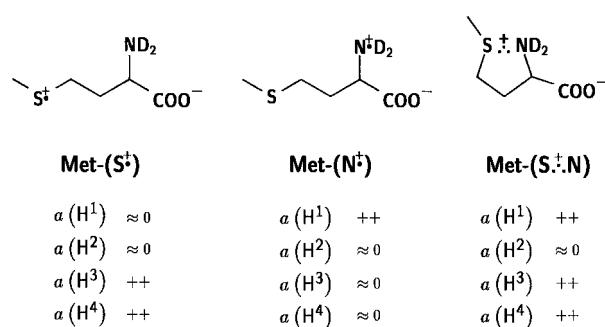


# CIDNP-spektroskopische Beobachtung von (S<sup>+</sup>·N)-Radikalkationen mit einer Zwei-Zentren-Drei-Elektronen-Bindung bei der Photooxidation von Methionin\*\*

Martin Goez,\* Jaroslaw Rozwadowski und Bronislaw Marciniak

Auf Untersuchungen der photo-<sup>[1]</sup> und strahlungsinduzierten Oxidationen<sup>[2]</sup> schwefelhaltiger Aminosäuren wurde beträchtliche Mühe verwendet.<sup>[3]</sup> Wesentliche Motivation dieser Studien waren und sind Vermutungen, daß die Reaktionen dieser Proteinbausteine eine wichtige Rolle für den „Long-range“-Elektronentransfer durch Zellmembranen<sup>[4a]</sup> und für die oxidative Schädigung von Zellkomponenten<sup>[4b]</sup> spielen.

Der Primärschritt der sensibilisierten Photoreaktionen ist eine photoinduzierte Elektronenübertragung von der Aminosäure auf den Sensibilisator;<sup>[1]</sup> die dabei entstehenden Radikalkationen sind auch frühe Intermediate bei den Pulsradiolyseexperimenten.<sup>[2]</sup> Aus UV/Vis-spektroskopischen Hinweisen wurde geschlossen,<sup>[1d, g, 2c-e]</sup> daß sich im Fall von Methionin Met und verwandten Verbindungen die primär gebildeten offenkettigen Radikalkationen durch Ausbildung cyclischer Strukturen Met-(S<sup>+</sup>·N) mit einer intramolekularen Zwei-Zentren-Drei-Elektronen(2z3e)-Bindung zwischen Schwefel und Stickstoff stabilisieren (Schema 1<sup>[5, 6]</sup>). Obwohl



Schema 1.

die (S<sup>+</sup>·N)-Spezies allgemein akzeptierte Intermediate dieser Reaktionen sind, existiert bis heute kein eindeutiger direkter Strukturbeweis durch Methoden, die auf die Spindichteverteilung ansprechen, d.h. magnetische Resonanztechniken. Einzige Ausnahme ist eine Untersuchung im festen Zustand, in der bei der Pulsradiolyse von Met in konzentrierten wäßrigen Lösungen von Lithiumhalogeniden unterhalb 160 K schlecht aufgelöste ESR-Spektren erhalten wurden,

die nur eine Aufspaltung durch <sup>14</sup>N zeigten.<sup>[7]</sup> Wir berichten hier über die erste Beobachtung der vom Methionin abgeleiteten (S<sup>+</sup>·N)-Spezies in flüssiger Phase mit magnetischer Resonanz.

ESR-Spektroskopie an diesen Radikalkationen wird durch die Tatsache erschwert, daß sie in flüssiger Lösung sehr kurzlebig sind. Messungen chemisch induzierter dynamischer Kernspinpolarisationen (CIDNP)<sup>[8]</sup> sind eine weitere Methode, um die Strukturen und Spindichteverteilungen radikalischer Intermediate zu untersuchen, die für die vorliegende Situation maßgeschneidert ist.

Die Polarisationen werden durch „Sortieren“ der Kernspins in Radikalpaaren erzeugt, was seinerseits vom Zusammenwirken kernspinabhängiger Interkombination (durch das Zusammenspiel von Zeeman- und Hyperfeinwechselwirkungen) und elektronenspinselektiver Reaktionen der Paare (Käfigrekombination ist im allgemeinen nur im Singulettzustand möglich) herrührt. Detektiert wird durch Aufnahme des NMR-Spektrums der diamagnetischen Reaktionsprodukte, in dem sich die Polarisationen als anomale Linienintensitäten manifestieren.

Die Effizienz des Spinsortierens ist um so größer, je größer die Hyperfeinkopplungskonstante  $a_i$  des jeweiligen Protons/Kerns ist. Daher spiegeln die relativen Polarisationsintensitäten der verschiedenen Protonen in den Produkten, das Polarisationsmuster,<sup>[9]</sup> die relativen Hyperfeinkopplungskonstanten in den Radikalen wider. Weil der Aufbau der Polarisationen nach der Lebenszeit der paramagnetischen Intermediate (Nanosekunden oder sogar kürzer) abgeschlossen ist, die Polarisationen aber in den diamagnetischen Produkten für die Spin-Gitter-Relaxationszeit  $T_1$  bestehen bleiben (Sekunden bei Protonen), kann man das Polarisationsmuster als eingefrorene Signatur der intermediären Radikale auffassen. Die CIDNP-Spektroskopie spricht daher auf schnellere Prozesse an als die ESR-Spektroskopie. Sie ist darüber hinaus in gewisser Weise nützlicher für die Charakterisierung radikalischer Intermediate, weil das CIDNP-Spektrum sofort eine Beziehung zwischen einem bestimmten Wert von  $a_i$  und einem bestimmten Kern  $i$  in den Produkten herstellt.

CIDNP-Spektren, wie sie bei den Photoreaktionen von Methionin Met mit 4-Carboxybenzophenon CB in D<sub>2</sub>O bei pH 5.8 und pH 12.2 auftreten, sind in Abbildung 1 gezeigt. Durch eine spezielle Pulssequenz<sup>[11]</sup> wurden die NMR-Signale aller unreaktiven Moleküle in der Probe eliminiert, so daß die Spektren nur reine CIDNP-Signale zeigen. Man sieht, daß H<sup>3</sup> und H<sup>4</sup> von Met, d.h. die dem Schwefel benachbarten Protonen, in beiden Experimenten starke Polarisationen tragen, während H<sup>1</sup>, das  $\alpha$ -Proton in Hinblick auf den Stickstoff, bei pH 5.8 unpolarisiert ist, bei pH 12.2 dagegen stark polarisiert. Bezogen auf gleiche Protonenzahlen (zwei äquivalente Protonen H<sup>3</sup> gegen ein Proton H<sup>1</sup>) ergibt sich aus der Integration der Signale ein Verhältnis  $P(\text{H}^1):P(\text{H}^3)$  der CIDNP-Intensitäten von etwa 1.3 im Grenzfall hoher pH-Werte. Bei mittlerem pH liegt das Polarisationsmuster zwischen beiden Extremen. Alle diese CIDNP-Signale erscheinen in Absorption. H<sup>2</sup> ( $\delta = 1.8-2.0$ , je nach pH) ist unpolarisiert. Aufgrund der Deprotonierung der Aminofunktion bei höherem pH (der  $pK_{a2}$ -Wert von Met in

[\*] Prof. Dr. M. Goez

Fachbereich Chemie der Universität Halle-Wittenberg  
Kurt-Mothes-Straße 2, D-06120 Halle/Saale  
Telefax: Int. + 345/5527229  
E-mail: goez@chemie.uni-halle.de

Dr. J. Rozwadowski, Prof. Dr. B. Marciniak  
Fakultät für Chemie, Universität Poznań  
Grunwaldzka 6, PL 60-780 Poznań (Polen)

[\*\*] Diese Arbeit wurde vom Deutschen Akademischen Auslandsdienst, der Volkswagenstiftung und dem Komitee für wissenschaftliche Forschung Polen (Projekt Nr. 2 P303 049 06) unterstützt.

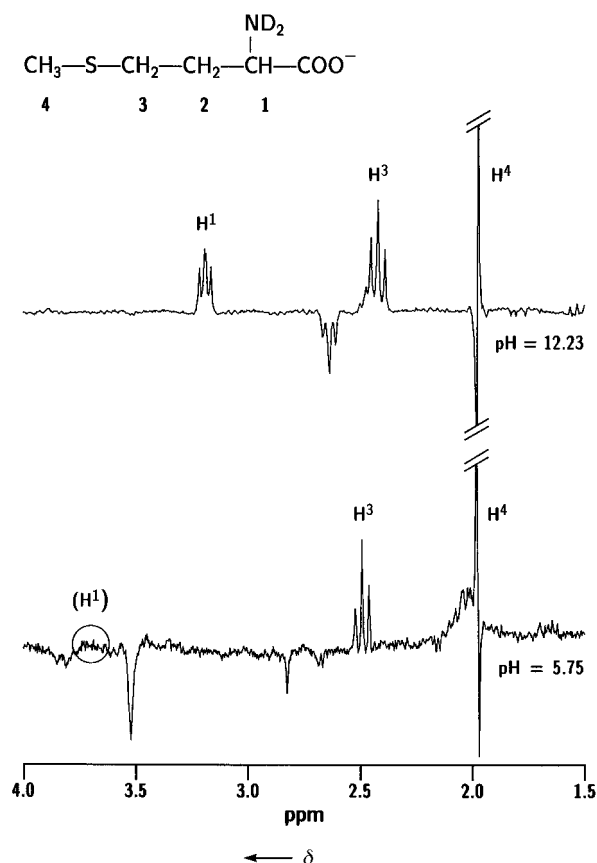
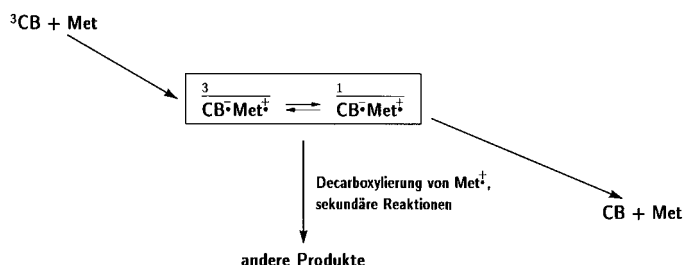


Abb. 1. Hintergrundfreie  $^1\text{H}$ -CIDNP-Spektren (250 MHz) während der Photoreaktionen von 4-Carboxybenzophenon mit Methionin in  $\text{D}_2\text{O}$  bei pH 5.75 (unten) und pH 12.23 (oben).<sup>[10]</sup> Nur der interessierende Spektralbereich ist dargestellt, und nur die Resonanzen der Methioninprotonen (vgl. die darüberstehende Formel)<sup>[6]</sup> wurden zugeordnet. Die Spektren sind bezüglich des Triplets von  $\text{H}^3$  normiert.

$\text{D}_2\text{O}$  wurde durch NMR-Titration zu  $9.65 \pm 0.09$  bestimmt) verschieben sich die Resonanzfrequenzen der Methioninprotonen, vor allem die von  $\text{H}^1$ , beträchtlich mit dem pH-Wert. Ein Vergleich mit den NMR-Signalen, die unter Lichtabschluß erhalten wurden, erlaubt jedoch, die angegebene Zuordnung zweifelsfrei zu treffen.

Der für die Polarisierungen des Substrates Met relevante Mechanismus ist in Schema 2 gezeigt. Der Triplettzustand  $^3\text{CB}$  des Sensibilisators wird durch Elektronentransfer<sup>[1]</sup> von



Schema 2.

Met gelöscht, was ein Triplettadikalpaar  $^3\text{CB}^\bullet + \text{Met}^\bullet$  ergibt. Die genaue Lokalisierung der ungepaarten Spindichte im Radikalkation  $\text{Met}^\bullet$  des Methionins (die drei Möglichkeiten,

das schwefelzentrierte Radikalkation  $\text{Met}(\text{S}^\bullet)$ , das stickstoffzentrierte Radikalkation  $\text{Met}(\text{N}^\bullet)$  und die Spezies mit der 2z3e-Bindung  $\text{Met}(\text{S}^\bullet\text{N})$  sind in Schema 1<sup>[5, 6]</sup> dargestellt) ist für den grundlegenden Mechanismus von Schema 2 unerheblich: In jedem Fall ist ein Elektronenrücktransfer nur für Singulettpaare  $^1\text{CB}^\bullet + \text{Met}^\bullet$  möglich, weil die Radikalpaare um  $18 \text{ kJ mol}^{-1}$  energetisch tiefer liegen als  $^3\text{CB}^\bullet$ <sup>[1e]</sup> und die Triplettenergie der Aminosäure noch höher ist als die des Sensibilisators.<sup>[1 f]</sup>

Decarboxylierung von  $\text{Met}^\bullet$  liefert schlußendlich andere Produkte, von denen einige spinpolarisiert sind (vergleiche die CIDNP-Spektren). Dieser Reaktionsweg kann aber nicht zu Met zurückführen. Daher werden alle Komplikationen, die auf die vielfältige sekundäre Chemie<sup>[1 d]</sup> dieses Systems zurückgehen, vermieden, wenn man nur die Polarisierungen der wiedergebildeten Ausgangsaminosäure Met analysiert.

Ein Vergleich mit Modellverbindungen<sup>[1 f]</sup> – *S*-Methylcystein, welches nur schwefelzentrierte Radikalkationen ausbildet, für  $\text{Met}(\text{S}^\bullet)$ , und Alanin, in dem das Radikalkation notwendigerweise stickstoffzentriert ist, für  $\text{Met}(\text{N}^\bullet)$  – zeigt, daß die *g*-Werte von  $\text{Met}(\text{S}^\bullet)$  wie auch von  $\text{Met}(\text{N}^\bullet)$  größer sein müssen als der *g*-Wert von  $\text{CB}^\bullet$ . Der *g*-Wert von  $\text{Met}(\text{S}^\bullet\text{N})$  (siehe auch Lit.<sup>[7]</sup>) muß aufgrund der im Vergleich zu  $\text{Met}(\text{N}^\bullet)$  stärkeren Spin-Bahn-Kopplung in der schwefelhaltigen verbrückten Spezies  $\text{Met}(\text{S}^\bullet\text{N})$  zwischen den *g*-Werten von  $\text{Met}(\text{S}^\bullet)$  und  $\text{Met}(\text{N}^\bullet)$  liegen und ist deshalb auch größer als der von  $\text{CB}^\bullet$ . Für jedes der drei vom Methionin abgeleiteten Radikalkationen müssen die nichtverschwindenden Protonenhyperfeinkopplungskonstanten positiv sein, weil sie durch Hyperkonjugation hervorgerufen werden;<sup>[12]</sup> für  $\text{Met}(\text{S}^\bullet)$  und  $\text{Met}(\text{N}^\bullet)$  wird das durch CIDNP-Experimente<sup>[1 f]</sup> an den zuvor erwähnten Modellverbindungen bestätigt. Nach der Kaptein-Regel<sup>[13]</sup> sind die Absorptionssignale, die für die Protonen von Met beobachtet werden, damit konsistent mit dem Reaktionsmechanismus von Schema 2 (Triplettvorläufer,  $\mu = +1$ ; Singulettreaktionsprodukt,  $\varepsilon = +1$ ;  $\Delta g > 0$ ; positive  $a_i$ -Werte).

Man erwartet eine vollkommen unterschiedliche Verteilung der Protonenhyperfeinkopplungskonstanten in  $\text{Met}(\text{S}^\bullet)$ ,  $\text{Met}(\text{N}^\bullet)$  und  $\text{Met}(\text{S}^\bullet\text{N})$ , wobei große Werte von  $a_i$  nur für jene Protonen auftreten sollten, die dem Radikalzentrum bzw. den Radikalzentren benachbart sind, d.h. für  $\text{H}^3$  und  $\text{H}^4$  in  $\text{Met}(\text{S}^\bullet)$ , für  $\text{H}^1$  in  $\text{Met}(\text{N}^\bullet)$  und sowohl für  $\text{H}^1$  als auch  $\text{H}^3$  und  $\text{H}^4$  in  $\text{Met}(\text{S}^\bullet\text{N})$  (vgl. Schema 1). Was  $\text{Met}(\text{S}^\bullet)$  und  $\text{Met}(\text{N}^\bullet)$  anbelangt, wird dies wiederum durch die CIDNP-Ergebnisse<sup>[1 f]</sup> für *S*-Methylcystein und Alanin gestützt.

Das Polarisationsmuster von Met bei pH 5.8 (Abb. 1, unten) ist daher ein klarer Hinweis, daß nur schwefelzentrierte Radikalkationen  $\text{Met}(\text{S}^\bullet)$  als Intermediate auftreten. Dies ist nicht verwunderlich, da unter diesen Bedingungen ( $\text{pK}_{\text{a}2} - \text{pH} \approx 3.9$ ) die Aminofunktion fast vollständig protoniert vorliegt, so daß sie nicht als Elektronendonator fungieren kann, weder bei der Löschung noch bei der Ausbildung einer 2z3e-Bindung. Im Gegensatz dazu könnte das Polarisationsmuster bei pH 12.2 (obere Kurve in Abb. 1), also etwa 2.7 Einheiten oberhalb  $\text{pK}_{\text{a}2}$ , entweder mit dem parallelen Auftreten von  $\text{Met}(\text{S}^\bullet)$  wie auch  $\text{Met}(\text{N}^\bullet)$  kompatibel sein, d.h. mit einer Löschung von  $^3\text{CB}$  durch Elektronentransfer sowohl vom Schwefel als auch vom Stickstoff, oder mit einer

Entstehung dieser Polarisationen in dem Radikalkation Met-(S<sup>+</sup>.N) mit der 2z3e-Bindung. Eine klare Entscheidung zwischen diesen Alternativen wird jedoch durch den Vergleich mit S-Methylcystein ermöglicht, bei welchem der Abstand zwischen Schwefel und Stickstoff um eine CH<sub>2</sub>-Einheit kürzer ist. Während diese Verkürzung keinen merklichen Einfluß auf die Redoxpotentiale des Schwefelzentrums und der Aminofunktion haben kann, weil diese Gruppen immer noch durch eine gesättigte C<sub>2</sub>-Kette isoliert sind, macht sie die Ausbildung einer (S<sup>+</sup>.N)-Spezies unmöglich, weil sich dazu ein viergliedriger Ring bilden müßte. Das Polarisationsmuster in der Photoreaktion von CB mit S-Methylcystein bei pH-Werten deutlich oberhalb pK<sub>a2</sub> der Aminosäure demonstriert eindeutig, daß die Löschung von <sup>3</sup>CB ausschließlich durch Elektronentransfer vom Schwefel erfolgt; Elektronentransfer vom Stickstoff partizipiert nicht in nachweisbarem Maß.<sup>[14]</sup> Dieser Befund schließt deshalb auch im Methioninsystem einen Elektronentransfer vom Stickstoff aus. Die Tatsache, daß die Geschwindigkeitskonstanten für die Löschung von <sup>3</sup>CB durch Met bei pH 6.8 und pH 11.5 nahezu identisch sind ( $2.6 \times 10^9$  gegenüber  $2.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )<sup>[14]</sup> untermauert dies zusätzlich. Das Polarisationsmuster des oberen Spektrums in Abbildung 1 muß daher auf das Radikal Met-(S<sup>+</sup>.N) des Methionins mit der 2z3e-Bindung zurückzuführen sein.

In unserem hohen Magnetfeld (5.9 T) und bei der ziemlich großen Differenz  $\Delta g$  für das beteiligte Radikalpaar besteht ungefähre Proportionalität zwischen der Polarisationsintensität und der Hyperfeinkopplungskonstante.<sup>[8]</sup> Weiterhin ist die Annahme vernünftig, daß die Bildung von Met-(S<sup>+</sup>.N) aus dem schwefelzentrierten Radikalkation Met-(S<sup>+</sup>) – welches das primäre von Methionin abgeleitete Radikal sein muß, nachdem im Grundzustand die Wechselwirkung zwischen den freien Elektronenpaaren am Schwefel und Stickstoff repulsiv ist – schnell auf der CIDNP-Zeitskala ist, weil diese Reaktion exergonisch und der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Zusammendiffusion der miteinander verbundenen Schwefel- und Stickstoffhälften des Moleküls ist. Unter diesen Bedingungen kann die Verteilung der ungepaarten Spindichte  $\rho$  im Radikalkation Met-(S<sup>+</sup>.N) aus dem Grenzwert des Verhältnisses  $P(\text{H}^1):P(\text{H}^3)$  der CIDNP-Intensitäten bei hohem pH-Wert mit McConnell-Beziehungen abgeschätzt werden.<sup>[12]</sup> Nimmt man das dimere Radikalkation des Tetrahydrothiophens ( $a(\text{H}^\alpha) = 0.93 \text{ mT}$ ;<sup>[14]</sup> dieser Wert muß verdoppelt werden, um ein Radikalkation zu beschreiben, bei dem  $\rho$  auf einem einzigen Schwefelatom lokalisiert ist) und das Radikalkation des N-Methylpyrrolidins (Mittelwert der Aufspaltung durch die Methylen- $\alpha$ -Protonen  $4.25 \text{ mT}$ )<sup>[15]</sup> als Modellverbindungen, erhält man, daß in der Spezies Met-(S<sup>+</sup>.N) mit der 2z3e-Bindung ungefähr ein Drittel der ungepaarten Spindichte vom Schwefel zum Stickstoff verschoben ist ( $\rho_{\text{S}}:\rho_{\text{N}} = 0.64:0.36$ ). Da berechnete Verhältnis ( $\rho_{\text{S}}:\rho_{\text{N}} = 0.74:0.26$ )<sup>[7]</sup> liegt etwas höher; wie aber die Autoren von Lit.<sup>[7]</sup> hervorhoben, unterschätzt die verwendete STO-3G\*-Methode die Spindichte am Stickstoff.

Eingegangen am 18. September 1997 [Z 10942]

**Stichwörter:** Aminosäuren • CIDNP-Spektroskopie • NMR-Spektroskopie • Photochemie • Radikationen

- [1] a) S. G. Cohen, S. Ojanpera, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 5633–5634; b) K. Bobrowski, B. Marciniak, G. L. Hug, *ibid.* **1992**, *114*, 10279–10288; c) B. Marciniak, K. Bobrowski, G. L. Hug, *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 11937–11943; d) K. Bobrowski, G. L. Hug, B. Marciniak, H. Kozubek, *ibid.* **1994**, *98*, 537–544; e) B. Marciniak, G. L. Hug, J. Rozwadowski, K. Bobrowski, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 127–134; f) M. Goetz, J. Rozwadowski, B. Marciniak, *ibid.* **1996**, *118*, 2882–2891; g) G. L. Hug, B. Marciniak, K. Bobrowski, *J. Photochem. Photobiol. A* **1996**, *95*, 81–88.
- [2] a) K.-O. Hiller, B. Masloch, M. Göbl, K.-D. Asmus, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 2734–2743; b) K.-O. Hiller, K.-D. Asmus, *J. Phys. Chem.* **1983**, *87*, 3682–3688; c) K.-D. Asmus, M. Göbl, K.-O. Hiller, S. Mahling, J. Mönig, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1985**, 641–646; d) K.-D. Asmus in Lit.<sup>[3]</sup>, S. 155–172, zit. Lit.; e) D. Pogocki, G. Burlinska, T. Wasowicz, J. Sadlo, K. Bobrowski, *Mol. Phys. Rep.* **1994**, *6*, 224–229.
- [3] *Sulfur-Centered Reactive Intermediates in Chemistry and Biology* (Hrsg.: C. Chatgililoglu, K.-D. Asmus), Plenum Press, New York, **1991**.
- [4] a) W. A. Prütz, in Lit.<sup>[3]</sup>, S. 389–399; b) C. Schöneich, K. Bobrowski, J. Holcman, K.-D. Asmus in *Oxidative Damage and Repair. Chemical, Biological, and Medical Aspects* (Hrsg.: K. E. J. Davies), Pergamon Press, New York, **1991**, S. 380–385.
- [5] Schema 1 zeigt die drei vom Methionin abgeleiteten Arten von Radikalkationen, das schwefelzentrierte Radikalkation Met-(S<sup>+</sup>), das stickstoffzentrierte Radikalkation Met-(N<sup>+</sup>) und das Radikalkation mit der 2z3e-Bindung Met-(S<sup>+</sup>.N). Unter der jeweiligen Strukturformel sind die Protonenhyperfeinkopplungskonstanten  $a$  schematisch angegeben. H<sup>1</sup> ist das Proton an dem Kohlenstoffatom, welches die Aminogruppe trägt (vgl. die Formel in Abb. 1).
- [6] Zur Vereinfachung wurden in Schema 1 und Abbildung 1 Protonierungsgleichgewichte weggelassen, d.h. Methionin und seine Radikalkationen wurden in ihrer deprotonierten Form gezeigt, die oberhalb des entsprechenden pK<sub>a2</sub>-Wertes vorliegt. Aufgrund von H/D-Austausch mit dem Lösungsmittel befinden sich bei unseren Experimenten direkt am Stickstoff keine Protonen, sondern nur Deuteronen.
- [7] M. H. Champagne, M. W. Mullins, A.-O. Colson, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 6487–6493.
- [8] a) *Chemically Induced Magnetic Polarization* (Hrsg.: L. T. Muus, P. W. Atkins, K. A. McLauchlan, J. B. Pedersen), Reidel, Dordrecht, **1977**; b) K. M. Salikhov, Yu. N. Molin, R. Z. Sagdeev, A. L. Buchachenko, *Spin Polarization and Magnetic Effects in Radical Reactions*, Elsevier, Amsterdam, **1984**.
- [9] a) H. D. Roth, M. L. Manion, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 6886–6888; b) H. D. Roth in Lit.<sup>[8a]</sup>, S. 53–61.
- [10] Andere experimentelle Parameter waren [CB] =  $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ , [Met] =  $2 \times 10^{-2} \text{ M}$ , pH-Wert eingestellt durch Zugabe von KOH und mit einer Glaselektrode gemessen, Raumtemperatur, Anregungswellenlänge 308 nm, zehn Laserblitze pro Akquisition, 16 Transienten pro Spektrum. Experimentelle Details zur CIDNP-Apparatur: siehe Lit.<sup>[11]</sup>. Die Methode zur Hintergrundunterdrückung ist in Lit.<sup>[11]</sup> beschrieben.
- [11] M. Goetz, *Chem. Phys. Lett.* **1992**, *188*, 451–456.
- [12] A. Carrington, A. D. McLachlan, *Introduction to Magnetic Resonance*, Harper & Row, New York, **1969**.
- [13] R. Kaptein, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1971**, 732–733.
- [14] B. C. Gilbert, D. K. C. Hodgeman, R. O. C. Norman, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1973**, 1748–1752.
- [15] R. W. Eastland, D. N. R. Rao, M. C. R. Symons, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1984**, 1551–1557.