

¹H-NMR- und ESR-Messungen zur Struktur der Dehydroascorbinsäure und des Semidehydroascorbatradikals

¹H-NMR- und ESR-Investigations on the Structures of Dehydroascorbic Acid and the Semidehydroascorbate Radical

Helmut Sapper, Anita Pleyer-Weber
und Wolfgang Lohmann

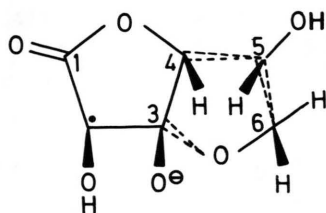
Institut für Biophysik der Justus-Liebig-Universität,
Leihgesterner Weg 217, D-6300 Gießen

Z. Naturforsch. **37c**, 129–131 (1982);
received October 7, 1981

Vitamin C, Semidehydroascorbate Radical, Acetylated
Ascorbic Acid, Side Chain Structure

By comparing proton and electron spin resonance spectra of twofold and single oxidized ascorbate and acetylated derivatives therefrom it can be concluded that semidehydroascorbate as well as dehydroascorbate are of bicyclic structure due to the formation of a furanose ring of their side chain.

Ascorbinsäure (Vitamin C, ASC) kann bekanntlich durch Oxidation in Dehydroascorbinsäure (DHA) überführt werden, mit dem zusammen es ein biologisch offenbar wichtiges Redoxpaar bildet. Der Vergleich der Protonenspinresonanzspektren beider Formen kann einen wichtigen Hinweis auf die Beteiligung der Seitenkette von ASC während oder als Folge der Oxidation geben [1]. Wie aus Tab. I zu ersehen, sind alle beobachteten Protonensignale von DHA (ASC oxidiert mit Jod) relativ zu denen von ASC zu tieferem Feld verschoben. Durch den nach der Oxidation elektronenarmen γ -Lactonring ist eine solche Tieffeldverschiebung verständlich; sie sollte jedoch längs einer freien Seitenkette, wie sie bei der Ascorbinsäure vorliegt, von H-4 über H-5 zu CH₂-6 abnehmen. Demgegenüber ist die Verschiebung aber bei CH₂-6 mit 0,41 ppm und bei H-5 mit 0,50 ppm größer als am H-4 (0,27 ppm). Dies bestätigt den von [1] aus der veränderten



Kopplungsstruktur im ¹H-NMR-Spektrum gezogenen Schluß auf eine von O-6 nach C-3 cyclisierte Seitenkette im hydratisierten Monomer von DHA.

Mit einer einfachen Substitution der Ascorbinsäure am O-6 sollte diese Doppelringstruktur von DHA verhindert werden können. Durch Erhitzen von ASC in Essigsäureanhydrid mit etwas KHSO₄ ist es möglich, ein 5.6-Diacetylascorbat (AcA) zu synthetisieren [2]. Die in der mit verdünnter NaOH neutralisierten Reaktionslösung zu beobachtenden Protonenresonanzen von AcA sind in Tab. I angegeben.

Der Einfluß der Acetylierung ist für das H-5 mit einer Tieffeldverschiebung von 1,48 ppm erwartungsgemäß am stärksten, da dieses Proton sowohl von der O-5- als auch von der O-6-Substitution her stark beeinflusst wird. Am CH₂-6 beobachtet man eine Tieffeldverschiebung von 0,66 ppm. Das H-4-Signal ist im 5.6-Diacetylderivat um 0,14 ppm zu höherem Feld verschoben (Tab. I), jedoch beobachtet man bedingt durch die Neutralisation der Lösung mit NaOH die Entstehung eines weiteren, unverschobenen H-4-Signals. Wegen der bei Erhöhung des pH-Wertes zunehmenden Reaktivität des O-2 (3) dürfte es sich dabei um die Resonanz des 2.5.6-Triacetylascorbats handeln. Eine hydrolytische Abspaltung der Substituenten äußert sich bei beiden beschriebenen Ascorbatderivaten im Auftreten neuer Komponenten aller Resonanzen, wobei letztendlich wieder das reine Ascorbinsäurespektrum entsteht. Da dies jedoch erst nach Tagen geschieht, kann man von einer ausreichenden Stabilität der entstandenen Acetylderivate ausgehen, wenn die Lösungen für die spektroskopischen Untersuchungen stets frisch angesetzt werden.

Die wie an der Ascorbinsäure jetzt am acetylierten Derivat vorgenommene Oxidation mit Jod zeigt eine von H-4 über H-5 zu CH₂-6 abnehmende

Tab. I. Beobachte chemische Verschiebungen (in ppm bezüglich $\delta_{\text{CH}_3(\text{Acetat})} = 2,03$) der H-4, H-5 und CH₂-6 Protonen von Ascorbinsäure (ASC) (Zuordnung siehe Fig. 1), Dehydroascorbinsäure (DHA), acetylierten Ascorbinsäure (AcA) und ihrer oxidierten Form (ox. AcA) (Acetatpuffer pH 6, 30 °C). $\Delta(1)$: Differenz zwischen der reduzierten und oxidierten Form; $\Delta(2)$: Differenz zwischen ASC und AcA.

	ASC	$\Delta(1)$	DHA	$\Delta(2)$	AcA	$\Delta(1)$	ox. AcA
H-4	5,20	0,27	5,47	-0,14	5,06	0,25	5,31
H-5	3,97	0,50	4,47	1,48	5,45	0,12	5,57
CH ₂ -6	3,73	0,41	4,14	0,66	4,93	0,10	4,49

Änderung der chemischen Verschiebung (ox. AcA, Tab. I), was im Gegensatz zu den für ASC selbst gefundenen Werten einer freien Seitenkette auch nach der Oxidation entspricht. So bestätigt sich die oben gemachte Annahme, daß eine relativ zu H-4 größere Änderung der chemischen Verschiebung am CH₂-6 bei der Oxidation am γ -Lactonring der Ascorbinsäure durch einen Ringverschluß von O-6 nach C-3 zu erklären ist.

Die der oxidierenden Form der Ascorbinsäure zugeschriebene Form stellt sich über Zwischen-

schritte ein, die im einzelnen noch nicht aufgeklärt sind. Insbesondere besteht der Oxidationsvorgang als Zweielektronenschritt aus zumindest zwei Teilreaktionen, da die Bildung eines Semidehydroascorbatradikals (SDA) mittels Elektronenspinresonanz (ESR) Untersuchungen nachweisbar ist [4, 5]. Das bisher nur pulsradiolytisch [6, 7] mit einer für die Zuordnung der Hyperfeinstruktur notwendigen Auflösung gemessene Radikalsignal kann man auch in einer sauerstoffgesättigten 1 M Lösung von Na-Ascorbat (pH 7, Raumtemperatur) beobachten (Fig. 1 a). Mit Hilfe der Doppelintegration des ESR-Spektrums und Eichung mit Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) ist die in der Meßlösung vorhandene Radikalkonzentration mit $0,7 \times 10^{-6}$ M abzuschätzen. Die Hyperfeinstruktur-Aufspaltungsparameter $a_{H-4} = 1,75 \times 10^{-4}$ T (Doublett), $a_{H-5} = 0,06 \times 10^{-4}$ T (Doublett) und $a_{CH_2-6} = 0,19 \times 10^{-4}$ T (Triplett) können in Übereinstimmung mit [6] den Kopplungen des Carbonyl-substituierten Semidions mit H-4, H-5 und CH₂-6 zugeordnet werden.

Die vergleichsweise große Hyperfeinaufspaltung durch CH₂-6 wird erst durch die in Fig. 1 dargestellte bicyclische Struktur des SDA-Radikals (analog zu der von DHA) verständlich. Die angegebene Zuordnung wird bestätigt durch das Spektrum des Radikals der am O-6 acetylierten Ascorbinsäure, welches nur eine nicht weiter auflösbare Doublett-Struktur (durch Kopplung mit H-4), aber keine Kopplung mit den CH₂-6-Protonen erkennen läßt (Fig. 1 b).

Die eigentliche Radikalbildung, welche eng mit den Positionen C-2 und C-3 des Moleküls verknüpft ist [8, 9], wird durch die Substitution nicht beeinflusst. Die nach Sauerstoffausschluß feststellbare Lebensdauer des Radikals (Beobachtung der Spinkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit) ist aber größer als beim SDA-Radikal, was darauf hinweist, daß dessen spezielle Seitenkettenstruktur vermutlich auch eine besondere Reaktivität bedingt.

Das Auftreten einer zweiten Spezies neben dem 5.6-Diacetyl-Derivat, bei dem es sich wie oben anhand der NMR-Daten geschlossen vermutlich um das 2.5.6-Triacetylascorbat handelt, verursacht eine Verdoppelung des beobachteten Spektrums (Fig. 1 b). Die HF-Aufspaltungen durch H-4 liegen mit $a_{H-4,1} = 1,74 \times 10^{-4}$ T und $a_{H-4,2} = 1,70 \times 10^{-4}$ T jedoch sehr nahe beieinander.

Die Resultate verdeutlichen, daß der aus den NMR-Ergebnissen am DHA postulierte Ringschluß

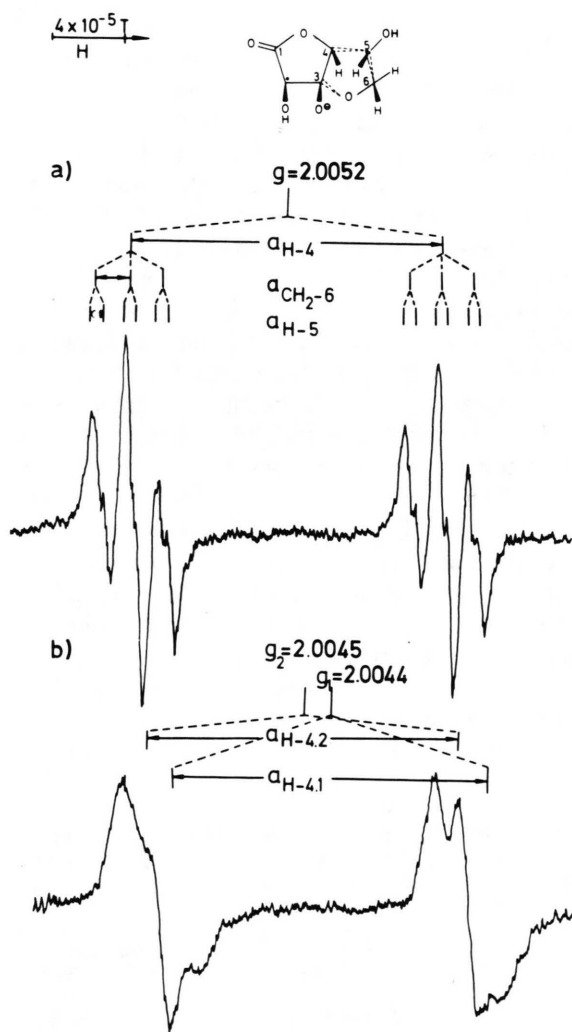


Fig. 1. ESR-Spektren und Aufspaltungsparameter der radikalischen Zwischenstufen bei der Oxidation von a) Ascorbinsäure; b) an O-6 acetylierten Ascorbinsäure-Derivaten.

bei der Oxidation von ASC auch in der radikalischen Zwischenstufe auftritt. Für die Spezifität der physiologischen Vitamin C Aktivität könnte somit gerade der bisher wenig beachteten Seitenkette eine wichtige Rolle zufallen.

Danksagungen

Die Arbeit ist Teil der Doktorarbeit von A. P. W. und wurde teilweise von Forschungsvorhaben des Bundesministeriums des Inneren und dem Fond der Chemischen Industrie unterstützt.

- [1] J. Hvoslef u. B. Pedersen, Acta Chem. Scand. **B 33**, 503–511 (1979).
- [2] A. Feldheim u. M. Czerny, Biochem. Z. **331**, 150–154 (1959).
- [3] B. M. Tolbert, M. Downing, R. W. Carlson, M. K. Knight u. E. M. Baker, Ann. NY. Acad. Sci. **258**, 48–68 (1980).
- [4] C. Lagercrantz, Acta Chem. Scand. **18**, 562 (1964).
- [5] G. v. Foerster, W. Weis u. H. J. Staudinger, Liebigs Ann. Chem. **690**, 166–169 (1965).

- [6] G. P. Laroff, R. W. Fessenden u. R. H. Schuler, J. Amer. Chem. Soc. **94**, 9062–9073 (1972).
- [7] R. W. Fessenden u. N. C. Verma, Biophys. J., 93–101 (1978).
- [8] H. Kluge, R. Rasch, B. Brux, H. Frunder, Biophys. Biochim. Acta **141**, 260–265 (1967).
- [9] M. Schöneshöfer, Z. Naturforsch. **27 b**, 649–659 (1972).