

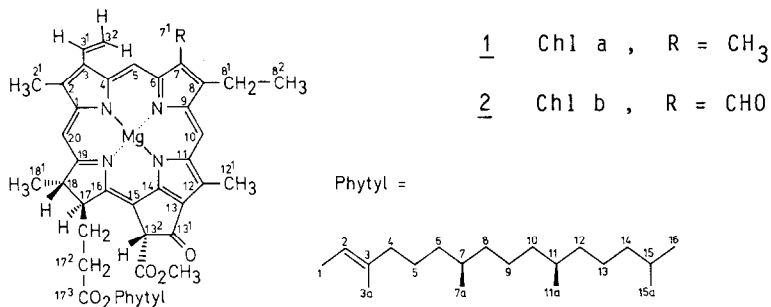
CHLOROPHYLL B. TOTALZUORDNUNG DES ^{13}C -NMR-SPEKTRUMS

Nikolaus Risch und Hans Brockmann *

Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld, D-4800 Bielefeld

Summary : The assignment of all resonances in the ^{13}C NMR spectrum of chlorophyll b has become possible by using incremental data and special NMR techniques.

Eine Reihe von Arbeitsgruppen hat sich in den letzten Jahren mit den ^{13}C -NMR-Daten von Chlorophyll a (1) Chl a ¹⁻³) und einigen seiner metallfreien Derivate ⁴⁻⁶) beschäftigt. Das Chlorophyll b (2) Chl b tritt in grünen Pflanzen stets als wesentlicher Begleiter (ca. 25%) auf. Die beiden Chlorophylle unterscheiden sich einzig durch ihren Substituenten an C-7 ⁷); das Chl b trägt hier anstelle einer Methyl- eine Formylgruppe, was zu einer nicht unerheblichen Veränderung seines chemischen und spektroskopischen Verhaltens führt. Im ^{13}C -NMR-Spektrum bewirkt der elektronenanziehende Substituent im Vergleich zum Chl a eine Reihe nicht trivialer Änderungen von Resonanzlagen, so daß das Zuordnungsproblem bislang nicht gelöst war ⁸).



Der Bereich der sp^3 -hybridisierten Kohlenstoffatome (0-70 ppm) ist unter Zuhilfenahme von Vergleichsdaten ¹⁻⁶) und den üblichen Techniken der modernen Kernresonanzspektroskopie (BB, SFORD etc.) relativ leicht zu analysieren und soll hier nicht detailliert diskutiert werden (vgl. Tab.1). Ebenfalls unproblematisch ist die Zuordnung der jeweils zwei olefinischen C-Atome des Phytylrestes und des 3-Vinylsubstituenten. Von den vier Brückenmethinkohlenstoffatomen gibt sich C-15 (104.20 ppm) im SFORD-Spektrum als Singulett zu erkennen, C-20 erscheint charakteristisch bei höchstem Feld (92.96 ppm). Eine Entscheidung zwischen C-5 (102.96 ppm) und C-10 (111.06 ppm) gelingt in Übereinstimmung mit den Überlegungen von Smith ⁴) auf Grund von Inkrementbetrachtungen und auch unter Berücksichtigung der Restkopplungen im SFORD-Experiment. Ähnliche Überlegungen führen zwanglos zur Zuordnung der Carbonylkohlenstoffatome (vgl. Tabelle 1) .

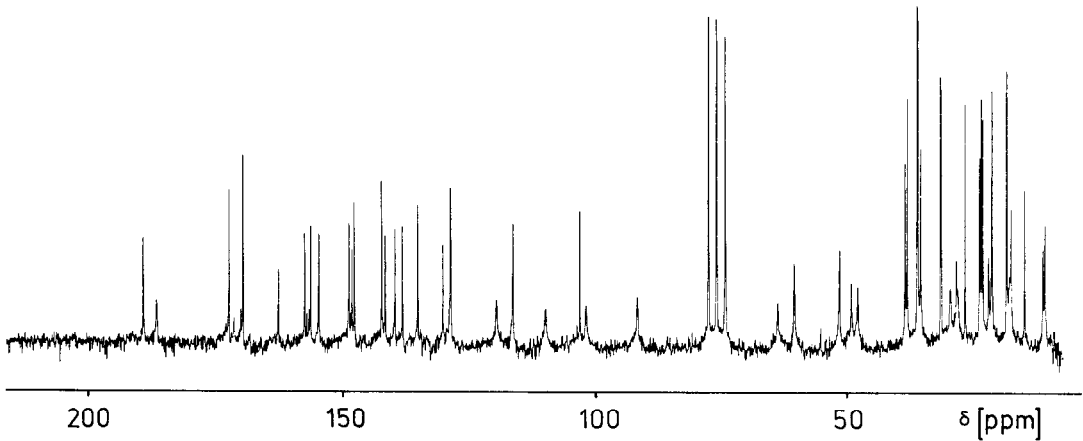
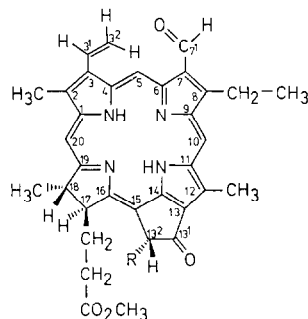
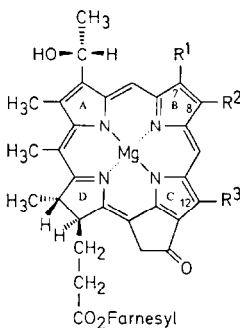


Abbildung 1. ^{13}C -NMR-Spektrum (natürliche Häufigkeit) von Chl b (2)
[0.1M in $\text{CDCl}_3(\text{H}_2\text{O})^{9,10}$, Bruker WP 80 DS].

Die Analyse der chemischen Verschiebungen der quartären Ringkohlenstoffatome und damit das Verständnis für das π -Elektronensystem des Macrocyclus muß als Hauptproblem der Arbeit angesehen werden. Im Zuge einer Vielzahl von Arbeiten auf dem Gebiet von metallfreien Chlorophyllderivaten^{6,11} ist es uns gelungen, ein Inkrementensystem für den Übergang von der Chl a- zur Chl b-Reihe zu entwickeln. Es basiert vor allem auf der Tatsache, daß die von uns sehr eingehend studierten Bacteriochlorophylle c (3)¹² und e (4)¹³ sich strukturell zueinander ebenso verhalten wie Chl a zu Chl b. Bei den beiden Pigmenten 3 und 4 ließen sich nämlich die vier C-Atome des Ringes B auf Grund folgender Tatsache eindeutig lokalisieren: Beide Tetrapyrrole treten als Gemische homologer und isomerer Verbindungen auf^{14,15}, die sich vor allem durch den Substituenten an C-8 (C_2H_5 , $n\text{-C}_3\text{H}_7$, $i\text{-C}_4\text{H}_9$) unterscheiden. Die unterschiedlichen Alkylgruppen bewirken allein lokale shifts. Da sich die verschiedenen Komponenten trennen lassen^{14,15}, geben sich durch Vergleich die quartären C-Atome des Ringes B ($\text{C}-6$, $\text{C}-7$, $\text{C}-8$, $\text{C}-9$) eindeutig zu erkennen, da sich praktisch im Tieffeldbereich nur ihre Absorptionslagen ändern. Die auf der Grundlage dieser Zusammenhänge und aus mehreren studierten $a \rightarrow b$ -Übergängen gewonnenen teilweise überraschenden Erkenntnisse des shifts aller vier quartären C-Atome des Ringes B lassen sich unter Verwendung



- | | | | | | |
|----------|------------------------------------|---|---|----------|--|
| <u>3</u> | Bchl c, $\text{R}^1 = \text{CH}_3$ | } | $\text{R}^2 = \text{C}_2\text{H}_5, n\text{-C}_3\text{H}_7, i\text{-C}_4\text{H}_9$ | <u>5</u> | Phäophorbid-b-methylester, $\text{R} = \text{CO}_2\text{CH}_3$ |
| <u>4</u> | Bchl e, $\text{R}^1 = \text{CHO}$ | } | $\text{R}^3 = \text{C}_2\text{H}_5, (\text{CH}_3)$ | <u>6</u> | Pyrophäophorbid-b-methylester, $\text{R} = \text{H}$ |

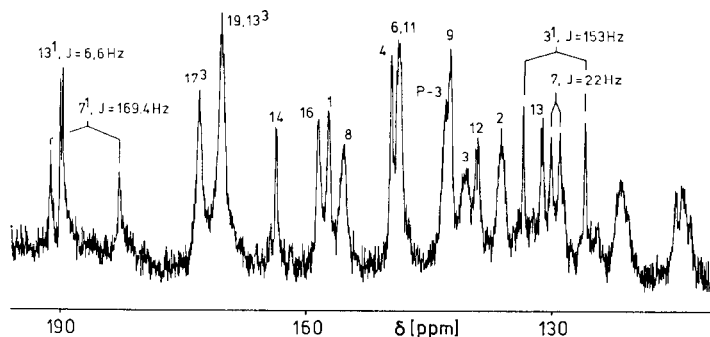


Abbildung 2. Tieffeldbereich des voll gekoppelten ^{13}C -NMR-Spektrums von Chl b (2) (0.1M, $\text{CDCl}_3(\text{H}_2\text{O})$, gated).

Tabelle 1 : ^{13}C -NMR-Daten in δ (ppm) [TMS als interner Standard].

C-Atom		Chl b (2) $\text{CDCl}_3(\text{H}_2\text{O})^{10)}$	Chl b (2) Aceton- d_6	Chl a (1) $\text{CDCl}_3(\text{H}_2\text{O})$	5 CDCl_3	6 CDCl_3
A	B					
13 ¹	9	190.26	190.62	190.45	189.52	195.64
7 ³	3a	187.66	187.69	10.96	187.12	187.01
17 ³	7c	173.55	173.42	173.69	173.37	173.45
13 ³	10a	170.79	171.05	170.47	169.48	—
19	18	170.79	171.46	169.10	173.99	173.07
14	16	163.90	164.38	162.21	150.81	149.91
16	17	158.71	159.70	155.68	164.15	162.98
1	11	157.51	157.54	155.27	143.51	142.89
8	4	155.87	155.79	144.80	158.80	158.14
4	12	149.85	150.05	149.15	136.93	136.43
6	13	149.23	149.45	153.25	150.73	150.13
11	15	148.76	149.45	147.64	137.87	137.56
9	14	142.64	143.41	146.49	146.80	146.25
3	2	140.72	141.06	139.61	137.56	137.01
12	5	139.28	138.87	134.71	132.20	131.02
2	1	136.24	136.98	135.78	132.20	131.79
13	6	131.27	132.78	129.38	129.74	129.95
7	3	129.71	131.22	134.06	132.47	132.09
3 ¹	2a	129.79	130.94	130.45	128.64	128.75
3 ²	2b	120.80	120.80	120.28	123.34	122.99
10	β	111.06	111.37	108.47	106.45	105.76
15	γ	104.20	105.96	104.18	105.08	105.63
5	α	102.96	103.59	100.32	101.25	100.62
20	δ	92.96	93.96	92.48	93.33	93.02
13 ²	10	64.96	65.91	64.60	64.73	47.92
13 ⁵	10b	52.76	52.84	52.35	52.98	—
17	7	50.46	51.45	49.50	51.58	52.02
18 ₁	8	49.22	50.03	49.31	50.27	50.11
17 ₁	7a	31.06	31.28	30.70	31.33	31.19
17 ₂	7b	29.74	30.18	29.36	29.82	29.71
18 ₁	8a	23.34	23.76	22.88	23.10	23.02
8 ₂	4a	19.18	19.55	19.60	18.56	18.53
8 ₂	4b	18.89	19.55	17.36	19.05	19.03
2 ₁	1a}	12.60	12.64	12.16	12.00	11.95
12 ₁	5a}	12.22	12.38	12.16	11.95	11.75
17 ⁵	7d	—	—	—	51.75	51.75

Die Resonanzlagen der Phytylsignale zeigen merkwürdige Unterschiede nur für P-1, P-2 und P-3, sie sind aber in ihrer Zuordnung unproblematisch ²⁾.

folgender grober Inkrementdaten relativ zwanglos auf den Chl a → Chl b-Übergang anwenden : C-6 (-4.4 ppm), C-7 (-4 ppm), C-8 (+13 ppm), C-9 (-4 ppm) . C-7 gibt sich zusätzlich in allen SFORD-Spektren der b-Reihe durch eine charakteristische Restkopplung mit dem Formylproton zu erkennen. Eine weitere wesentliche Information bietet die Analyse des voll gekoppelten Spektrums (gated, vgl. Abb.2), in dem die Fernkopplungen mit entsprechenden Protonen in der Regel bei den β-pyrrolischen C-Atomen zu deutlich stärker verbreiterten Signalen als bei den α-pyrrolischen Kohlenstoffatomen führen¹⁾. Die restlichen 10 quartären C-Atome erleiden beim Wechsel von der a- zur b-Reihe in allen untersuchten Verbindungen einen Tieffeldshift von 0 bis 3 ppm. Diese Tatsachen führen zwanglos und ohne Alternative zur Zuordnung von C-19 (170.79 ppm), C-16 (158.71 ppm), C-3 (140.72 ppm) und C-2 (136.24 ppm). Das gilt ebenso für C-14 (163.90 ppm) und C-13 (131.27 ppm), die sich aber zusätzlich im nicht entkoppelten Spektrum durch signifikante Fernkopplungen von 2.7 Hz bzw. 4.1 Hz mit dem Proton an C-13²⁾ zu erkennen geben. Da im gekoppelten Spektrum das Signal bei 157.51 ppm eindeutig von einem α-pyrrolischen C-Atom und das bei 155.87 ppm durch einen β-pyrrolischen Kohlenstoff erzeugt wird, gelingt auch die Entscheidung zwischen C-1 und C-8. Die drei nahe beieinanderliegenden Signale um 149 ppm ordnen wir auf Grund der chemischen Verschiebung (Inkrementdaten) und der Linienform im nicht entkoppelten Spektrum (Vergleich mit Derivaten der b-Reihe¹¹⁾) den C-Atomen C-4 (149.85 ppm), C-6 (149.23 ppm) und C-11 (148.76 ppm) zu¹⁶⁾. Die Entscheidung für C-12 bei 139.28 ppm fällt trotz des relativ starken Tieffeldshifts von 4.5 ppm wegen der charakteristischen Linienform im gekoppelten Spektrum nicht schwer.

LITERATUR

- 1) Unsere Arbeiten über das Chl a führten zu Ergebnissen, die praktisch den Zuordnungen von Hynninen entsprechen: S.Lötjönen und P.H.Hynninen, *Org.Mag.Reson.* 16, 304 (1981).
- 2) R.A.Goodman, E.Oldfield und A.Allerhand, *J.Amer.Chem.Soc.* 95, 7553 (1973).
- 3) S.G.Boxer, G.L.Closs und J.J.Katz, *J.Amer.Chem.Soc.* 96, 7058 (1974).
- 4) K.M.Smith und J.F.Unsworth, *Tetrahedron* 31, 367 (1975).
- 5) D.N.Lincoln, V.Wray, H.Brockmann und W.Trowitzsch, *J.Chem.Soc.Perkin II*, 1974, 1920.
- 6) V.Wray, U.Jürgens und H.Brockmann, *Tetrahedron* 35, 2275 (1979).
- 7) Wir bevorzugen die Nomenklatur der IUPAC (Spalte A in Tab.1) : R.Bonnet, *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 206, 745 (1973). Da sich in Arbeiten über ¹³C-NMR-Daten von Tetrapyrrolen diese Nomenklatur noch nicht durchgesetzt hat, wird in der Tabelle 1 zusätzlich auch die in Lit.1) verwendete und früher übliche Bezifferung angegeben (Spalte B).
- 8) C.E.Strouse, V.H.Kollman und N.A.Matwyoff, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 46, 328 (1972).
- 9) Die Aufarbeitung und Reindarstellung der Chlorophylle erfolgte nach den Vorschriften von : H.Reich, Dissertation Universität Bielefeld 1982.
- 10) Das Lösungsmittel CDCl₃ wurde mit dest. Wasser gesättigt und überschichtet, da sich dieses System auch für Untersuchungen der an C-13²⁾ einheitlichen Epimeren eignet. Das Spektrum von Chl b in Aceton-d₆ ist zum Vergleich ebenfalls angeführt.
- 11) N.Risch und H.Brockmann, Veröffentlichung in Vorbereitung.
- 12) H.Brockmann, U.Jürgens und M.Thomas, *Tetrahedron Lett.* 2133 (1979).
- 13) H.Brockmann, A.Gloe, N.Risch und W.Trowitzsch, *Liebigs Ann.Chem.* 1976, 566.
- 14) N.Risch, T.Kemmer und H.Brockmann, *Liebigs Ann.Chem.* 1978, 585.
- 15) T.Kemmer, H.Brockmann und N.Risch, *Z.Naturforsch.* 34b, 633 (1979).
- 16) Wir können nicht ganz ausschließen, daß die Zuordnung dieser drei Signale austauschbar ist, da im voll gekoppelten Spektrum die Signale wegen der starken Verbreiterung zum Teil übereinanderfallen.
(Received in Germany 27 September 1982)