

Anwendungen der ^{13}C -Resonanz-Spektroskopie, XI¹⁾

Pteridin-Spektren, I

Ulrich Ewers, Harald Günther* und Lothar Jaenicke

Institut für Organische Chemie* und Institut für Biochemie der Universität Köln,
D-5000 Köln, Zülpicher Straße 47

Eingegangen am 17. August 1973

Die ^{13}C -NMR-Spektren verschiedener Pteridine, u.a. die der biologisch wichtigen Verbindungen Folsäure und Amethopterin, wurden in neutraler und alkalischer Lösung vermessen und zugeordnet. Die pH-Abhängigkeit des Folatspektrums wurde verfolgt und ein $\text{p}K_{\text{a}}$ -Wert von 9.2 bestimmt.

Applications of ^{13}C Resonance Spectroscopy, XI¹⁾

Pteridin Spectra, I

The ^{13}C n.m.r. spectra of several pteridines, among others the biological important compounds folic acid and amethopterin, have been measured and assigned in neutral and alkaline solution. The pH-dependence of the folate spectrum was recorded and a $\text{p}K_{\text{a}}$ -value of 9.2 has been determined.

Die ^{13}C -NMR-Spektren von Stickstoffheterocyclen sind in den letzten Jahren intensiv untersucht worden²⁻⁸⁾. Dabei lieferte die Bestimmung der charakteristischen ^{13}C -NMR-Parameter dieser Systeme einerseits Informationen über die Beeinflussung der ^{13}C -Resonanzfrequenz durch die Elektronendichte am Kohlenstoff und durch benachbarte Stickstoffatome; andererseits war sie im Zusammenhang mit der biologischen Bedeutung, die viele dieser Verbindungen besitzen, von Interesse, da derartige Partialstrukturen bei hinreichender Empfindlichkeit auch in größeren, biologisch aktiven Molekülen erkannt und spektroskopisch verfolgt werden können⁹⁾. Damit eröffnet sich die Möglichkeit, weitere Erkenntnisse über Struktur, Konformation und dynamisches Verhalten solcher Moleküle zu erhalten.

¹⁾ X. Mittel.: H. Günther und W. Herrig, Chem. Ber. **106**, 3938 (1973), vorstehend.

²⁾ Übersicht bis 1971: J. B. Stothers, Carbon-13 NMR Spectroscopy, Kap. 7, S. 239 ff, und Kap. 11., Academic Press, New York 1972.

³⁾ K. R. Long, R. C. Long und J. H. Goldstein, J. Magn. Resonance **8**, 207 (1972).

⁴⁾ E. Breitmaier und K.-H. Spohn, Tetrahedron **29**, 1145 (1973).

⁵⁾ F. J. Weigert und J. D. Roberts, J. Org. Chem. **38**, 1313 (1973).

⁶⁾ L. Lunazzi und A. Mangini, Vortrag auf dem XI. Europäischen Kongreß für Molekülspektroskopie, Tallinn 28. 5.—1. 6. 1973, s. l. c. 7).

⁷⁾ C. A. Boicelli, R. Danieli, A. Mangini, L. Lunazzi und C. Piacucci, J. C. S. Perkin II **1973**, 1024.

⁸⁾ R. J. Pugmire, D. M. Grant, L. B. Townsend und R. K. Robins, J. Amer. Chem. Soc. **95**, 2791 (1973).

⁹⁾ A. Allerhand, R. F. Childres und E. Oldfield, Biochemistry **12**, 1335 (1973).

In der vorliegenden Arbeit berichten wir über ^{13}C -NMR-Studien an Pteridinen, deren biologische Bedeutung kürzlich zusammenfassend beschrieben wurde¹⁰⁾. Unser Ziel war es, die für diese Verbindungsklasse typischen ^{13}C -Resonanzfrequenzen zu ermitteln und die strukturellen Einflüsse, denen diese Größen unterliegen, näher zu charakterisieren. Die Zuordnung der ^{13}C -Resonanzsignale wird daher im folgenden ausführlich diskutiert.

Ergebnisse

Wegen der Unlöslichkeit der meisten Amino- und Oxopteridine konnten nur wenige Neutralmoleküle in Dimethylsulfoxid untersucht werden. Acht Verbindungen wurden als Anionen in 3 N NaOH vermessen¹¹⁾. Alle ^{13}C -NMR-Spektren wurden mit der Puls-Fourier-Transform-Technik¹²⁻¹⁴⁾ an Substanzen mit natürlichem ^{13}C -Gehalt (1.1%) aufgenommen. Als typisches Beispiel für die erzielte Spektrenqualität zeigt Abb. 1 das Spektrum des Pteridins (1) zusammen mit dem für die Zuordnung wichtigen „off-resonance“- ^1H -Entkopplungsexperiment.

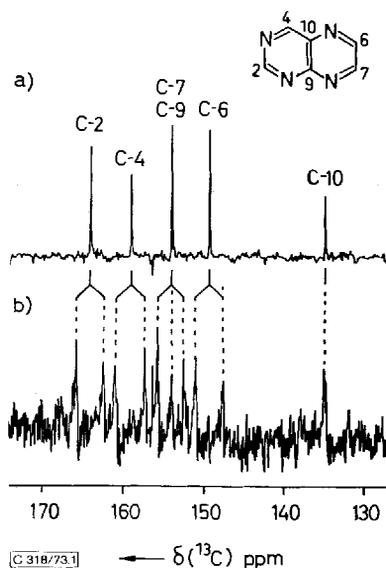


Abb. 1. ^{13}C -NMR-Spektrum des Pteridins (1) in Dimethylsulfoxid (0.2 M); δ_{TMS} -Skala (vgl. exp. Teil)

a) Mit Breitband-Protonenentkopplung, 6150 Impulse.

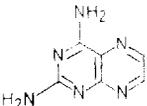
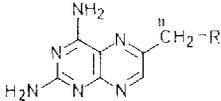
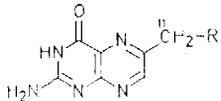
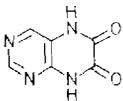
b) „off-resonance“- ^1H -Entkopplungsexperiment, 7100 Impulse

- ¹⁰⁾ H. Rembold und W. L. Gyure, *Angew. Chem.* **84**, 1088 (1972); *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **11**, 1061 (1972). Frühere Übersichten siehe: ^{10a)} W. Pfeleiderer, *Angew. Chem.* **75**, 993 (1963); *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **4**, 114 (1964). — ^{10b)} R. L. Blakley, *The Biochemistry of Folic Acid and Related Pteridines*, Elsevier Publ. Co., Amsterdam 1969.
- ¹¹⁾ Über Resultate von Messungen in 6 N H_2SO_4 , in der die Pteridine in protonierter Form vorliegen, wird in Kürze berichtet (U. Ewers, H. Günther und L. Jaenicke, in Vorbereitung).
- ¹²⁾ F. C. Farrar und E. D. Becker, *Pulse and Fourier Transform NMR*, Academic Press, New York 1971.
- ¹³⁾ E. Breitmaier, D. Jung und W. Voelter, *Angew. Chem.* **83**, 659 (1971); *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **10**, 673 (1971).
- ¹⁴⁾ W. Bremser, *Chemiker-Ztg.* **97**, 248, 259 (1973).

1) Neutralmoleküle

Die untersuchten Verbindungen und die gemessenen ^{13}C -Resonanzfrequenzen sind in Tab. 1 zusammengestellt. Die Zuordnung diskutieren wir zweckmäßig anhand von Abb. 2.

Tab. 1. ^{13}C -Resonanzfrequenzen (δ_{TMS} -Werte in ppm, vgl. exp. Teil) der Pteridine 1–5 in Dimethylsulfoxid

	C-2	C-4	C-6	C-7	C-9	C-10
	164.6	159.5	149.8	154.5	154.5	135.5
1	163.7	159.0	147.8	152.4	152.4	135.0 ^{a)}
	164.6	160.0	148.8	153.4	153.4	135.9 ^{b)}
	164.2	164.2	140.6	151.3	160.5	124.4
2						
	164.0		163.5	148.2	150.3	154.6
3 ^{c), d)}						122.8
	157.4	162.5	150.0	150.0	155.1	129.2
4 ^{e), f)}						
	151.6	141.1	154.2	156.4	145.0	120.6
5						

^{a)} In CDCl_3 , bezogen auf internes Tetramethylsilan als Standard.

^{b)} In CDCl_3 , bezogen auf externes Dioxan als Standard (vgl. exp. Teil).

^{c)} $\text{R} = -\text{N}(\text{CH}_3)-p\text{-C}_6\text{H}_4-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}(\text{CO}_2\text{H})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$.

^{d)} $\text{R}' = -\text{NH}-p\text{-C}_6\text{H}_4-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}(\text{CO}_2\text{H})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$.

^{e)} Die Resonanz von C-11 konnte wegen Überlagerung mit dem Signal des Lösungsmittels nicht bestimmt werden.

Beim Grundkörper, dem Pteridin (1), kann zwischen den Resonanzen der tertiären C-Atome einerseits und der quartären C-Atome andererseits durch „off-resonance“- ^1H -Entkopplung differenziert werden. Dieses Experiment (Abb. 1b) belegt gleichzeitig, daß sich bei 154.5 ppm zwei Signale überlagern. Die Zuordnung innerhalb der erwähnten Gruppen von C-Atomen, die sich experimentell nicht treffen läßt, ergibt sich eindeutig aus den Daten der Vergleichsverbindungen 6–8¹⁵⁾. Für C-2 und C-4 kann man die Resonanzfrequenzen im Chinazolin (8) mit dem Einfluß von N-5 und N-8, den man durch Vergleich der Daten von Naphthalin (6) und Chinoxalin (7) erhält, kombinieren. Analog verfährt man für C-6 und C-7 auf der Basis von 7 und dem Vergleichspaar 6/8. Für C-9 und C-10 sind beide Wege möglich. Man erhält folgendes Resultat:

	C-2	C-4	C-6	C-7	C-9	C-10
Ber.	164.7	157.6	147.7	153.9	159.8	134.9
Exp.	164.6	159.5	149.8	154.5	154.5	135.5

¹⁵⁾ R. J. Pugmire, M. J. Robins, D. M. Grant und R. K. Robins, J. Amer. Chem. Soc. **91**, 6381 (1969).

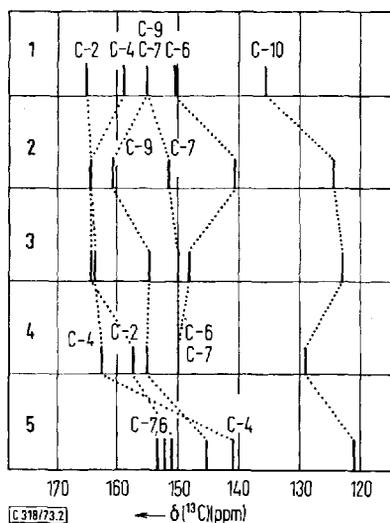
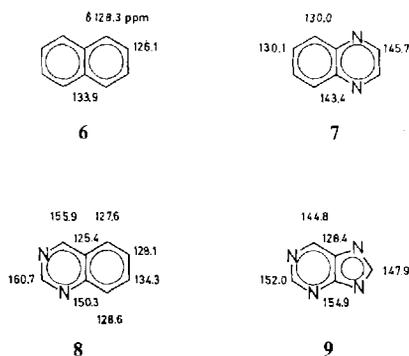


Abb. 2. Schematische Darstellung der ^{13}C -NMR-Spektren von 1–5

Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß C-9 und C-10 experimentell zweifelsfrei als quartäre C-Atome erkannt sind, ist damit die Zuordnung aller ^{13}C -Resonanzen



in 1 gesichert. Der Vergleich mit Purin (9)¹⁶⁾ zeigt, daß für C-9 und C-10 ganz ähnliche Werte gefunden werden, während die Resonanzen von C-2 und C-4 stark differieren. Die Messung in Chloroform läßt nur für $\delta(6)$, $\delta(7)$ und $\delta(9)$ Unterschiede von ca. 1 ppm erkennen, die einem Lösungsmittelleffekt zugeschrieben werden können.

Im 2,4-Diaminopteridin (2) wird C-4 als Folge der Substitution durch die NH_2 -Gruppe entschirmt, während sich $\delta(2)$ gegenüber 1 praktisch nicht verändert. Dies wird plausibel, wenn man die $\Delta\delta$ -Werte für C-1 im Anilin und C-2 im 2-Aminopyridin¹⁷⁾ betrachtet:

¹⁶⁾ R. J. Pugmire und D. M. Grant, J. Amer. Chem. Soc. **93**, 1880 (1971).

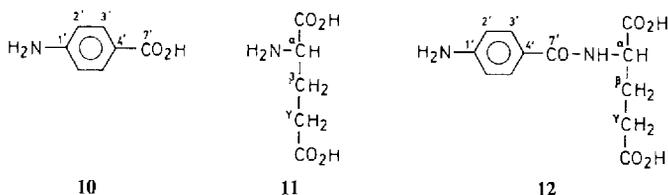
¹⁷⁾ Vgl. I. c. ³⁾, S. 197, 251.



Die Entschirmung bei Einführung der NH_2 -Gruppe wird bereits durch die Nachbarschaft eines Ringstickstoffs stark vermindert und für C-2 in **2** offenbar ganz beseitigt.

Die Resonanzen von C-6 und C-7 wandern bei **2** nach hohem Feld, was mit einer durch die Aminogruppen bedingten Ladungszunahme im Pyrazinring erklärt werden kann. C-10 wird stark abgeschirmt, wie man es aufgrund des *ortho*- und *para*-Effekts der NH_2 -Gruppe von $\Delta\delta = -12.4$ und -9.5 ppm im System Benzol/Anilin¹⁷⁾ erwartet. Hingegen resultiert für C-9 Entschirmung, ebenfalls in qualitativer Übereinstimmung mit dem Modellpaar Benzol/Anilin (*meta*-Effekt der NH_2 -Gruppe $+1.3$ ppm).

Tab. 2. Zuordnung der ^{13}C -Resonanzfrequenzen in der Seitenkette von Amethopterin (**3**) und Folsäure (**4**) durch Vergleich mit den ^{13}C -Resonanzen in der *p*-Aminobenzoesäure (**10**), Glutaminsäure (**11**)¹⁸⁾ und *N*-(*p*-Aminobenzoyl)glutaminsäure (**12**); δ_{TMS} -Werte in ppm (vgl. exp. Teil)



	10 (ber.) ^{a)}	10 (exp.)	11 ^{b)}	12	3	4
C-1'	152.9	154.1	—	153.1	152.1	152.1
C-2', C-6'	116.7	113.7	—	113.8	112.3	112.5
C-3', C-5'	131.5	132.4	—	130.3	130.3	130.3
C-4'	121.3	118.7	—	121.9	122.5	122.6
C-7'	168.5	168.7	—	167.9	167.7	167.7
C- α	—	—	55.4	53.0	53.0	53.0
C- β	—	—	27.8	27.4	27.4	27.4
C- γ	—	—	34.2	31.7	31.7	31.7
α -CO ₂ H	—	—	175.3	175.2	175.4	175.2
γ -CO ₂ H	—	—	182.0	175.1		175.0

^{a)} Auf der Basis der Additivität der Substituenteneffekte mit Hilfe der Daten von Benzoesäure¹⁹⁾ und Anilin¹⁷⁾ berechnet.

^{b)} In $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ bei pH 7.0¹⁸⁾; alle anderen Substanzen in Dimethylsulfoxid.

Die für **2** getroffene Zuordnung wird unabhängig durch die Befunde für Amethopterin (**3**) gestützt. Hier mußten zunächst die Resonanzen des *N*-(*p*-Methylaminobenzoyl)glutaminsäure-Restes identifiziert werden. Dies gelang durch Vergleich

¹⁸⁾ W. Horseley, H. Sternlicht und J. S. Cohen, J. Amer. Chem. Soc. **92**, 680 (1970).

¹⁹⁾ K. N. Scott, J. Amer. Chem. Soc. **94**, 8564 (1972).

mit den Spektren von *p*-Aminobenzoesäure (**10**), Glutaminsäure (**11**)¹⁸ und *N*-(*p*-Aminobenzoyl)glutaminsäure (**12**). Dabei wurde das Spektrum von **10** seinerseits durch Vergleich mit den Daten von Benzoesäure¹⁹ und Anilin¹⁷) zugeordnet (Tab. 2).

Im Pteridinteil von **3** sollte durch Einführung der Seitenkette besonders C-6 entschirmt werden, während man für C-9 Abschirmung erwartet. Dies wird experimentell bestätigt: $\Delta\delta(6) = 7.8$ ppm und $\Delta\delta(9) = -5.9$ ppm im Vergleich zu **2**. Die entsprechenden Werte für das Modellpaar Benzol/Toluol¹⁷) betragen 9.1 und -3.1 ppm. Alle anderen Resonanzen werden nur geringfügig verschoben.

In der Folsäure (**4**), bei der die ¹³C-Resonanzen des *N*-(*p*-Aminobenzoyl)glutaminsäure-Restes ebenfalls durch den in Tab. 2 angestellten Vergleich erkannt werden können, bewirkt die Einführung der Carbonylfunktion an C-4 eine Hochfeldverschiebung für die Resonanz von C-2 und eine Tieffeldverschiebung für diejenige von C-10, während die restlichen δ -Werte nahezu unverändert bleiben. Die Zuordnung $\delta(2) < \delta(4)$ wird durch die entsprechende Relation im 4-Oxo-3,4-dihydropteridin-Anion (**13**[⊖], Tab. 3), die dort durch „off-resonance“-¹H-Entkopplung gesichert ist, bestätigt. Daß C-9 trotz seiner β -Stellung zur CO-Gruppe nicht signifikant entschirmt wird, überrascht. Aus diesem Grund wäre eine Vertauschung der Zuordnung für C-2 und C-9 denkbar, doch ist dies aufgrund der π -Ladungsdichte²⁰) weniger wahrscheinlich.

Im 6,7-Dioxo-5,6,7,8-tetrahydropteridin (**5**) sind $\delta(2)$ und $\delta(4)$ durch „off-resonance“-¹H-Entkopplung festzulegen, wobei die Reihenfolge $\delta(2) > \delta(4)$ in Analogie zu **1** gewählt wird. Bei tiefem Feld bleiben dann noch zwei Resonanzsignale zuzuordnen, bei denen es sich um diejenigen von C-6 und C-7 handeln muß. Beide C-Atome sind danach relativ stark abgeschirmt. Im gleichen Bereich liegt die Resonanz des C-2-Carbonylkohlenstoffs im Uracil²¹). Die angegebene Zuordnung von $\delta(9)$ und $\delta(10)$ folgt dann zwangsläufig, da auch für **5** die in den anderen Systemen geltende Relation $\delta(9) > \delta(10)$ angenommen werden kann. Diesen Punkt sowie die Möglichkeit, daß **5** in der tautomeren Dihydroxystruktur vorliegt, behandeln wir ausführlicher in der folgenden Mitteilung²⁰).

2) Anionen

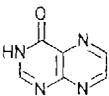
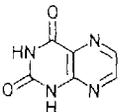
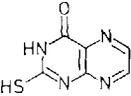
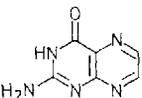
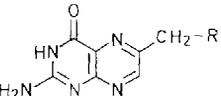
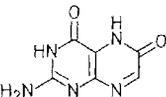
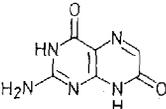
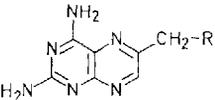
Die in 3 *N* NaOH untersuchten Pteridine und ihre ¹³C-Resonanzfrequenzen sind in Tab. 3 zusammengestellt. Die Zuordnung diskutieren wir mit Hilfe von Abb. 3.

Bei den 4-Oxo-3,4-dihydropteridinen bilden sich in alkalischer Lösung durch Deprotonierung an N-3 mesomere Anionen. Die negative Ladung wird daher verschiedene ¹³C-Resonanzen beeinflussen. Im Anion **13**[⊖] sind im Vergleich zu **1** C-4 entschirmt und C-6, C-7 abgeschirmt. Die Einführung einer weiteren Carbonylgruppe im 2,4-Dioxo-1,2,3,4-tetrahydropteridin-Anion (**14**[⊖]) hat dann auch Entschirmung von C-2 zur Folge. Da die Resonanzen von C-6 und C-7 durch ein „off-resonance“-¹H-Entkopplungsexperiment jeweils eindeutig festgelegt werden können, ist die Zuordnung der δ -Werte in der Verbindungsfolge **1/13**[⊖]/**14**[⊖] in sich konsistent.

²⁰) U. Ewers, H. Günther und L. Jaenicke, Chem. Ber., in Vorbereitung.

²¹) A. R. Tarpley und J. H. Goldstein, J. Amer. Chem. Soc. **93**, 3573 (1971).

Tab. 3. ^{13}C -Resonanzfrequenzen (δ_{TMS} -Werte in ppm, vgl. exp. Teil) der Pteridin-Anionen 3^{\ominus} , 4^{\ominus} und 13^{\ominus} – 18^{\ominus} in 3 N NaOH

	C-2	C-4	C-6	C-7	C-9	C-10	
	13^{\ominus}	161.0	173.6	144.2	150.2	155.0	132.8
	$14^{\ominus a)}$	169.2	174.1	137.6	149.0	158.9	129.8
	15^{\ominus}	186.7	172.0	140.2	149.4	155.9	130.6
	16^{\ominus}	165.0	173.9	139.1	149.1	157.2	130.7
	$4^{\ominus b)}$	164.5	173.6	147.5	147.5	156.0	128.8
	17^{\ominus}	164.5	174.3	161.1	146.8	148.8	125.7
	18^{\ominus}	164.8	174.2	135.9	170.6	159.4	120.1
	$3^{\ominus b)}$	162.9	163.5	148.7	149.9	154.1	121.2

^{a)} In 2 N KOH vermessen. ^{b)} R und R' vgl. Tab. 1.

Im 2-Mercapto-4-oxo-3,4-dihydropteridin-Anion (15^{\ominus}) ist C-2 erwartungsgemäß ²²⁾ stark entschirmt. Die restlichen Resonanzen sind jedoch gegenüber den δ -Werten in 13^{\ominus} und 14^{\ominus} nur unwesentlich verändert.

Im Pterin-Anion (16^{\ominus}) liegt die Resonanz von C-2 wieder bei höherem Feld, und zwar zwischen den Werten, die für 13^{\ominus} und 14^{\ominus} gefunden wurden. Alle anderen Signale zeigen keine signifikanten Verschiebungen. Substitution an C-6 führt im

²²⁾ A. J. Jones, D. M. Grant, M. W. Winkley und R. K. Robins, J. Amer. Chem. Soc. **92**, 4079 (1970).

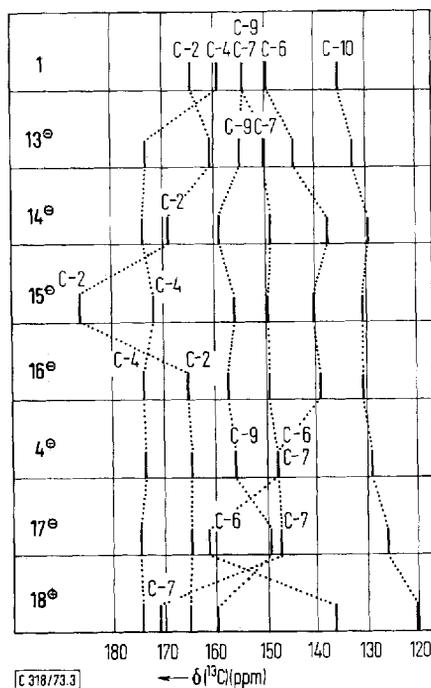


Abb. 3. Schematische Darstellung der ^{13}C -NMR-Spektren der Anionen 13^{\ominus} – 18^{\ominus}

Folsäure-Anion (4^{\ominus}) zur erwarteten Entschirmung dieses C-Atoms. Die Resonanzen der Seitenkette können wieder durch Vergleich mit den ^{13}C -Spektren von Partialstrukturen festgelegt werden (Tab. 4).

Tab. 4. Zuordnung der ^{13}C -Resonanzfrequenzen in der Seitenkette von Amethopterin-Anion (3^{\ominus}) und Folsäure-Anion (4^{\ominus}) durch Vergleich mit den ^{13}C -Resonanzen von Glutaminsäure (**11**) und *N*-(*p*-Aminobenzoyl)glutaminsäure (**12**) in alkalischer Lösung; δ_{TMS} -Werte in ppm (vgl. exp. Teil)

	11	12	3^{\ominus}	4^{\ominus}
C-1'	—	152.0	152.2	152.3
C-2', C-6'	—	116.2	112.3	113.7
C-3', C-5'	—	130.1	129.7	130.5
C-4'	—	124.0	123.0	122.8
C-7'	—	170.7	170.0	171.7
C- α	57.0	57.0	56.9	57.5
C- β	32.9	29.7	29.7	30.2
C- γ	35.5	35.5	35.3	35.9
α -CO ₂ H	} 184.2	180.3	180.3	180.9
γ -CO ₂ H ^{a)}		183.4	183.3	183.9
C-11	—	—	39.6	47.4

a) Zuordnung in Analogie zu Lit.¹⁸⁾.

Eine stärkere Tieffeldverschiebung resultiert für C-6 im Xanthopterin-Anion (17^\ominus), während C-9 hier abgeschirmt wird. Die Zuordnung von $\delta(7)$ ist durch „off-resonance“- ^1H -Entkopplung gesichert. Dagegen sind im Isoxanthopterin-Anion (18^\ominus) die Verhältnisse drastisch verändert: C-7 wird ebenso wie C-9 entschirmt, während nun die Resonanz von C-6 — durch „off-resonance“- ^1H -Entkopplung wieder experimentell gesichert — nach hohem Feld wandert. In der Reihe 15^\ominus — 18^\ominus wird schließlich C-10 zunehmend stärker abgeschirmt.

In Tab. 3 sind ferner die ^{13}C -Resonanzfrequenzen des Amethopterin-Anions (3^\ominus) aufgeführt, die sich im Pteridinring von denen des Neutralkmoleküls **3** (vgl. Tab. 1) nicht signifikant unterscheiden, da hier im Gegensatz zur Folsäure keine Deprotonierung an N-3 stattfinden kann.

Bei vier weiteren Anionen, dem des 6,7-Dioxo-tetrahydropteridins, 2,4,6,7-Tetroxooctahydropteridins, Leukopterins und Alloxazins konnten die Zuordnungen der ^{13}C -Resonanzen nur mit Hilfe der berechneten π -Ladungsdichten getroffen werden. Darauf gehen wir in der folgenden Mitteilung²⁰⁾ ein.

3) Die pH-Abhängigkeit des Folatspektrums

Da die meisten Oxo- und Aminopteridine in neutralen wäßrigen Lösungen außerordentlich schwer löslich sind, kann der Einfluß von Protonierungs- oder Deprotonierungsreaktionen auf die Lage der ^{13}C -Resonanzen des Heterocyclus nicht kontinuierlich über einen größeren pH-Bereich verfolgt werden. Eine Ausnahme bildet in dieser Beziehung die Folsäure, deren ^{13}C -NMR-Spektrum wir zwischen pH 7.8 und 12.4 aufnehmen konnten. Die erhaltenen Daten sind in Tab. 5 zusammengestellt.

Tab. 5. pH-Abhängigkeit der ^{13}C -Resonanzfrequenzen der Folsäure (4); Lösungsmittel $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$; δ_{TMS} -Werte in ppm (vgl. exp. Teil)

	pH-Wert					
	7.8	8.4	9.0	9.8	10.4	12.4
C-2		158.0	160.0	164.0	164.3	164.5
C-4	167.6	168.0	169.3	173.1	173.5	173.6
C-6	} 148.6	148.4	148.1	147.7	147.7	147.5
C-7						
C-9	153.9	154.2	155.9	156.0	156.0	156.0
C-10	126.9	127.7	127.9	128.8	128.9	128.8
C-11	47.4	47.4	47.4	47.4	47.4	47.4
C-1'	151.6	151.9	152.2	152.5	152.5	152.3
C-2'/C-6'	130.5	130.4	130.7	130.6	130.7	130.5
C-3'/C-5'	113.4	113.4	113.6	114.0	113.8	113.7
C-4'	122.2	122.5	122.6	123.1	122.9	122.8
C-7'	170.1	170.8	170.1	171.1	171.2	171.2
C- α	57.2	57.5	57.8	57.5	57.5	57.5
C- β	30.2	30.2	30.5	30.2	30.4	30.2
C- γ	36.0	35.9	36.2	35.9	36.1	35.9
α - CO_2H	184.0	184.0	184.2	184.1	184.1	183.9
γ - CO_2H	180.9	181.0	181.1	180.8	180.8	180.9

Die geringsten Änderungen beobachtet man für $\delta(6)$ und $\delta(7)$, deren Entartung bei allen pH-Werten erhalten bleibt. Für die restlichen C-Atome ergibt die graphische Darstellung (Abb. 4) „Titrationskurven“, wie sie von ähnlichen Experimenten an anderen Heterocyclen her bekannt sind^{3,4)}. Die größten Effekte zeigen die zu N-3, dem Ort der Deprotonierung, benachbarten C-Atome C-2 und C-4, geringere Verschiebungen werden für die quartären C-Atome beobachtet. Die graphisch und nach der Beziehung⁴⁾

$$pK_a = \text{pH} - \log[(\delta(\text{HA}) - \delta)/(\delta - \delta(\text{A}^\ominus))] \quad (1)$$

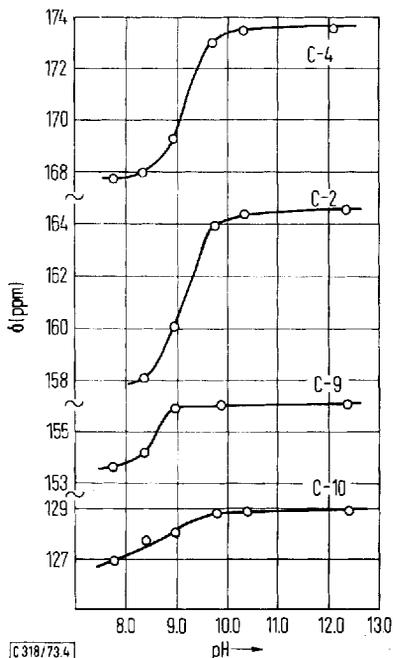


Abb. 4. pH-Abhängigkeit der ^{13}C -Resonanzfrequenz der C-Atome 2, 4, 9 und 10 in der Folsäure (4); δ_{TMS} -Werte (vgl. exp. Teil)

bestimmten pK_a -Werte betragen 9.2 (C-2, C-4) und 8.7 (C-9, C-10). UV-Spektroskopisch fand man einen Wert von 8.3²³⁾. Die Diskrepanz zwischen den beiden ^{13}C -NMR-spektroskopisch ermittelten Werten, die außerhalb der Fehlergrenze der graphischen Bestimmung (ca. ± 0.2 pK_a -Einheiten) liegt, zeigt an, daß diese Methode zu fehlerhaften Resultaten führen kann, wenn man hohe Genauigkeit erwartet. Dieser Punkt bedarf weiterer Untersuchungen. Interessant ist die Feststellung, daß in Analogie zur Deprotonierung einfacher Carbonsäuren²⁴⁾ die ^{13}C -Resonanzen im Folsäure-Anion (4[⊖]) nach tiefem Feld verschoben sind, obwohl die Ausbildung der negativen Ladung hier wie dort eine Abschirmung des ^{13}C -Kerns erwarten läßt.

²³⁾ A. Albert, *Biochem. J.* **56**, 646 (1953).

²⁴⁾ R. Hagen und J. D. Roberts, *J. Amer. Chem. Soc.* **91**, 4504 (1969).

Über einen Teilaspekt unserer Arbeit, die Zuordnung des Folsäure-Spektrums, wurde kürzlich unabhängig berichtet²⁵⁾. Da diese Autoren das ^{13}C -NMR-Spektrum des Pteridins (**1**) nicht vermessen konnten, beruht ihre Zuordnung lediglich auf Vergleichsdaten vom 4-Oxo-3,4-dihydropteridin und aus der Purinreihe. Die dadurch bedingte Unsicherheit wird durch unsere Experimente beseitigt.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft gilt unser Dank für eine großzügige Sachspende.

Experimenteller Teil

Die verwendeten Substanzen waren Handelspräparate (**13**, **15**, **18**: Aldrich Chem. Co., Milwaukee, USA; **16**, **17**: Fa. Schuchardt, München; **4**, **11**: Merck AG, Darmstadt; **12**: Fluka AG, Buchs, Schweiz; **14**: EGA-Chemie, Steinheim) oder standen aus früheren Untersuchungen²⁶⁾ zur Verfügung (**3**). **1**, **2** und **5** wurden nach bekannten Verfahren²⁷⁻²⁹⁾ hergestellt.

Die pH-Messung erfolgte mit dem Metrohm-pH-Meter (Typ E 350 B, Fa. Metrohm, Herisau, Schweiz) und einer Glaselektrode (\varnothing 5 mm, Typ 405 MS, Fa. Ingold, München). Die pH-Werte wurden vor und nach der NMR-Messung überprüft.

Für die Aufnahme der ^{13}C -Spektren wurden die Substanzen in Dimethylsulfoxid (20% $[\text{D}_6]$ DMSO) oder 3 N NaOH (20% NaOD) gelöst; die Lösungen waren 0.1–0.3 M. **14**⁹ wurde als einzige Verbindung in 2 N KOH vermessen, da die Löslichkeit des Na-Salzes zu gering war. Ungelöstes Material wurde von den Meßlösungen abzentrifugiert. Als Standard diente die ^{13}C -Resonanz von externem Dioxan. Die ermittelten Resonanzfrequenzen wurden mit δ_{TMS} (Dioxan) = 67.4 ppm³⁰⁾ auf die δ_{TMS} -Skala umgerechnet; auf eine Suszeptibilitätskorrektur wurde verzichtet.

Spektren wurden mit einem Bruker HX-90 Spektrometer im Puls-Fourier-Transform-Verfahren¹²⁻¹⁴⁾ bei 22.63 MHz registriert. Als Stabilisierungssignal dienten die ^2H -Resonanzen der deuterierten Lösungsmittelanteile (s. o.). Die Protonen wurden Breitband-entkoppelt. Zur Spektrenakkumulation diente ein Nicolet-Computer Typ 1083. Bis zu 60000 Impulsspektren mußten bei Proben geringer Konzentration akkumuliert werden.

25) J. A. Lyon, P. D. Ellis und R. B. Dunlop, *Biochemistry* **12**, 2425 (1973).

26) L. Jaenicke, *Acta Biol. Med. Ger.*, Suppl. II, **1963**, 186.

27) A. Albert, D. J. Brown und G. Cheeseman, *J. Chem. Soc.* **1951**, 474.

28) M. F. Malette, E. C. Taylor und C. K. Cain, *J. Amer. Chem. Soc.* **69**, 1814 (1947).

29) A. Albert, D. J. Brown und G. Cheeseman, *J. Chem. Soc.* **1952**, 1620.

30) G. C. Levy und J. D. Cargioli, *J. Magn. Resonance* **6**, 143 (1972).