

## 161. Struktur und Reaktivität von Xanthocorrinoiden

4. Mitteilung<sup>1)</sup>

### Hydroxylierung an C(15) des Corrin-Chromophors bei der Reaktion von Cyanocob(III)alamin mit *Udenfriend*-Reagenz

von Gerhard Holze und Albert Gossauer\*

Institut für Organische Chemie der Universität, Péroles, CH-1700 Freiburg

und Ludger Ernst

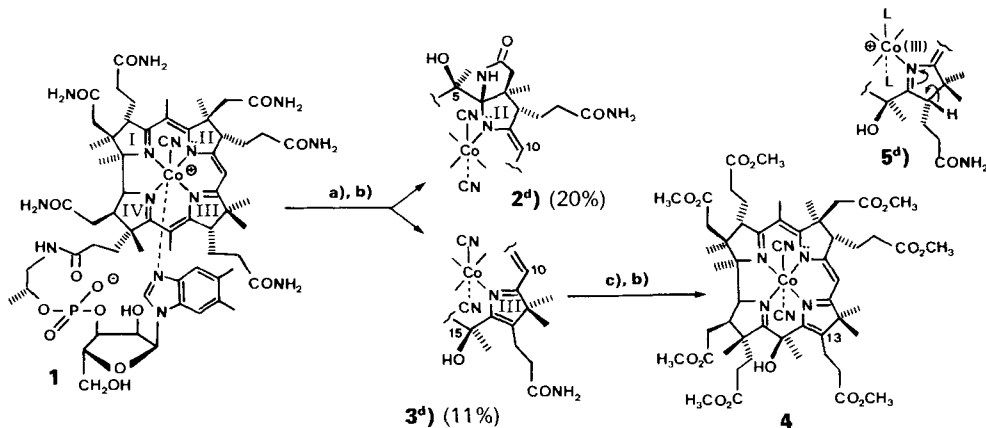
Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig-Stöckheim

(11.VII.86)

### Structure and Reactivity of Xanthocorrinoids. C(15) Hydroxylation of the Corrin Chromophore on Reaction of Cyanocob(III)alamin with *Udenfriend*'s Reagent

Hydroxy-corrinoid **4** represents a new type of corrin derivatives whose chromophore is identical with that of products formed on bacterial degradation of cyanocob(III)alamin (**1**). *In vitro*, **4** is obtained by O<sub>2</sub> oxidation of **1** in the presence of ascorbic acid and cupric ions.

Bei der Reaktion von Dicyanocobyrinsäure-heptamethylester und seinen Derivaten mit O<sub>2</sub> in Gegenwart von Ascorbinsäure (*Udenfriend*-Reagenz) waren bisher nur stabile gelbe Corrinoiden (Xanthocorrinoide) isoliert worden, deren Konstitution mit der Hydroxylierung an C(5) als primärem Reaktionsschritt im Einklang steht [1–3]. Unter



L = nicht spezifizierter anionischer Ligand.

- O<sub>2</sub>/Ascorbinsäure, CuSO<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O (pH 6,6), 80 min, 75°.
- KCN, 20°.
- 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/MeOH (v/v) 4 d, 80°.
- Der Übersichtlichkeit halber ist nur der Teil des Moleküls dargestellt, der nicht identisch mit Formel **1** ist.

<sup>1)</sup> 3. Mitteilung: s. [3].

gleichen Bedingungen liefert dagegen Cyanocob(III)alamin (**1**) neben dem Hydroxy-lactam **2**, das die für Xanthocorrinoide charakteristische Unterbrechung des konjugierten Polyazamethin-Systems an der C(5), C(6)-Bindung aufweist [4], ein orange-rotes Nebenprodukt, dessen analytische Daten im Einklang mit der Struktur **3** stehen. Letztere wurde insbesondere aus NMR-spektroskopischen Untersuchungen abgeleitet, die mit dem aus **3** durch Methanolyse erhaltenen, in aprotischen Lösungsmitteln gut löslichen Heptamethylester **4**<sup>2)</sup> durchgeführt wurden (Tab. 1). Konstitution und Konfiguration von **4** gehen aus <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H-NOE-Differenzmessungen [6] (Tab. 2) sowie zweidimensionaler <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H-(COSY) [7] und <sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H-Verschiebungskorrelation [7] eindeutig hervor.

Tab. 1. <sup>13</sup>C- und <sup>1</sup>H-NMR-Daten (CDCl<sub>3</sub>) von **4**

	$\delta_C$	$\delta_H^a)$	$\delta_H^b)$		$\delta_C$	$\delta_H^a)$
C(1)	83,4	–	1,48, 1,29	CH <sub>3</sub> –C(1)	20,2	1,48
C(2)	45,6	–	1,48, 1,29	CH <sub>3</sub> –C(2)	16,7	1,29
C(3)	56,07	3,71	–	CH <sub>3</sub> –C(5)	15,6	2,07
C(4)	173,82	–	2,07	CH <sub>3</sub> –C(7)	19,2	1,49
C(5)	96,0	–	2,07	CH <sub>3</sub> –C(12)	{24,5	1,20
C(6)	165,1	–	2,07, 1,49		{23,9	1,22
C(7)	49,5	–	1,49	CH <sub>3</sub> –C(15)	30,46	1,98
C(8)	52,7	3,16 <sup>c)</sup>	–	CH <sub>3</sub> –C(17)	18,5	1,41
C(9)	163,4	–	–	CH <sub>2</sub> –C(2)	41,3	2,68, 2,23 <sup>c)</sup>
C(10)	89,3	5,29	–	CH <sub>2</sub> –C(3)	25,1	2,15, 2,00
C(11)	179,6	–	1,23, 1,21	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> –C(3)	34,0	2,61, 2,49
C(12)	56,1	–	1,23, 1,21	CH <sub>2</sub> –C(7)	42,0	2,66, 2,38 <sup>c)</sup>
C(13)	132,8	–	1,23, 1,21	CH <sub>2</sub> –C(8)	26,2	2,02, 1,65
C(14)	146,9	–	1,98	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> –C(8)	31,5	2,54, 2,37
C(15)	75,9	–	1,98	CH <sub>2</sub> –C(13)	19,1	3,64, 2,47
C(16)	192,6	–	1,98, 1,41	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> –C(13)	30,7	2,91, 1,90
C(17)	61,8	–	1,41	CH <sub>2</sub> –C(17)	33,0	2,74, 2,62
C(18)	39,5	2,73	–	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> –C(17)	30,51	2,68, 2,31
C(19)	78,1	4,24 <sup>c)</sup>	–	CH <sub>2</sub> –C(18)	31,8	ca. 2,58
OH–C(15)	–	6,10	–	COOCH <sub>3</sub>	175,7, 173,78, 173,2, 172,7, 171,9, 171,5, 171,3	
				CH <sub>3</sub> O	52,4, 52,3, 51,9, 51,7 (2 C), 51,56, 51,50	

<sup>a)</sup> Über <sup>1</sup>J(C, H) mit  $\delta_C$  verknüpfte <sup>1</sup>H-NMR-Verschiebung.

<sup>b)</sup> Über <sup>n</sup>J(C, H) (n = 2 oder 3) mit  $\delta_C$  verknüpfte <sup>1</sup>H-NMR-Verschiebung.

<sup>c)</sup> Kopplungskonstanten: <sup>3</sup>J(H–C(18), H–C(19)) = 10,5 Hz, <sup>2</sup>J(CH<sub>2</sub>–C(2)) = 15,5 Hz, <sup>2</sup>J(CH<sub>2</sub>–C(7)) = 15,0 Hz, <sup>3</sup>J(H–C(8), CH<sub>2</sub>–C(8)) = 4,4 und 8,9 Hz.

Bei der <sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H-Verschiebungskorrelation wurde sowohl die Variante herangezogen, die von Korrelationen via <sup>1</sup>J(C, H) Gebrauch macht<sup>3)</sup>, als auch diejenige, die indirekte Verknüpfungen über <sup>2</sup>J(C, H) und <sup>3</sup>J(C, H) aufzeigt (COLOC) [9]. Aus Empfindlichkeitsgründen wurde das COLOC-Experiment auf die Untersuchung von Korrelationen zwischen quartären C-Atomen und C-Methylprotonen beschränkt, was jedoch für die eindeutige Struktur-

<sup>2)</sup> Dasselbe Produkt **4** wird durch Oxidation von Dicyanocobinamid (hergestellt nach [5]) und darauffolgende Methanolyse der Amid-Gruppen erhalten.

<sup>3)</sup> Variante mit Unterdrückung der H, H-Kopplungsmuster (ausser <sup>2</sup>J(H, H)) in der <sup>1</sup>H-Richtung der Datenmatrix, s. z. B. [8].

Tab. 2. Resultate der NOE-Differenzmessungen im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von 4

Gesättigte Resonanz	NOE beobachtet bei
CH <sub>3</sub> -C(2)	CH <sub>3</sub> -C(1), 1 H von CH <sub>2</sub> -C(3)
CH <sub>3</sub> -C(5)	CH <sub>3</sub> -C(7), 1 H von CH <sub>2</sub> -C(7)
H-C(8)	H-C(10), 1 H von CH <sub>2</sub> -C(7)
H-C(10)	H-C(8), (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> C(12)
CH <sub>3</sub> -C(15)	OH-C(15)
OH-C(15)	CH <sub>3</sub> -C(15), CH <sub>3</sub> -C(17)
CH <sub>3</sub> -C(17)	OH-C(15), CH <sub>2</sub> -C(18), H-C(19)
H-C(19)	1 H von CH <sub>2</sub> -C(2)

Ermittlung ausreichend war. Ausgangspunkt der Analyse ist das Signal von H-C(10) bei 5,29 ppm, das zweifelsfrei zuzuordnen ist. Mit diesem Signal sind die Resonanzen der 2 CH<sub>3</sub>-C(12) (1,21 und 1,23 ppm) über NOE verknüpft (Tab. 2). Dass eine neue Doppelbindung in Nachbarschaft zu den 2 CH<sub>3</sub>-C(12) steht, folgt aus der <sup>3</sup>J(C,H)-Korrelation zwischen CH<sub>3</sub>-C(12) und C(13) (132,8 ppm, d. h. sp<sup>2</sup>-hybridisiert). Die β-Orientierung von OH-C(15) ergibt sich aus dem NOE zwischen OH und CH<sub>3</sub>-C(17) (Tab. 2).

Da sowohl die UV/VIS-Absorption von 3 und 4 oberhalb von 300 nm als auch deren CD-Spektren übereinstimmen, kann eine Änderung der Konstitution sowie Konfiguration des Chromophors bei der Methanolyse des Heptamids 3 ausgeschlossen werden. Das Hydroxy-corrinoid 3 stellt einen neuen Typ von Corrin-Derivaten dar, dessen Chromophor nunmehr mit demjenigen von Produkten, die aus Cyanocobalamin in Kulturen von *Aerobacter aerogenes* [10] bzw. *Pseudomonas rubescens* [11] gebildet werden, identifiziert worden ist [12]. Die Bildung von 3 *in vitro* kann analog derjenigen von Xanthocorrinoiden erklärt werden (vgl. [2]). Offenbar stabilisiert sich jedoch das durch Hydroxylierung an C(15) gebildete kationische Zwischenprodukt 5 auf keinem der Wege, die zur Bildung von Xanthocorrinoiden führen [2] [3], sondern durch Deprotonierung an C(13). Bemerkenswert ist die Stabilität der allylischen OH-Gruppe von 3 unter den angewandten Veresterungsbedingungen.

Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung unterstützt (Projekt Nr. 2.436.0.84).

### Experimenteller Teil

Allgemeines. S. [2].

(15 R)-Cox, Cob-Dicyano-13-dehydro-15-hydro-15-hydroxycob(III)alamin (3). Eine Lsg. von 250 mg Cyanocob(III)alamin in 250 ml dest. H<sub>2</sub>O wird mit 5 g Ascorbinsäure, 6,2 g KHCO<sub>3</sub> und 5 mg CuSO<sub>4</sub> versetzt. Das Gemisch wird 80 min unter ständigem Durchleiten von Luft bei 75° erhitzt. Die abgekühlte Lsg., deren pH-Wert während der Reaktion von 6,6 auf ca. 8,5 gestiegen ist, wird angesäuert (pH ca. 4) und an *Servachrom XAD-2* (100–200 μm, *Serva GmbH & Co.*, Heidelberg) chromatographiert. Nach Elution mit dest. H<sub>2</sub>O wird das Farbstoffgemisch mit MeOH desorbiert und anschliessend durch aufeinanderfolgende Chromatographie an Kieselgel 60 (*E. Merck*, Darmstadt) mit KCN-haltigen (0,1%) H<sub>2</sub>O/MeOH/2-BuOH/AcOH 33:33:33:1 und i-PrOH/*sec*-BuOH/1,5M wässr. NH<sub>3</sub> 55:25:20 aufgetrennt. Neben 118 mg (47%) Edukt erhält man 51 mg (20%) 2 und 27 mg (11%) 3. UV/VIS: 523 (4,07), 500 (4,06), 343 (4,05), 333 (sh, 3,96); Nucleotid-Chromophor (nicht an Co gebunden [13]): 288 (3,81), 278 (3,85). CD (8,57 · 10<sup>-5</sup>M): 627 (0), 540 (13 863), 522 (0), 497 (sh, -26 185), 478 (-40 818), 405 (0), 382 (4621), 345 (43 513), 306 (2310), 294 (0), 272 (-16 943), 263 (0).

(15 R)-Cox, Cob-Dicyano-13-dehydro-15-hydro-15-hydroxycobyrinsäure-heptamethylester (4). Eine Lsg. von 3 (100 mg) in 25 ml 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/MeOH wird unter N<sub>2</sub> 4 d lang bei 80° erhitzt. Das Gemisch wird mit 50 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> verdünnt, mit 10% wässr. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. und mit 2% wässr. KCN-Lsg. nacheinander geschüttelt und mit dest.

H<sub>2</sub>O gewaschen. Nach Entfernung des Lsgm. werden aus dem Rückstand durch präp. DC an Kieselgel 60 (E. Merck, Darmstadt) mit KCN-haltigem (0,1%) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 96:4 61 mg (77%) **4** erhalten. UV/VIS: 523 (4,03), 504 (4,03), 343 (4,02), 332 (sh, 3,90). CD (1,09 · 10<sup>-4</sup>M): 635 (0), 543 (9734), 526 (0), 478 (-32243), 410 (0), 390 (9125), 379 (7909), 345 (41368), 297 (4563), 283 (0), 274 (-4623), 265 (0). FAB-MS ((2-Nitrophenyl)-octyl-ether): 1106 (74), 1105 (69, [M + 1]<sup>+</sup>), 1082 (66), 1081 (76), 1080 (100), 1054 (24), 1049 (25), 1021 (17).

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] A. Gossauer, B. Grüning, L. Ernst, W. Becker, W.S. Sheldrick, *Angew. Chem.* **1977**, *89*, 486; *ibid. Int. Ed.* **1977**, *16*, 481.
- [2] B. Grüning, G. Holze, T.A. Jenny, P. Nesvadba, A. Gossauer, L. Ernst, W.S. Sheldrick, *Helv. Chim. Acta* **1985**, *68*, 1754.
- [3] B. Grüning, G. Holze, A. Gossauer, L. Ernst, *Helv. Chim. Acta* **1985**, *68*, 1771.
- [4] B. Grüning, A. Gossauer, in 'Vitamin B<sub>12</sub>', Eds. B. Zagalak und W. Friedrich, Walter de Gruyter, Berlin, 1979, S. 141ff.
- [5] W. Friedrich, K. Bernhauer, *Chem. Ber.* **1956**, *89*, 2507; *ibid.* **1957**, *90*, 465.
- [6] Übersicht: J.K.M. Sanders, J.D. Mersh, *Progr. Nucl. Magn. Reson.* **1982**, *15*, 353.
- [7] Übersicht: R. Benn, H. Günther, *Angew. Chem.* **1983**, *95*, 381; *ibid. Int. Ed.* **1983**, *22*, 381.
- [8] V. Rutar, *J. Magn. Reson.* **1984**, *58*, 306.
- [9] H. Kessler, C. Griesinger, J. Lutz, *Angew. Chem.* **1984**, *96*, 434; *ibid. Int. Ed.* **1984**, *23*, 444.
- [10] K. Helgeland, J. Jonsen, S. Laland, *J. Biochem.* **1961**, *81*, 260.
- [11] R. C. Burgus, J. B. Hufham, W. M. Scott, J. J. Pfiffner, *J. Bacteriol.* **1964**, *88*, 1139.
- [12] D. Arnold, A. Gossauer, unveröffentlicht.
- [13] G. H. Beaven, E. R. Holiday, E. A. Johnson, B. Ellis, V. Petrow, *J. Pharm. Pharmacol.* **1950**, *2*, 944.