der Fall ist, deutet darauf hin, daß jedes Farbstoffmolekül über mehr als einen „Haftpunkt“ mit dem Polymeren verknüpft ist. Dies könnte auch die Ursache der fehlenden Komplexbildungsfähigkeit des Azoesins sein; dieser Farbstoff besitzt folgerichtig, ebenso wie die vier untersuchten Farbstoffe ähnlicher Struktur, keine Substantivität.

Mit einiger Sicherheit muß eine solche Bindung über mehrere Gruppierungen als Voraussetzung der beobachteten Cotton-Effekte angesehen werden. Es konnte nämlich gezeigt werden (17), daß Blütenfarbstoffe, die glykosidisch an Monosaccharide gebunden sind, nur äußerst schwache CD-peaks zeigen. Die Möglichkeit der Drehung um die glykosidische Bindung verhindert hier eine definierte Einstellung des Farbstoffmoleküls zu den asymmetrischen Kohlenstoffatomen; das gemessene CD-Spektrum entsteht folglich durch Überlagerung sämtlicher aus den verschiedenen Einstellungen resultierenden Cotton-Effekte. Die für Amylose-Farbstoffkomplexe erhaltenen starken Cotton-Effekte beweisen zumindest eine ausgeprägte Bevorzugung definierter räumlicher Anordnungen. Dies läßt sich wiederum nur dann erklären, wenn jedes Farbstoffmolekül über mehrere Grundbausteine hinweg an das Polymere gebunden ist.

Abschließend soll noch kurz auf die ungeklärte Frage des Ordnungszustandes gelöster Amylose eingegangen werden. Wir sind der Meinung, daß das hier vorgelegte Material Hinweise bezüglich dieses Problems liefert. So ist beispielsweise die offenbar definierte Orientierung der Farbstoffmoleküle zu den asymmetrischen Zentren des Polysaccharids nur schwer vorstellbar, wenn man annimmt, daß das Polymere völlig regellos geknäuelte vorliegt. Auch die Tatsache, daß die auxochromen Substituenten nur in ganz bestimmten Positionen des Farbstoffgerüsts wirksam sind, spricht für einen räumlich geordneten Komplexpartner. Ähnliche Schlüsse lassen sich aus dem Ergebnis

ziehen, daß Farbstoffe, die aus sterischen Gründen bestimmte planare Konformationen nicht annehmen können, keinen Komplex bilden.

Ein mit Sicherheit ungeordneteres Polymeres, das verzweigte Amylopektin, zeigt folgerichtig eine wesentlich schwächere Neigung zur Komplexbildung mit Kongorot als die analoge, lineare Amylose (14). Weiterhin läßt sich die Tatsache, daß Thiazinrot R zwar mit Amylose, aber nicht mit Salepmanan einen Komplex bildet, nur dadurch erklären, daß die sterischen Voraussetzungen zur Bindung dieses Farbstoffes zwar im Falle der Amylose gegeben sind, nicht aber im Falle des Mannans – ein Ergebnis, das auf der Basis regellos geknäuelter Polymerketten nicht verständlich wäre.

Ein weiteres Argument für eine geordnete Struktur der Amylose in Lösung liefern die Farbstoffkomplexe der niedermolekularen Amylose vom \bar{P}_n 38. Es ist bekannt, daß solche kurzkettigen Amylosen sehr viel stärker „retrogradieren“ als hochmolekulare Präparate (18). Man nimmt deshalb an, daß sie infolge ihrer geringen Kettenlänge weniger an der Ausbildung geordneter Strukturen gehindert sind als ihre langkettigen Homologen. Tatsächlich konnten wir feststellen, daß die untersuchten Farbstoffkomplexe dieses „Modellpolymeren“ deutlich intensivere Cotton-Effekte aufweisen als die entsprechenden Amylosekomplexe.

Sicher kann keine der hier dargestellten Tatsachen für sich allein mehr als einen Anhaltspunkt liefern; in ihrer Gesamtheit wird man diese Ergebnisse jedoch als Hinweise auf eine geordnete Struktur der Amylose in Lösung werten dürfen.

Experimenteller Teil

Wasserlösliche Kartoffelamylose wurde nach Vorschriften von Gilbert, Gilbert und Spragg (19) sowie von Baum, Gilbert und Wood (20) gewonnen. α - und β -Cyclodextrin lieferte die Firma Pierce Chemical Company, USA. 4,6-Äthyliden- α -methylglucosid wurde nach Honeyman und Morgan (21) aus α -Methylglucosid der Firma Fluca hergestellt.

Die verwendeten Farbstoffe (siehe Tab. 3) wurden überwiegend als „Mikroskopierfarbstoffe“ bezogen. Ihre Reinheitsprüfung geschah dünnschichtchromatographisch auf Kieselgelplatten F₂₅₄ der Firma Merck mit Chloroform/Methanol (1:1, V/V) als Laufmittel.

Die Absorptionsspektren wurden mit dem „Registrierenden Spektralphotometer DMR 21“ der Firma Zeiss-Oberkochen aufgenommen. CD-Spektren lieferte das „Registrierende Spektralphotometer Cary 60“ unter Verwendung der CD-Zusatzeinrichtung Cary 6002.

Tab. 3. Alphabetische Liste der verwendeten Farbstoffe

Name	Nr.	λ_{\max}°	Farb- eigenschaft ^{d)}	Formel-Nr.	Cotton- Effekte ^{e)}
Amidoschwarz 10B	20 470 ^{a)}	616	n. s.		
Azoblau	23 680 ^{a)}	552	s.		
Azoeosin	14 710 ^{a)}	506	n. s.	XIII	
Azophloxin	18 050 ^{a)}	530	n. s.		
Azorubin S	16 185 ^{a)}	520	n. s.		
Azur A		594			
Baumwollbraun	490 ^{b)}	430	n. s.		
Benzoazurin G	24 140 ^{a)}	564	s.	III	+ ○
Benzoazurin FBS	24 145 ^{a)}	564	s.		
Benzopurpurin 4 B	23 500 ^{a)}	492	s.	IV	+
Benzopurpurin 5 B Extra	23 565 ^{a)}	492	s.	V	+ ○
Bismarckbraun G	21 000 ^{a)}	460	n. s.		
Brilliantdianilgrün	30 310 ^{a)}	380	s.	IX	+ ○
Brilliantkongoblau RRW	23 745 ^{a)}	560	s.		
Calcon	15 705 ^{a)}	558	n. s.		
Chicagoblau B	423 ^{b)}	585	s.		
Chicagoblau RW	24 280 ^{a)}	589	s.		
Chlorazolblack E	30 245 ^{a)}	500	s.	XI	+
Chromotrop 2R	16 570 ^{a)}	506	n. s.		
Chrysamin	22 250 ^{a)}	390	s.	VI	+
Congocorinth B	22 145 ^{a)}	504	s.	VIII	+ ○
Congo-Rubin	22 150 ^{a)}	517	s.		
Diaminblau BB	22 610 ^{a)}	596	s.		
Diaminbrillantblau G	24 150 ^{a)}	566	s.		
Diamingrün B	30 315 ^{a)}	653	s.	X	+ ○
Diaminechtrot OJCD	22 310 ^{a)}	496	s.	VII	+ ○
Diaminostilbendicarbonsäure		335	n. s.		
Diphenylechtrot 5 BLN	28 160 ^{a)}	507	s.	XIV	+ ○
Direkttiefschwarz E Extra	30 285 ^{a)}	606	s.	XII	+ ○
Fluorescein-Natrium	585 ^{b)}	490	n. s.		
Hämatoxylin	75 290 ^{a)}	292	n. s.		
Janusrot B	26 115 ^{a)}	508	n. s.		
Kresylviolett		554	n. s.		
Kristallviolett	516 ^{b)}	589	n. s.		
Malachitgrün	495 ^{b)}	617	n. s.		
Metanilgelb	13 065 ^{a)}	435	n. s.		
Methylenblau	659 ^{b)}	655	n. s.		
Orange I	14 600 ^{a)}	476	n. s.		
Oxaminblau B	24 170 ^{a)}	585	s.		
Pontamin Sky Blue 5 BX	24 400 ^{a)}	594	n. s.		
Thiazinrot R	14 780 ^{a)}	505	s.	XV	+
Thiazolgelb	198 ^{b)}	389	s.	XVI	+
Trypanblau	23 850 ^{a)}	583	s.		

^{a)} The Colour Index (2. Aufl.). Hrsg.: The Society of Dyers and Colourists, Lowell, Mass., 1957.

^{b)} G. Schultz, Farbstofftabellen (6. Aufl.). Weidmannsche Buchhandlung, Berlin 1923.

^{c)} Wellenlänge des stärksten Absorptionsmaximums, gemessen in H₂O.

^{d)} s. = substantiver Farbstoff; n. s. = nichtsubstantiver Farbstoff.

^{e)} + = induzierte Cotton-Effekte mit Amylose; ○ = induzierte Cotton-Effekte mit Salepmannan.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 41 durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft gefördert.

Unser besonderer Dank gilt Frau Dr. B. Pfannemüller, Freiburg/Br., für die Überlassung der enzymatisch synthetisierten Amylose und des Salepmannans sowie für zahlreiche anregende Diskussionen.

Zusammenfassung

44 Farbstoffe, darunter 36 Azofarbstoffe, wurden mit Hilfe von Absorptions- und CD-Messungen auf ihre Fähigkeit untersucht, mit Amylose in wäßriger Lösung chirale Komplexe zu bilden. Die 13 als komplexbildend erkannten Farbstoffe sind sämtlich Azofarbstoffe und zugleich substantive Baumwollfarbstoffe. Für eine Komplexbildung ist darüberhinaus die Anwesenheit bestimm-

ter Substituenten in definierten Positionen des Farbstoffgerüsts erforderlich.

In drei Fällen wurde die Zusammensetzung der Komplexe, die Gleichgewichtskonstante der Komplexbildung und der Dissymmetriefaktor bestimmt. Weiterhin wurden ausgewählte Farbstoffe auf ihre Fähigkeit zur Komplexbildung mit Salepmannan sowie mit niedermolekularen Modellverbindungen untersucht.

Die Ergebnisse sprechen für eine Bindung isolierter Farbstoffmoleküle in bevorzugten Orientierungen. Die Art der Bindungskräfte wird diskutiert. Die aufgefundenen Zusammenhänge lassen sich nur auf der Basis einer geordneten Struktur der Amylose in Lösung befriedigend deuten.

Summary

The complexing abilities of 44 dyes, 36 of which were azo dyes, with amylose in aqueous solution have been investigated by means of absorption spectroscopy and CD-measurements. 13 of these – all of them direct dyes – build chiral complexes with the polysaccharide. The complexing ability is shown to be strongly dependent on the nature and position of the dye's substituents.

Complex compositions, equilibrium constants of complex formation, and dissymmetry factors have been determined for three of the dyes. Furthermore, the complexing abilities of several dyes with salep mannan and low molecular model compounds have been investigated.

In their amylose complexes, isolated dye molecules are bound to the polysaccharide in preferred orientations. The nature of the binding forces is discussed. A satisfactory explanation of the results as a whole requires the assumption of an ordered amylose structure in solution.

Literatur

- 1) Carroll, B. und J. W. van Dyk, *Science* **116**, 168 (1952).
- 2) Carroll, B. und J. W. van Dyk, *J. Am. chem. Soc.* **76**, 2506 (1954).
- 3) Sensse, K. und F. Cramer, *Chem. Ber.* **102**, 509 (1969).

4) Bössler, H. M. und R. C. Schulz, *Kolloid-Z. u. Z. Polymere* **239**, 578 (1970).

5) Stryer, L. und E. R. Blout, *J. Amer. chem. Soc.* **83**, 1411 (1961).

6) Ballard, R. E., A. J. McCaffery und S. F. Mason, *Biopolymers* **4**, 97 (1966).

7) Makino, S., N. Murai und S. Sugai, *J. Polymer Sci.* **B6**, 477 (1968).

8) Gardner, B. J. und S. F. Mason, *Biopolymers* **5**, 79 (1967).

9) Stone, A. L., *Biopolymers* **2**, 315 (1964).

10) Stone, A. L., *Biopolymers* **3**, 617 (1965).

11) Rao, V. S. R., N. Yathindra und P. R. Sundararajan, *Biopolymers* **8**, 325 (1969).

12) Banks, W. und C. T. Greenwood, *Polymer* **12**, 141 (1971).

13) Bössler, H. M. und R. C. Schulz, *Angew. Makromol. Chem.* **29/30**, 431 (1973).

14) Vosburgh, W. C. und G. R. Cooper, *J. Amer. Chem. Soc.* **63**, 437 (1941).

15) Carroll, B. und H. C. Cheung, *J. physic. Chem.* **66**, 2585 (1962).

16) Gerstner, H., Das Verhalten der direktziehenden Farbstoffe gegen tierische Fasern, Cellulose- und Kunstspinnfasern, S. 276ff. (Berlin 1957).

17) Sproviero, J., private Mitteilung.

18) Pfannemüller, B., H. Mayerhöfer und R. C. Schulz, *Biopolymers* **10**, 243 (1971).

19) Gilbert, L. M., G. A. Gilbert und S. P. Spragg in: R. L. Whistler, *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Band IV (Starch), S. 25 (New York u. London 1964).

20) Baum, H., G. A. Gilbert und H. L. Wood, *J. Chem. Soc. (London)* **1955**, 4047.

21) Honeyman, J. und J. W. W. Morgan, *J. Chem. Soc. (London)* **1955**, 3665.

Anschrift der Verfasser:

J. Adriani Trisnadi, Heide M. Bössler
und Rolf C. Schulz
Institut für Makromolekulare Chemie
Technische Hochschule
6100 Darmstadt, Alexanderstraße 24