

Beiträge zur Chemie der Pyrrolpigmente, 32. Mitt.¹:

Zum diagnostischen Wert der ^{13}C -Kernresonanzspektroskopie bei diastereomeren Bilatrienen-abc

Heinz Falk*, Karl Grubmayr und Ernst Haslinger

Institut für Organische Chemie, Universität Wien,
A-1090 Wien, Österreich

(Eingegangen 4. April 1979. Angenommen 25. April 1979)

On the Chemistry of Pyrrole Pigments, XXXII: On the Diagnostic Value of ^{13}C -NMR-Spectroscopy of Diastereomeric Bilatrienes-abc

All ^{13}C -NMR signals of (*Z, Z, Z*)-Aetiobiliverdin-IV- γ could be assigned to the corresponding positions of the molecular framework using double resonance experiments. In the (*Z, Z, E*)-isomer the methine carbon signals of the terminal moieties are shifted in a dramatically different manner. Thus they represent an ideal tool for labelling experiments aiming at an experimental support of the photoisomerization hypothesis of the photoreaction of phytochrome.

(*Keywords: Bile pigments; C-13-NMR; Diastereomers*)

Einleitung

Bilatriene-abc besitzen strukturelle Ähnlichkeiten mit der chromophoren Einheit des Photorezeptors für die Photomorphogenese der Pflanzen und wurden deshalb gelegentlich als Modellsysteme für den Phytochromchromophor untersucht². Im Bestreben, Grundlagen der Chemie von Bilatrienen-abc in Hinblick auf das molekulare Geschehen bei der Photoumwandlung der beiden Phytochromformen zu untersuchen, konnten wir diastereomere (an exocyclischen Doppelbindungen geometrisch isomere) Modellpigmente, wie (*Z, Z, Z*)- und (*Z, Z, E*)-Aetiobiliverdin-IV- γ oder (*Z, Z, Z*)-, (*E, Z, Z*)- und (*Z, Z, E*)-Biliverdindimethylester isolieren und charakterisieren³.

Für die Überprüfung einer der möglichen Hypothesen über die Photoreaktion des Phytochroms, nämlich einer Photoisomerisierung an einer exocyclischen Doppelbindung des Chromophors⁴, bietet sich u. a. die kernresonanzspektroskopische Untersuchung entsprechend ^{13}C — markierter Systeme an⁵. Die primäre Frage ist dabei, an welcher Stelle

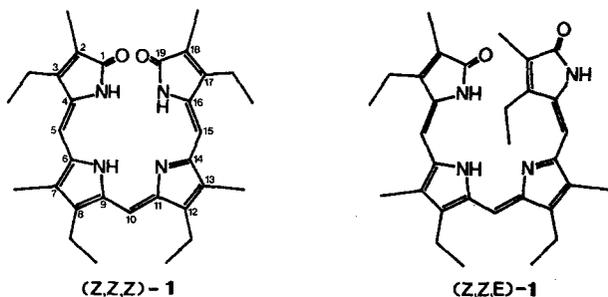
des Pigments eine Isotopenmarkierung den größten diagnostischen Wert aufweist: Voraussetzung für ein solches Experiment ist ja, daß wenigstens ein einwandfrei identifizierbares Signal bei der Isomerisierung in charakteristischer Weise verschoben wird.

Die vorliegende Mitteilung soll nun an Hand der diastereomeren Aetiobiliverdine-IV- γ eine Antwort darauf geben.

Methodik

Für die Darstellung von (*Z, Z, Z*)- und (*Z, Z, E*)-Aetiobiliverdin-IV- γ vgl. ^{3,6}.

Die ¹³C-Kernresonanzspektren wurden mit einem Varian XL-100-15 Kernresonanzspektrometer (Meßröhrchen von 12 mm Durchmesser) in Kombination mit einem Varian 16k-620L-100 Rechner aufgenommen. Die Konzentrationen der Meßlösungen betrug 0,17 mol l⁻¹ — das Lösungsmittel (CDCl₃, 99,9% D) wurde vor Gebrauch über Al₂O₃ (Akt. Stufe II—III, Merck) filtriert. Im Falle von (*Z, Z, E*)-**1** verwendete man Lösungen von 0,08 mol l⁻¹; (*Z, Z, Z*)-**1** zeigt beim Verdünnen auf diese Konzentration keine auffälligen Konzentrationsverschiebungen. Die Frequenzbestimmung für die selektiven ¹H—¹³C-Entkopplungsexperimente erfolgte durch Bestimmung des ¹H-*Fourier*-Transform-Observe-Offset der einzelnen Protonensignale.



Typische Parameter für die Pulsexperimente waren: Pulsweite 30 μ s (90°-Puls, 48 μ s), Acquisitionszeit 0,8 s — ein Pulsdelay von 1 s wurde nur bei Aufnahme der unentkoppelten Spektren verwendet, um in diesem Zeitraum durch ein Störfeld die Sättigung der Protonenresonanzen zu erreichen. Es wurden jeweils 5 000 bis 30 000 Pulsresponse akkumuliert. Die Meßtemperatur lag je nach angewandter Entkopplungsmethode zwischen 30 und 34 °C. Im Falle von (*Z, Z, E*)-**1** konnte wegen der thermischen Rückreaktion⁷ zu (*Z, Z, Z*)-**1** und die dadurch gegebene Zeitbegrenzung nur ein rauschentkoppeltes ¹³C-Spektrum mit vertretbarem Signal-Rausch-Verhältnis erhalten werden.

Ergebnisse und Diskussion

1. Die ¹³C-Signalzuordnung bei (*Z, Z, Z*)-**1**

Die in der Tab. 1 enthaltenen Signalzuordnungen wurden wie folgt getroffen: Auf Grund ihres Verschiebungswertes ist das Signal der

Carbonyl-C-atome in Position 1 und 19 unmittelbar zuzuordnen — diese Zuordnung ergibt sich auch aus dem Vergleich mit dem umfangreichen Material von *Gossauer*⁸. Aus der Multiplizität im unentkoppelten Spektrum folgt auch die Zuordnung der Methinsignale der Kohlenstoffatome in Position 5, 10 und 15. Selektive Entkopplung durch Einstrahlen der entsprechenden Methinprotonenfrequenz* sowie auch der Vergleich mit publizierten Daten⁸ erlaubt deren Differenzierung.

Tabelle 1. ¹³C-Kernresonanzspektrum von (*Z, Z, Z*)-1

C-Atom No.	Chem. Verbindung (ppm)	Multiplizität	Kopplung nach
1,19	172,7	q	CH ₃ -2,18
2,18	128,3	m	CH ₃ -2,18
3,17	146,4	m	CH ₂ -3,17
4,16	139,8	s	
5,15	96,3	d	H-5,15
6,14	149,8	s*	CH ₃ -7,13
7,13	126,9	m	CH ₃ -7,13
8,12	141,3	m	CH ₂ -8,12
9,11	140,8	s	
10	113,8	d	H-10
CH ₃ -2,18	8,2	q	
CH ₃ -7,13	9,4	q	
CH ₃ CH ₂ -3,17	17,8; 14,5	t; q	
CH ₃ CH ₂ -8,12	17,8; 16,1	t; q	

* Schwach verbreitert.

Die eindeutige Zuordnung der quartären Kohlenstoffatome fußt auf der Tatsache, daß im unentkoppelten Spektrum von (*Z, Z, Z*)-1 die entsprechenden Signale in zwei Gruppen unterteilt werden können (vgl. Abb. 1): Drei Signale erscheinen verhältnismäßig scharf, und nur eines davon besitzt eine sichtbare Fernkopplung. Die vier verbleibenden Signale sind durch kleine Kopplungen stark verbreitert; diese Kopplungen können nur von Protonen an den benachbarten Alkylgruppen herrühren. Da die Zuordnung der Protonensignale im ¹H-NMR-Spektrum von (*Z, Z, Z*)-1 bekannt ist³, kann durch selektive Entkopplung der entsprechenden Protonen eine Zuordnung dieser verbreiterten Signale getroffen werden. Bestrahlen der Übergänge von CH₃-2 bzw.

* Für die Zuordnung der Protonenresonanzen s. Lit.³ und Lit.¹

CH_3 -18 und CH_3 -7 bzw. CH_3 -13 ergibt die eindeutige Zuordnung der Signale bei $\delta = 128,3$ und $126,9$ ppm zu den C-Atomen in Position 2,18 und 7,13. Die Linien bei $\delta = 141,3$ und $146,4$ ppm können nur gemeinsam entkoppelt werden, da die entsprechenden Protonensignale der Methylengruppen in den Positionen 3, 8, 12, 17 überlappen. Zugabe

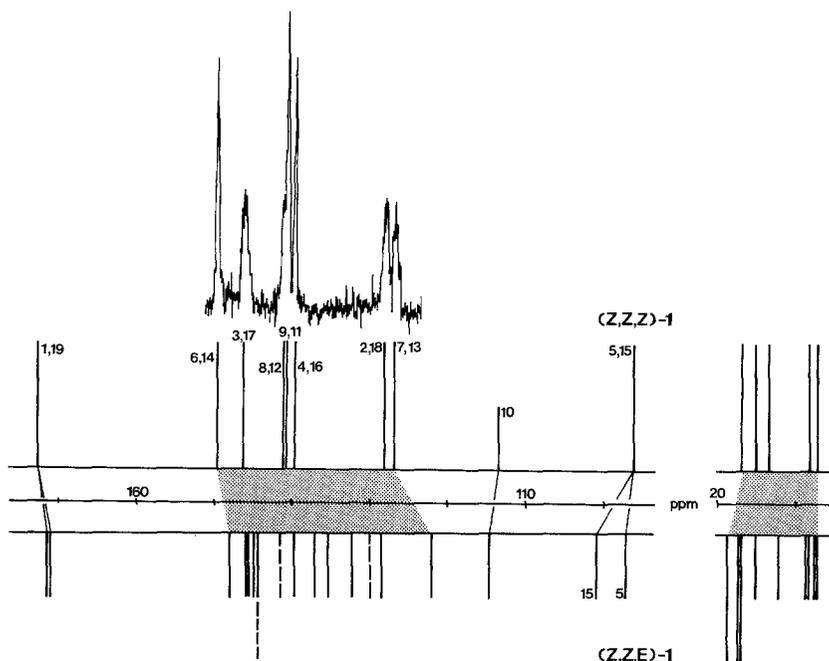


Abb. 1. Schematische Korrelation der ^{13}C -Resonanzen von (Z, Z, Z)- und (Z, Z, E)-1 und unentkoppelter Bereich der quartären Kohlenstoffatome von (Z, Z, Z)-1 (strichliert dargestellte Signale sind unsicher; die Zuordnungen im Bereich der Alkylgruppen gehen aus Tab. 1 hervor)

von Lanthanidenverschiebungsreagens beeinflusst aber das Signal bei $146,4$ ppm in weitaus stärkerem Maße (über LIS-Experimente soll in einer folgenden Mitt. berichtet werden), so daß auch hier die Zuordnung möglich ist, wie sie in Tab. 1 aufscheint. Diese Unterscheidung ist auch in Übereinstimmung mit den unterschiedlichen chemischen Verschiebungen bei analogen Verbindungen⁸.

Entkopplung von H-10 ergibt auch eine Erhöhung der Intensität des Kohlenstoffsignals bei $\delta = 140,8$ ppm, welches damit C-9 bzw. C-11 zuzuordnen ist.

Durch Einstrahlen der Frequenz des Überganges von H-5 bzw. H-15 erhält man eine analoge Signalerhöhung bei den beiden Linien mit $\delta = 139,8$ und $149,8$ ppm. Die Unterscheidung derselben ist einerseits durch die große Differenz der chemischen Verschiebungen und andererseits durch die Eliminierung einer kleinen Kopplung von C-6 bzw. C-14 mit den Protonen von CH₃-7 bzw. CH₃-13 durch Einstrahlen der entsprechenden Methylgruppen-Protonenfrequenz möglich.

2. Die „Isomerisierungsverschiebungen“

Wie die schematische Darstellung der Spektren von (Z, Z, Z)- und (Z, Z, E)-1 in Abb. 1 zeigt, erfolgt deutlich die zu erwartende Aufhebung der scheinbaren C_{2v}-Symmetrie⁹. Die Gruppenzuordnung der Signale von (Z, Z, E)-1 wurde durch Aufnahme von Proben erleichtert, die thermisch schon teilweise in (Z, Z, Z)-1 isomerisiert waren⁷.

Wegen der großen experimentellen Schwierigkeiten bei der Aufnahme von Spektren der thermisch doch eher empfindlichen Verbindung (Z, Z, E)-1 konnte die Zuordnung einzelner Signale nicht in allen Fällen sicher getroffen werden — was aber auch nicht Absicht der vorliegenden Arbeit war.

Der augenfälligste und wichtigste Aspekt ist hier wohl, daß es bei den Signalen der Methingruppen in den Positionen 5 und 15 zu einer dramatischen Veränderung der Lagen durch die Photoisomerisierung an einer exocyclischen Doppelbindung kommt. Da diese Signalgruppe bereichsmäßig gut isoliert ist, kann sie zweifelsfrei lokalisiert werden und bietet damit ein einfaches diagnostisches Hilfsmittel für die Feststellung einer geometrischen Isomerisierung im Bereich der Doppelbindungen der terminalen Ringe von Bilatrienen-abc. Somit sind diese Positionen für ein Markierungsexperiment an nativen Materialien prädestiniert.

Dank

Die vorliegende Untersuchung wurde vom Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung unterstützt.

Literatur

- ¹ 31. Mitt.: H. Falk, E. Haslinger und T. Schlederer, Mh. Chem. **110**, 1287 (1979).
- ² Z. B.: M. J. Burke, D. C. Pratt und A. Moscowitz, Biochem. **11**, 4025 (1972); P. S. Song, Q. Chae, D. A. Lightner, W. R. Briggs und D. Hopkins, J. Amer. Chem. Soc. **95**, 7982 (1973); Q. Chae und P. S. Song, J. Amer. Chem. Soc. **97**, 4176 (1975); W. S. Sheldrick, J. Chem. Soc., Perkin II, **1976**, 1457; A. R. Holzwarth, H. Lehner, S. E. Braslavsky und K. Schaffner, Ann. Chem. **1978**, und vorangegangene Mitt. der Mülheimer Gruppe; L. Margulies und M. Stockburger, J. Amer. Chem. Soc. **101**, 743 (1979).

- ³ *H. Falk* und *K. Grubmayr*, *Ang. Chem.* **89**, 487 (1977); *H. Falk*, *K. Grubmayr*, *E. Haslinger*, *T. Schlederer* und *K. Thirring*, *Mh. Chem.* **109**, 1451 (1978).
- ⁴ Siehe d. Übersichten: *R. K. Clayton*, *Light and Living Matter*, II. New York: McGraw-Hill, 1971; *R. E. Kendrick* und *C. J. P. Spruit*, *Photochem. Photobiol.* **26**, 201 (1977); *L. H. Pratt*, *Photochem. Photobiol.* **27**, 81 (1978).
- ⁵ Diese Motivation entstammt einer anregenden Diskussion mit Prof. *W. Rüdiger*, Sommer 1978.
- ⁶ *H. Falk* und *K. Grubmayr*, *Synthesis* **1977**, 614.
- ⁷ *H. Falk* und *K. Grubmayr*, *Mh. Chem.* **110**, 1237 (1979).
- ⁸ *V. Wray*, *A. Gossauer*, *B. Grüning*, *G. Reifenstahl* und *H. Zilch*, *J. Chem. Soc., Perkin II*, im Druck; wir danken Herrn Prof. *Gossauer* für eine Kopie dieses Manuskriptes sehr herzlich.
- ⁹ Vgl. dazu die ¹H-NMR-Ergebnisse in Lit.^{3 b}.