

## 163. Inosin-N(1)-oxid-Nucleotide als Komplexbildner

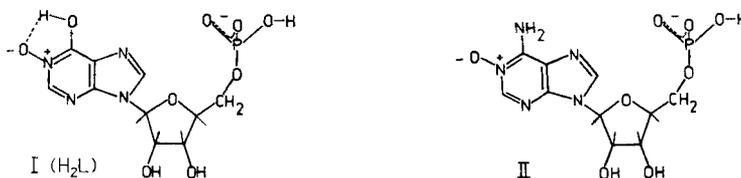
### II. Aciditätskonstanten von Inosin-N(1)-oxid und von dessen 5'-Monophosphat<sup>1)</sup>

von Helmut Sigel

(10. VII. 65)

#### 1. Allgemeines zur Bestimmung der Aciditätskonstanten unsymmetrischer zweibasischer Säuren

Die Bestimmung der Aciditätskonstanten des «ambivalenten» Ligandensystems Inosin-5'-monophosphat-N(1)-oxid ( $H_2L$ ) (I) bereitet, im Gegensatz zum Adenosin-5'-monophosphat-N(1)-oxid (II) [2], bei dem wegen der sehr verschiedenen Acidität der zwei Haftstellen<sup>2)</sup> diese Bestimmung einfach war, grundsätzliche Schwierigkeiten folgender Art: Auf Grund der Analogie zu Inosin-N(1)-oxid ( $HL'$ ) ( $pK_{HL'}^H = 5,40^3$ ) einerseits und zu Adenosin-5'-monophosphat ( $pK_A = 6,14$  [2]) andererseits waren sowohl für die *o*-Hydroxy-N-oxid- als auch für die Phosphat-Gruppe Aciditätskonstanten von  $pK \cong 6$  zu erwarten.



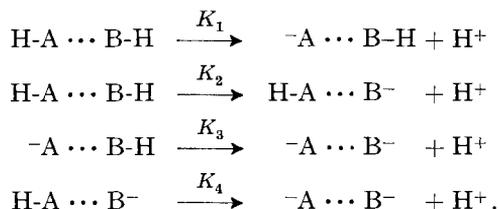
Die zu erwartenden Werte liegen also in einem für die potentiometrische Titration günstigen Bereich, wobei sich allerdings – da von derselben Größenordnung – die Puffergebiete der beiden sauren Gruppen überschneiden müssen. Die Schwierigkeit der Bestimmung bzw. Berechnung besteht nun ganz allgemein in der Verschiedenartigkeit der beiden auftretenden Mono-Anionen, d. h. die Aciditätskonstanten können nicht wie bei symmetrischen zweibasischen Säuren – bei denen nur ein einziges Mono-Anion entstehen kann – bestimmt werden. Es soll deswegen im folgenden untersucht werden, wie bei unsymmetrischen zweibasischen Säuren mit überlappenden Puffergebieten zu verfahren ist.

<sup>1)</sup> Zur Synthese dieser beiden Verbindungen vgl. I [1].

<sup>2)</sup> Der Phosphat-Gruppe entspricht ein  $pK_A = 6,13$ ; für die Abspaltung eines Protons von der *o*-Amino-N-oxid-Gruppe findet man  $pK_A = 12,49$  (vgl. [2]).

<sup>3)</sup> Vgl. Abschnitt 2 und Fig. 2.

Die beiden verschiedenartigen sauren Gruppen seien mit HA bzw. BH symbolisiert. Es gibt folgende Reaktionsmöglichkeiten:



Es ist zu berücksichtigen, dass für jede der beiden sauren Gruppen sich nur dann eine Aciditätskonstante ergibt, wenn die Dissoziation der einen Gruppe nicht vom Protonierungsgrad der anderen beeinflusst wird. Findet weder elektrostatische noch elektronische Wechselwirkung zwischen den beiden sauren Gruppen statt, so gelten die Gleichungen (1a) und (1b):

$$K_1 = K_4 = \frac{[\text{AB-H}] \cdot [\text{H}^+]}{[\text{H-AB-H}]} = \frac{[\text{AB}] \cdot [\text{H}^+]}{[\text{H-AB}]} \quad (1a)$$

$$K_2 = K_3 = \frac{[\text{H-AB}] \cdot [\text{H}^+]}{[\text{H-AB-H}]} = \frac{[\text{AB}] \cdot [\text{H}^+]}{[\text{AB-H}]} \quad (1b)$$

Für  $[\text{AB}_{\text{tot}}]$  gilt:

$$[\text{AB}_{\text{tot}}] = [\text{H-AB-H}] + [\text{H-AB}] + [\text{AB-H}] + [\text{AB}]. \quad (1c)$$

Der Neutralisationsgrad  $a$  beträgt

$$a = \frac{2[\text{AB}] + [\text{H-AB}] + [\text{AB-H}]}{[\text{AB}_{\text{tot}}]}. \quad (1d)$$

Aus diesen vier Gleichungen (1a) bis (1d) ergibt sich Gleichung (2), die aber noch die zwei Unbekannten  $K_1$  und  $K_2$  enthält, so dass eine direkte Lösung nicht möglich

$$K_1 \cdot K_2 = \frac{-[\text{H}^+] \cdot (1-a)}{(2-a)} \cdot (K_1 + K_2) + \frac{a \cdot [\text{H}^+]^2}{(2-a)}. \quad (2)$$

ist. Sie kann aber graphisch gelöst werden, wenn mehrere Wertepaare von  $a$  und  $[\text{H}^+]$  gegeben sind (vgl. Fig. 1b), ähnlich wie dies bei symmetrischen zweibasischen Säuren SCHWARZENBACH, WILLI & BACH [3] durchgeführt haben.

Es seien:  $x = K_1 + K_2$ ;  $y = K_1 \cdot K_2$  (Koordinaten-Achsen);  $m = -[\text{H}^+] \cdot (1-a)/(2-a)$  (Steigung);  $b = a \cdot [\text{H}^+]^2/(2-a)$  (Abschnitt auf der  $y$ -Achse), wodurch (2) die Form  $y = m \cdot x + b$  erhält. Die dadurch gegebene Gerade schneidet die Koordinaten-Achsen bei folgenden Werten:

$$x\text{-Achse: } A = \frac{a \cdot [\text{H}^+]}{(1-a)}; \quad y\text{-Achse: } B = \frac{a \cdot [\text{H}^+]^2}{(2-a)}.$$

Um nun  $K_1$  und  $K_2$  zu finden, berechnet man für mehrere Punkte der Titrationskurve mit Hilfe von  $a$  und  $[\text{H}^+]$  (Fig. 1a) die Werte von  $A$  und  $B$ , trägt diese in ein Koordinatensystem ein und verbindet die Punkte. Man erhält so mehrere Geraden, die sich alle im Punkt  $P$  mit den Koordinaten  $x_0$  und  $y_0$  schneiden sollten; sie tun dies infolge der Messfehler nur annähernd (Fig. 1b). Die Koordinaten  $x_0$  und  $y_0$  des Punktes  $P$  liefern die gesuchten Grössen

$$K_1 + K_2 = x_0 \quad (3a) \quad \text{und} \quad K_1 \cdot K_2 = y_0. \quad (3b)$$

Aus (3a) und (3b) erhält man  $(K_1)^2 - x_0 \cdot K_1 + y_0 = 0$ ; daraus folgt

$$K_{1(2)} = \frac{x_0 \pm \sqrt{x_0^2 - 4 \cdot y_0}}{2}, \quad (4)$$

und nach (3a):

$$K_{2(1)} = x_0 - K_{1(2)} \quad (5)$$

Die beiden Lösungen von (4) entsprechen den gesuchten Konstanten  $K_1$  und  $K_2$ , was sich durch die Berechnung von  $K_2$  bzw.  $K_1$  aus (5) bestätigen lässt.

Der Unterschied zwischen unserer und der üblichen Behandlung für symmetrische zweibasische Säuren ergibt sich aus einem Vergleich unserer Gleichung (2) mit der von SCHWARZENBACH, WILLI & BACH [3] verwendeten Gleichung, die wir zu (6) umgeformt haben<sup>4)</sup>:

$$K'_1 \cdot K'_2 = \frac{-[H^+] \cdot (1-a)}{(2-a)} \cdot K'_1 + \frac{a \cdot [H^+]^2}{(2-a)}. \quad (6)$$

Immer wenn  $K_2$  nicht gegen  $K_1$  zu vernachlässigen ist, müssen die Gleichungen (2) und (6) zu verschiedenen Ergebnissen führen. In unserem Fall erhält man durch graphische Auswertung nach (6)  $pK'_1 = 5,38$  und  $pK'_2 = 6,37$ , wogegen wir nach (2)  $pK_1 = 5,43$  bzw.  $pK_2 = 6,31$  finden (vgl. Abschnitt 2); die vergleichbaren Werte unterscheiden sich hier also mit ca.  $\pm 0,06$  pK-Einheiten nur relativ wenig. Der Grund hierfür ist jedoch, dass die beiden Aciditätskonstanten der hier untersuchten zweibasischen Säure bereits um 0,88 pK-Einheiten (vgl. Abschnitt 2) auseinander liegen, so dass die Konzentration des einen Mono-Anions die des anderen stark überwiegt; dadurch wird der Fehler, den man mit Gleichung (6) macht, in diesem Falle relativ klein. Handelt es sich jedoch um zwei nicht identische Säuregruppen derselben Acidität ( $K_1 = K_2$ ), so liefert Gleichung (6) ein falsches Bild, da sie für  $K'_1$  einen viermal grösseren Wert als für  $K'_2$  ergibt, obwohl nach Voraussetzung  $K_1 = K_2$  sein müsste.

Dass für symmetrische zweibasische Säuren ohne Wechselwirkung zwischen den sauren Gruppen das Verhältnis  $K_1/K_2 = 4$  ist, wurde schon von WEGSCHEIDER [4] und ADAMS [5] (vgl. auch BJERRUM [6]) auf Grund statistischer Überlegungen abgeleitet. Es rührt dies daher, dass das Mono-Anion HA auf zwei Arten entstehen kann, aber in der Ableitung von Gleichung (6) nur einmal berücksichtigt wird.

Für zweibasische Säuren mit nicht identischen Säuregruppen ungefähr gleicher Acidität muss für die Berechnung der Aciditätskonstanten folglich unbedingt Gleichung (2) verwendet werden, da es ja nicht «verboten» sein kann, dass z. B. eine phenolische -OH-Gruppe und eine  $-PO_3H^-$ -Gruppe dieselbe Acidität besitzen.

## 2. Experimenteller Teil

a) *Potentiometrische Bestimmungen*<sup>5)</sup>: Es wurden je 10 ml folgender Lösungen ( $I = 0,1$ ;  $t = 25^\circ$ ) mit 0,1 M NaOH titriert: a)  $[HClO_4] = 2 \cdot 10^{-3} M$ ,  $[NaClO_4] = 0,1 M$ ; b)  $[HClO_4] = 2 \cdot 10^{-3} M$ ,  $[NaClO_4] = 0,1 M$ ,  $[H_2L] = 2 \cdot 10^{-3} M$  (vgl. Fig. 1a). Die graphische Lösung der Gleichung (2) (Fig. 1b) ergab  $pK_1 = pK_{H_2L}^H = 5,43$  und  $pK_2 = pK_{HL}^H = 6,31$  als Durchschnittswerte aus je zwei Titrationen.

<sup>4)</sup> Die Protonenkonzentration des Wassers wurde durch Vergleichstitration eliminiert, so dass sie in Gleichung (2) nicht mehr berücksichtigt werden muss. Die von SCHWARZENBACH *et al.* [3] abgeleitete Gleichung wurde von uns in derselben Weise zu (6) umgeformt, deren Form der von (2) analog ist.

<sup>5)</sup> METROHM-Potentiograph E 336 und U-Mikro-Glaselektrode.

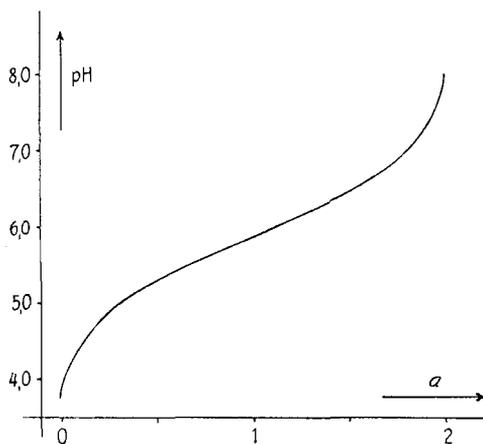


Fig. 1a. Neutralisationsgrad  $a$  einer  $2 \cdot 10^{-3}$  M Lösung von Inosin-5'-monophosphat-N(1)-oxid ( $H_2L$ ) in Abhängigkeit vom pH ( $I = 0,1$ ;  $t = 25^\circ$ )

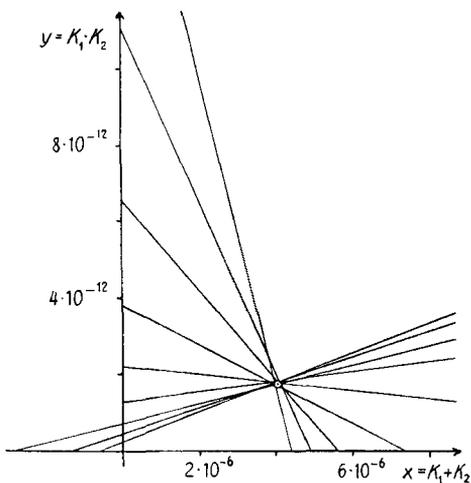


Fig. 1b. Graphische Auswertung der Neutralisationskurve von Fig. 1a nach Gleichung (2). Der Punkt  $P(x_0/y_0)$  hat die Koordinaten  $x_0 = 4,1 \cdot 10^{-6}$  und  $y_0 = 1,8 \cdot 10^{-12}$ .

b) Spektrophotometrische Bestimmungen<sup>6)</sup>: Die Aciditätskonstante  $pK_{HL}^H$  von Inosin-N(1)-oxid ( $HL'$ ) liess sich einfach ermitteln, da die Deprotonierung der OH(6)-Gruppe eine ausgeprägte Änderung des UV.-Spektrums (Max. 226 nm) bewirkt (Fig. 2). Absorptionsspektren von  $HL'$  (pH 3,14) und  $L'$  (pH 7,90) sind direkt messbar; die Gleichgewichtsanteile in Lösungen ( $[HL'] = 3,2 \cdot 10^{-5}$  M) mit intermediären pH-Werten lassen sich durch lineare Interpolation bestimmen. Wir fanden so  $pK_{HL}^H = 5,40 \pm 0,02$  ( $I = 0,1$ ,  $NaClO_4$ ;  $t = 25^\circ$ ).

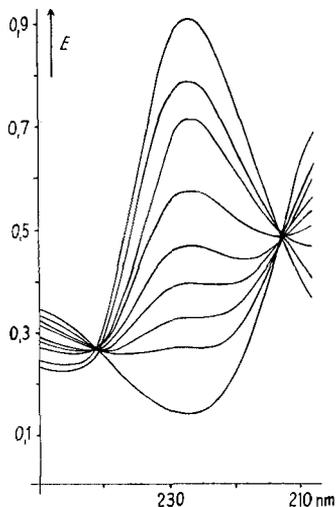


Fig. 2. UV.-Absorption einer  $3,2 \cdot 10^{-5}$  M Lösung von Inosin-N(1)-oxid ( $HL'$ ) bei pH 3,14; 4,73; 4,93; 5,17; 5,38; 5,51; 5,89; 6,14 und 7,90 (von unten nach oben) (1-cm-Quarzküvetten;  $I = 0,1$ ;  $t = 25^\circ$ )

Die Aciditätskonstante der OH(6)-Gruppe von Inosin-5'-monophosphat-N(1)-oxid ( $H_2L$ ; I) lässt sich gleich wie diejenige von  $HL'$  ermitteln. Die Absorptionsspektren zeigen denselben Verlauf wie die in Fig. 2 dargestellten (Max. 226 nm;  $[H_2L] = 3,2 \cdot 10^{-5}$  M). Wir erhielten so für die *o*-Hydroxy-N-oxid-Gruppe von  $H_2L$   $pK_{H_2L}^H = 5,53 \pm 0,04$  ( $I = 0,1$ ,  $NaClO_4$ ;  $t = 25^\circ$ ).

<sup>6)</sup> BECKMANN-Spektrophotometer DB.

### 3. Diskussion der Ergebnisse

Welche der beiden Aciditätskonstanten zu welcher sauren Gruppe gehört, geht natürlich aus den Ergebnissen der potentiometrischen Bestimmung nicht hervor; die spektrophotometrischen Messungen hingegen zeigen, dass  $pK_1 = pK_{H_2L}^H = 5,43$  eindeutig der OH(6)-Gruppe des heterocyclischen Ringsystems zuzuordnen ist, so dass  $pK_2 = pK_{HL}^H = 6,31$  der  $-PO_3H^-$ -Gruppe entsprechen muss. Dass der Wert von 6,31 für die  $-PO_3H^-$ -Gruppe des Inosin-5'-monophosphat-N(1)-oxids etwas grösser, d. h. dass diese  $-PO_3H^-$ -Gruppe weniger sauer ist als die  $-PO_3H^-$ -Gruppe von Adenosin-5'-monophosphat ( $pK_A = 6,14$  [2]), ist verständlich, da das Proton in diesem Falle aus einem doppelt negativ geladenen Anion abdissoziieren muss. Der Einfluss dieser zweiten negativen Ladung ist allerdings auf Grund ihrer grossen räumlichen Entfernung gering, weshalb die Differenz nur ungefähr 0,2 pK-Einheiten beträgt.

Mit Hilfe dieser beiden nun bekannten Aciditätskonstanten der zwei sauren Gruppen des Inosin-5'-monophosphat-N(1)-oxids lässt sich die Konstante für den intramolekularen Übergang eines Protons von der Phosphat- auf die phenolische Hydroxyl-Gruppe – bzw. den umgekehrten Vorgang – berechnen. Anwendung des Massenwirkungsgesetzes auf die Reaktionsgleichung:



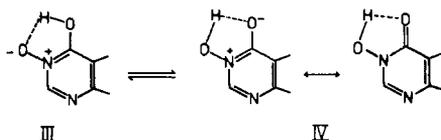
ergibt aus Gleichung (1a) und (1b):

$$K_5 = \frac{[\text{H-AB}]}{[\text{AB-H}]} = \frac{K_2}{K_1} = K_{\text{PO}_3\text{H/OR}}^{\text{PO}_3\text{H/OR}} = \frac{[\text{O}^- \text{---} \text{PO}_3\text{H}^-]}{[\text{HO} \text{---} \text{PO}_3^{2-}]}$$

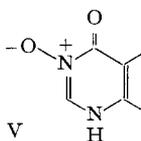
Für Inosin-5'-monophosphat-N(1)-oxid ergibt sich

$$pK_5 = pK_2 - pK_1 = 6,31 - 5,43 = pK_{\text{PO}_3\text{H/OR}}^{\text{PO}_3\text{H/OR}} = 0,88.$$

Man kann sich fragen, welche Aufschlüsse sich aus der Aciditätskonstanten  $pK_{H_2L}^H = 5,43$  der *o*-Hydroxy-N-oxid-Gruppe hinsichtlich der Frage ergeben, an welchem der beiden Sauerstoff-Substituenten das Proton gebunden ist. In Analogie zu Befunden von GARDNER & KATRITZKY [7] am 2-Hydroxypyridin-N(1)-oxid, wo eine breite OH-Absorptionsbande (3200–2300  $\text{cm}^{-1}$ ) das Vorliegen eines starken Wasserstoffbrücken-Chelates anzeigt, ergeben sich für Inosin-N(1)-oxid und dessen 5'-Monophosphat (I) die Strukturmöglichkeiten III und IV<sup>7)</sup>. Beim Pyridin-N(1)-oxid-2-oxy-



<sup>7)</sup> Das Vorliegen einer Form V ist unwahrscheinlich, da das UV.-Spektrum bei der Deprotonierung (Fig. 2) und bei der Ausbildung der  $\text{Me}^{2+}$ -Komplexe (vgl. [9], Fig. 2a) sich in derselben Weise verändert – analog verhält es sich beim Adenosin-5'-monophosphat-N(1)-oxid (vgl. [2], Fig. 2a, b und c) –, das Metall-Ion sicherlich aber über die *o*-Hydroxy-N-oxid-Gruppe und nicht über den N(3) gebunden ist.



Anion vermuten GARDNER & KATRITZKY [7] eine bevorzugte Protonierung des N(1)-oxid-Sauerstoffes, d. h. ein Vorherrschen der N(1)-Hydroxy-pyridon(-2)-Form (entsprechend IV).

Die Basizität des N(1)-Oxid-Sauerstoffes beträgt im 2-Aminopyridin-N(1)-oxid [7] [8] und im Adenosin-5'-monophosphat-N(1)-oxid [2]  $pK_A \cong 2,6$ : im Inosin-N(1)-oxid und in dessen 5'-Monophosphat wird seine Basizität durch die Nachbarschaft des Phenolat-Sauerstoffes um ca. 2 bis 3 Zehnerpotenzen erhöht sein. Für den Phenolat-Sauerstoff andererseits ist nach der Einführung der N(1)-Oxid-Funktion ein  $pK_A \cong 6$  ebenfalls durchaus zu erwarten, so dass auf Grund von Gleichgewichtsdaten zwischen den Strukturen III und IV kaum zu unterscheiden ist. Diese Frage ist jedoch ohne weitere Bedeutung für die Verwendung der Aciditätskonstanten zur Bestimmung der Komplexbildungsgleichgewichte unserer Liganden [9].

Herrn Prof. Dr. H. ERLNMEYER danke ich für sein Interesse an der vorliegenden Arbeit. Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. H. BRINTZINGER für klärende Diskussionen und wertvolle Anregungen. Ferner danke ich Herrn Dr. B. PRIJS für seine Hilfe bei der Abfassung des Manuskriptes und Fr. K. RADICKE für ihre Mitwirkung bei der experimentellen Durchführung dieser Arbeit.

#### SUMMARY

A method is derived for the determination of acidity constants of ligands with two non-identical acidic groups of similar acidity for the case of no interaction between these two groups. By this method the acidity constants of inosine-5'-monophosphate N(1)-oxide are found to be  $pK_{H,L}^H = 5,43$  and  $pK_{HL}^H = 6,31$ . Spectrophotometric investigations show that  $pK_{H,L}^H$  belongs to the *o*-hydroxy-N-oxide group. Therefore  $pK_{HL}^H$  must be the acidity constant of the phosphate group. For comparison, the acidity constant of inosine N(1)-oxide ( $pK_A = 5,40$ ) has also been determined.

Institut für Anorganische Chemie  
der Universität Basel

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] H. SIGEL & H. BRINTZINGER, *Helv.* **48**, 433 (1965).
- [2] H. SIGEL & H. BRINTZINGER, *Helv.* **47**, 1701 (1964).
- [3] G. SCHWARZENBACH, A. WILLI & R. O. BACH, *Helv.* **30**, 1303 (1947).
- [4] R. WEGSCHEIDER, *Mh. Chem.* **16**, 153 (1895); **23**, 599 (1902).
- [5] E. Q. ADAMS, *J. Amer. chem. Soc.* **38**, 1503 (1916).
- [6] N. BJERRUM, *Z. physikal. Chem.* **106**, 219 (1923).
- [7] J. N. GARDNER & A. R. KATRITZKY, *J. chem. Soc.* **1957**, 4375.
- [8] H. SIGEL & H. BRINTZINGER, *Helv.* **46**, 701 (1963).
- [9] H. SIGEL, *Helv.* **48**, 1519 (1965).