

Partialsynthese von Adenosyl-corrinoiden und dem 1.N⁶-Äthen-adenosyl-cobalamin mit fluoreszierendem Nucleosidanteil

Partial Synthesis of Adenosylcorrinoids and of 1,N⁶-Etheno-Adenosylcobalamin with a Fluorescent Nucleoside

M. Moskopididis und W. Friedrich

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Hamburg

(Z. Naturforsch. **30 c**, 460–465 [1975]; eingegangen am 26. März 1975)

Herrn Prof. Dr. K. Bernhauer zum 75. Geburtstag gewidmet

Vitamin B₁₂, Ethenoadenosylcobalamin, Adenosylcobalamin, Adenosylcobinamide Phosphate, Adenosyl Factor I b

Adenosylcobalamin und several analogs of this corrinoid are prepared by an improved method and separated by an one-step-chromatography on columns of carboxymethylcellulose. Pure water is the eluting agent. The same method is suitable for the preparation of 1,N⁶-ethenoadenosylcobalamin, a corrinoid with fluorescent nucleoside.

Den bisher beschriebenen Wegen zur Herstellung von Adenosylcobalamin und seinen zahlreichen Nucleosidanaloga ist gemeinsam, daß sie von den stark nucleophilen Kobalt(I)-corrinoiden und von an C-5' aktivierten Nucleosiden ausgehen^{1–3}.

Von besonderer Bedeutung sind Verfahren, die der Synthese von Adenosyl-corrinoiden dienen. Sie sind natürlich zumeist auch bei der Synthese von Nucleosidanaloga der Corrinoiden anwendbar. Die wichtigeren Verfahren werden nachfolgend kurz besprochen (vgl. auch Tab. I).

Man verwendete zunächst weitaus überwiegend das 2'.3'-Isopropyliden-5'-tosyladenosin als „aktives Adenosin“. Diese Methode hat den Nachteil, daß die Abspaltung der Isopropylidengruppe vom fertigen Corrinoid Bedingungen (z. B. 0,1 N HCl bei 90 °C während 15 min) erfordert, unter denen beträchtliche Mengen an Hydrolyseprodukten gebildet werden (s. w. u.). Ähnliche Nachteile dürften dem 2'.3'-Diacetyl-5'-tosyladenosin⁴ anhaften.

Um die destruktive Säurehydrolyse zu umgehen, verwendeten Morley u. Hogenkamp⁵ das 2'.3'-p-Anisyliden-5'-tosyladenosin. Die Anisylidengruppe läßt sich durch relativ milde Säurehydrolyse vom Corrinoid entfernen unter Bildung von nur „Spuren“ an Nebenprodukten⁵; sie ist etwa zehnmal säurelabiler als die Isopropylidengruppe⁶.

Direkte Tosylierung des ungeschützten Adenosins und Umsetzung von B_{12s} mit rohem 5'-Tosyladenosin brachte bescheidene Ausbeuten an Adenosyl-

cobalamin⁷. Bei dieser Methode registrierten allerdings Zagalak u. Pawelkiewicz⁸ eine Ausbeute von 40–50% Adenosylcobalamin, ausgehend vom Cyano-cobalamin. Später benutzte man zur Partialsynthese von Adenosyl-corrinoiden ein aus 5'-Tosyladenosin-2'.3'-cyclocarbonat hergestelltes 5'-Tosyladenosin-Konzentrat⁹ bzw. aus 2'.3'-p-Dimethylaminobenzyliden-5'-tosyladenosin hergestelltes reines 5'-Tosyladenosin¹⁰. Kürzlich adenosylierten Schlecht u. Müller¹¹ an Sepharose gebundenes Kobalt(I)-cobalamin mit 5'-Tosyladenosin^{11a}, welches durch Säurehydrolyse des 2'.3'-Isopropyliden-5'-tosyladenosins hergestellt worden war. Heute ist reines, stabiles 5'-Tosyladenosin allgemein zugänglich¹².

Schneider u. Friedmann¹³ verwendeten 5'-Jod-5'-desoxyadenosin zur Darstellung von Adenosylcobalamin-5'-phosphat, ausgehend vom Cyanocobalamin-5'-phosphat. Erwähnenswert ist ferner die Verwendung an C-5' chlorierter Derivate des Adenosins¹⁴.

Als Nebenprodukte der Adenosylierungsreaktionen treten stets „stabile gelbe Corrinoiden“ auf. Sie enthalten wahrscheinlich einen veränderten Corrinring¹. Weitere Nebenprodukte der Adenosylierung (ausgehend vom 2'.3'-Isopropyliden-5'-tosyladenosin) sind Aquacobalamin^{4, 14a} und Adenosylcobalamincarbonsäure (diese bis etwa 13%)^{15–17}. Die letzte ist auf die Einwirkung von Mineralsäure bei der Abspaltung der Isopropylidengruppe zurückzuführen. Zagalak u. Pawelkiewicz¹⁸ berichten über die Bildung von 20–30% Nebenprodukten der Adenosylierung.

Zur Reinigung der Reaktionsprodukte dienen vor allem chromatographische Methoden unter Verwendung von ungepufferter CM-Cellulose^{4, 10, 19–22},

Sonderdruckanforderungen an Dr. M. Moskopididis oder an Prof. Dr. W. Friedrich, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität, D-2000 Hamburg 13, Grindelallee 117, 4. Stock.

DEAE-Cellulose^{4, 19}, P-Cellulose⁹, Dowex-50^{5, 6, 15} und Sephadex G-15¹⁶. Zumeist erforderte die Reinigung mehrfache Chromatographie. Dowex-50 (gepuffert auf pH 3) erlaubt die Abtrennung des Aqua-cobalamins und der Adenosyl-cobalamincarbonsäure vom gebildeten Adenosyl-cobalamin, es erfordert jedoch anschließende Entsalzung mittels Phenolextraktion⁶. Ungepufferte CM-Cellulose bindet das Adenosyl-cobalamin relativ stark und für seine Elution muß 2-prozentige Essigsäure verwendet werden. Danach folgt erneute Phenolextraktion. Sephadex G-15 trennt Aqua-cobalamin und wahrscheinlich auch Adenosyl-cobalamincarbonsäure nur partiell vom Adenosyl-cobalamin ab. Amberlite XAD-2 trennt Adenosyl-cobalamin vom Aqua-cobalamin in Gegenwart von Essigsäure und *tert*-Butanol sehr gut^{22a}; seine Eignung zur Trennung der Produkte der Synthese von Adenosyl-cobalamin wurde anscheinend noch nicht näher untersucht.

Hier wird eine verbesserte chromatographische Trennung einiger Corrinoiden – nach erfolgter Reaktion zwischen Kobalt(I)-corrinoid und aktiviertem Nucleosid – beschrieben. Zur vollständigen Trennung und Reinigung genügt eine einmalige Chromatographie an gepufferter bzw. ungepufferter CM-Cellulosesäule unter Verwendung von Wasser als Eluens.

Wir beschreiben ferner die Synthese und einige Eigenschaften eines neuen Analogons des Adenosyl-cobalamins mit dem stark fluoreszierenden 1.N⁶-Äthenadenosin als Nucleosidanteil.

Experimenteller Teil

Schmelzpunktbestimmungen wurden mit Kofler-Mikroheiztisch durchgeführt.

Papierchromatographie. Papier Schleicher u. Schüll 2043 a, aufsteigende Arbeitsweise. Entwickler (in Vol.): 1, *sec*-Butanol/Wasser = 70/30; 2, *sec*-Butanol/Wasser/Eisessig = 70/30/1; 3, *sec*-Butanol/Wasser/25% NH₃ = 50/18/7; 4, Äthanol/Wasser = 70/30; 5, Äthanol/Wasser/25% NH₃ = 20/1/4; 6, *n*-Butanol/Wasser/Eisessig = 50/30/20; 7, *tert*-Butanol/Wasser/Eisessig = 50/40/10; 8, Isopropanol/Wasser/25% NH₃ = 85/15/1,3; 9, *sec*-Butanol/Wasser/Ameisensäure = 30/10/10; 10, *sec*-Butanol/Wasser/Monochloressigsäure = 70/30/1.

Reagenzien. Chloracetaldehyd (50-prozentige wäßrige Lösung von Fluka, Schweiz) wurde vor Gebrauch durch Destillation gereinigt und anschließend mit Natronlauge auf pH 4,5 gebracht; es resultierte eine etwa 40-prozentige Lösung. 2'.3'-Iso-

propyridenadenosin, Adenosin und 5'-Tosyladenosin „zur Analyse“ von Pharma Waldhof. Tosylchlorid „zur Synthese“ von E. Merck, Darmstadt.

2'.3'-Isopropyliden-1.N⁶-äthenadenosin. 1842 mg (6 mmol) Isopropylidenadenosin werden in einem 100 ml fassenden Rundkolben mit 40 ml Chloracetaldehydlösung versetzt und bei 37 °C während 24 Stunden unter Rührung erhitzt. Während der ersten 8 Reaktionsstunden pH-Kontrollen der klaren (zunächst farblosen, später gelben) Lösung durch laufenden Zusatz von 0,5 N NaOH. Nach Reaktionsende Einengen im Vakuum bis zur Trockne, Nachtrocknen des braunen Rückstandes im Vakuum über P₂O₅, Entsalzung durch Chloroformextraktion, Trocknen der Chloroformlösung über Na₂SO₄ und Einengen bis zur Trockne im Vakuum. Zur weiteren Reinigung wird der Rückstand in 15 ml Äthanol/Wasser (10/10) aufgenommen und an einer Säule (3 × 19 cm) aus Amberlite IRP-64-H adsorbiert. Waschen der Säule zunächst mit 15 ml Äthanol/Wasser (10/10), dann mit 1 l Wasser, Elution des stark fluoreszierenden Produktes mit 1 l Äthanol/Wasser (10/10) und Einengen bis zur Trockne. Ein Zusatz von etwas Äthanol führt zur raschen Kristallisation. Umkristallisieren aus Äthanol ergibt farblose, feine Nadeln vom Schmelzpunkt 174–176 °C (Zers.). Ausbeute 1050 mg. Die Substanz fluoresziert blau im UV-Licht.

2'.3'-Isopropyliden-5'-tosyl-1.N⁶-äthenadenosin. 494 mg (1,4 mmol) 2'.3'-Isopropyliden-1.N⁶-äthenadenosin werden in einem Schliffrohr im Hochvakuum bei 105 °C getrocknet und mit 300 mg (1,575 mmol) *p*-Toluolsulfonylchlorid in 5 ml trockenem Pyridin versetzt. Die Lösung wird mit Eiswasser gekühlt, geschüttelt, dann bei 25 °C während 20 Stunden stehengelassen und bis zur Trockne eingengt. Es folgen nun: Extraktion des Rückstandes mit einer eiskalten Mischung aus 10 ml Chloroform und 15 ml 3 N H₂SO₄, Waschen der Chloroformphase zunächst mit 15 ml 3 N H₂SO₄, dann mit 20 ml Wasser und schließlich mit 20 ml gesättigter NaHCO₃-Lösung, Filtration und Einengen bis zur Trockne. Der Rückstand wird in 4 ml Chloroform gelöst und unter ständigem Rühren tropfenweise zu 200 ml Petroläther (Siedepunkt 50–70 °C) zugegeben. Der sofort gebildete kristalline Niederschlag wird zweimal mit 100 ml Petroläther gewaschen und im Vakuum getrocknet. Farblose Mikrokristalle vom Schmelzpunkt 108–110 °C (Zers.), Ausbeute 388 mg.

Adenosyl-cobalamin aus Aqua-cobalamin. In einem 50 ml fassenden Meßkolben werden 1 g NH₄Cl, 1 g Zinkpulver und 32 mg Aqua-cobalamin in 10 ml Wasser unter Eiskühlung während 20 min mit Wasserstoff begast und mit 100 mg 5'-Tosyl-

adenosin, gelöst in 2 ml Dimethylformamid, versetzt. Nach weiteren 15 min Wasserstoffdurchleitung wird das Zinkpulver abfiltriert und die Corrinoidlösung der Phenolextraktion unterworfen. Zur Reinigung und Trennung des gebildeten Adenosyl-cobalamins dient eine mit etwa 0,05 M Natriumacetat auf pH 4,4 eingestellte CM-Cellulosesäule ($2,9 \times 21$ cm). Beim Entwickeln mit Wasser wandert zunächst eine orangerote schwache Vorzone, gefolgt von der Zone des Adenosyl-cobalamins (Ausbeute 26 mg, entsprechend 71% der Theorie). Im oberen Säulenteil verbleiben nicht-umgesetztes Aqua-cobalamin und einige Nebenprodukte.

Adenosyl-cobalamin aus Cyano-cobalamin. Bei Einhaltung der gleichen Arbeitsweise (s. oben) war die Ausbeute an Adenosyl-cobalamin nur etwa 30%. Sie wurde auf etwa 50% erhöht, wenn beim Durchleiten von Wasserstoff während der ersten 20 min (vor der Zugabe des 5'-Tosyladenosins) die Temperatur von 50 °C eingehalten wurde (wirksamere Entfernung der Blausäure). Nach anschließender Kühlung wurde wie oben gearbeitet. Außer Adenosyl-cobalamin wurden gewonnen: Cyano-cobalamin (17%), Aqua-cobalamin (13%) und „stabile gelbe Corrinoid“ (15%).

Adenosyl-cobinamidphosphat aus Cyano-aqua-cobinamidphosphat. Arbeitsweise wie bei der Darstellung von Adenosyl-cobalamin aus Aqua-cobalamin, mit dem Unterschied, daß hier eine ungepufferte CM-Cellulosesäule ($2,8 \times 14$ cm für 66 mg Cyano-aqua-corrinoid) verwendet wurde. Beim Entwickeln mit Wasser wandert nicht-umgesetztes Cobinamidphosphat mit der Lösungsmittelfront. Adenosyl-cobinamidphosphat bewegt sich langsam und wird in reiner Form gewonnen. Im oberen Säulenteil verbleibt etwas Diaqua-cobinamidphosphat. Ausgehend von 66 mg Cyano-aqua-cobinamidphosphat erhält man 38 mg Adenosyl-cobinamidphosphat, was einer Ausbeute von 58% entspricht.

Adenosyl-Faktor Ib wird ähnlich wie Adenosyl-cobinamidphosphat dargestellt, die zuletzt genannte Substanz bewegt sich jedoch etwas langsamer während der Chromatographie. Ausgehend von 56 mg Cyano-aqua-Faktor Ib erhielt man 35,8 mg Adenosyl-Faktor Ib, was einer Ausbeute von 64% entspricht.

Isopropyliden-1.N⁶-äthenadenosyl-cobalamin. Man arbeitete ähnlich wie bei der Herstellung von Adenosyl-cobalamin aus Aqua-cobalamin, zur Chromatographie wurde allerdings eine ungepufferte CM-Cellulosesäule verwendet. Ausgehend von 40 mg Aqua-cobalamin und 100 mg 2'-3'-Isopropyliden-5'-tosyl-1.N⁶-äthenadenosin erhielt man 33 mg Isopropyliden-1.N⁶-äthenadenosyl-cobalamin (Ausbeute 70%).

1.N⁶-Äthenadenosyl-cobalamin. 33 mg Isopropyliden-1.N⁶-äthenadenosyl-cobalamin werden in einem 50 ml fassenden Rundkolben mit 15 ml 0,1 N HCl versetzt und während 20 min auf 90 °C erhitzt. Es folgen nun: rasches Kühlen mit Eiswasser, Neutralisation mit 15 ml 0,1 N NaOH, Phenolextraktion und Chromatographie an einer gepufferten (pH 4,4) CM-Cellulosesäule ($2,8 \times 19$ cm). Beim Entwickeln mit Wasser bewegen sich in der Säule zwei starke Zonen: die erste, schnelle, besteht aus etwa 10 mg 1.N⁶-Äthenadenosyl-cobalamincarbonsäuren (davon 75% Mono- und 25% Dicarbonsäure), die zweite, langsamere, aus etwa 15 mg 1.N⁶-Äthenadenosyl-cobalamin (Ausbeute 40%).

Dieses hat folgende Absorptionsmaxima (in nm) in Wasser: 258 (Schulter), 266, 277, 290, 315, 338, 378, 525 und in 0,05 N HCl: 264, 274, 286, 305, 382, 460 (s. auch Abb. 1).

Ergebnisse und Diskussion

Darstellung adenosylierter Corrinoid

Die aus analysenreinem 5'-Tosyladenosin¹² und einigen Kobalt(I)-corrinoiden dargestellten Adenosyl-corrinoid wurden nach Phenolextraktion in einem Schritt säulenchromatographisch gereinigt. Man benutzte hierzu CM-Cellulose und Wasser als Entwickler.

In auf pH 4,4 gepufferte CM-Cellulosesäule wandert das Adenosyl-cobalamin langsam und läßt sich in reiner Form gewinnen (Ausbeute 71%, ausgehend vom Aqua-cobalamin bzw. 50%, ausgehend vom Cyano-cobalamin). Cyano-cobalamin und Adenosyl-cobalamincarbonsäure bewegen sich rasch und werden quantitativ abgetrennt, Aqua-cobalamin verbleibt im oberen Säulenteil. Diese Arbeitsweise (gepufferte CM-Cellulosesäule und Wasser als Entwickler) ist einfacher als die frühere Verwendung ungepufferte CM-Cellulosesäule und Elution des Adenosyl-cobalamins mit 2-prozentiger Essigsäure mit anschließender Phenolextraktion (s. Tab. I).

Adenosyl-cobinamidphosphat (dargestellt aus Cyano-cobinamidphosphat) wurde mittels Chromatographie an ungepufferte CM-Cellulosesäule gereinigt. Das angestrebte Produkt (Ausbeute 58%) wandert in der Säule langsam und wird vom Diaqua-cobinamidphosphat (unbeweglich) sowie vom Cyano-cobinamidphosphat (rasch beweglich) sehr gut getrennt. Diese Art der Reinigung ist einfacher als die Verwendung von P-Cellulose bei pH 3,6²³.

Tab. 1. Wichtigere bisher publizierte Verfahren zur Darstellung von Adenosyl-corrinoiden.

| Ausgangs-Corrinoid (a–e), Reduktionsmittel (f–l), Aktiviertes Adenosin (m–t) * | Entfernung der Schutzgruppe, Reinigung des Adenosyl-corrinoides | Registrierte Ausbeute an Ado-corrinoid |
|--|---|--|
| a, f, g, h, m ¹⁹ | Phenolextraktion; Säulenchromatographie und DEAE- und CM-Cellulose; Hydrolyse mit 0,1 N HCl (16 h, Raumtemperatur oder 15 min, 90 °C) | |
| b, i, m ²⁰ a, i, m ^{21, 22} | Phenolextraktion; Hydrolyse mit verdünnter Schwefelsäure Phenolextraktion; Säulenchromatographie an CM-Cellulose (Elution mit 2% Essigsäure); Hydrolyse mit 1 N H ₂ SO ₄ (5 min, 60 °C) | 77,3–79% |
| a, f, m, n ⁴ | Phenolextraktion; Chromatographie an DEAE- und CM-Cellulose; Hydrolyse mit 0,1 N HCl (15 min, 90 °C); Phenolextraktion; Säulenchromatographie an CM-Cellulose (Entfernung von Aqua-B ₁₂) | 90 mg aus 250 mg Aqua-B ₁₂ |
| b, d, k, m ¹⁸ | Phenolextraktion; Hydrolyse mit verdünnter Salzsäure (30 min, 25–30 °C); Phenolextraktion; Elektrophorese in 1 N Essigsäure | |
| b, k, o ⁸ b, f, m ¹⁶ | Phenolextraktion; Elektrophorese; Papierchromatographie Hydrolyse mit 0,1 N HCl (30 min, 90 °C); Neutralisation; Verdampfung; Säulenchromatographie an Sephadex G-15 | 40–50% 68–77% |
| b, l, m ¹⁶ a, f, p ¹⁰ | Wie oben Phenolextraktion; Säulenchromatographie an CM-Cellulose (Elution mit 2% Essigsäure) | Sehr gering 78% |
| a, f, r ⁵ | Phenolextraktion; Hydrolyse mit 1 M Phosphorsäure (12 h, Raumtemperatur) oder 80% Essigsäure (24 h, 38 °C); Neutralisation; Chromatographie an Dowex-50x2, pH 3 | 85% |
| a, f, m ¹⁵ | Säulenchromatographie an Dowex-50x2, pH 3 (Aqua-B ₁₂ bleibt in der Säule); Phenolextraktion; Hydrolyse mit 0,2 N HCl (24 h, Raumtemperatur); Chromatographie an Dowex-50x2, pH 3; Phenolextraktion | 54% |
| c, f, s ⁹ a, f, m ⁶ | Phenolextraktion; Säulenchromatographie an P-Cellulose Säulenchromatographie an Dowex-50x2, pH 3; Phenolextraktion; Hydrolyse mit 0,2 N HCl (Raumtemperatur, 24 h); Säulenchromatographie an Dowex-50x2, pH 3 (Ado-B ₁₂ -Carbonsäure läuft rasch durch, Aqua-B ₁₂ bleibt in der Säule); Phenolextraktion | 40% 214 mg krist Produkt aus 440 mg Aqua-B ₁₂ |
| e, f, t ¹³ | Papierchromatographie; Elektrophorese | |

* Ausgangs-Corrinoid: a, Aqua-cobalamin; b, Cyano-cobalamin; c, Diaqua-cobinamid; d, Cyano-cobinamid; e, Cyano-cobalamin-5'-phosphat. Reduktionsmittel: f, Na-Borhydrid; g, Chrom(II)-Salz in EDTA-Puffer, pH 9,5; h, Zn und verdünnte Essigsäure; i, Zn und 10% NH₄Cl; k, Zn, Mg und 10% NH₄Cl; l, NaHS oder Glutathion. Aktiviertes Adenosin: m, 2',3'-Isopropyliden-5'-tosyladenosin; n, 2',3'-Diacetyl-5'-tosyladenosin; o, rohes 5'-Tosyladenosin, hergestellt *in situ* durch direkte Tosylierung von Adenosin; p, 5'-Tosyladenosin, hergestellt aus 2',3'-p-Dimethylaminobenzyliden-5'-tosyladenosin; r, 2',3'-p-Anisyliden-5'-tosyladenosin; s, 5'-Tosyladenosin, hergestellt *in situ* aus 5'-Tosyladenosin-2',3'-cyclo-carbonat; t, 5'-Jod-5'-desoxyadenosin.

Die gleiche Methode führte zur Darstellung von Adenosyl-Faktor Ib (Ausbeute 64%), ausgehend von der Cyano-aqua-Form dieses Corrinoides.

Darstellung und Eigenschaften des 1.N⁶-Äthenadenosyl-cobalamins

Chloracetaldehyd reagiert in schwach saurem Milieu mit Adenosin unter Bildung von 1.N⁶-Äthenadenosin²⁴. Diese Verbindung zeichnet sich durch eine sehr intensive Fluoreszenz aus und kann deshalb zur Markierung adeninhaltiger Verbindungen benutzt werden^{25, 26, 29}.

Wir synthetisierten ein Analogon des Adenosyl-cobalamins, enthaltend als „oberen“ Liganden den

1.N⁶-Äthenadenosylrest, um einige Eigenschaften dieses lichtempfindlichen Corrinoides zu prüfen. Die Frage, ob das synthetisierte Corrinoid in enzymatischen Reaktionen das Adenosyl-cobalamin ersetzen kann und dabei wie dieses in Nucleosid und B_{12r} gespalten wird, soll erst später untersucht werden. Die intensive Fluoreszenz des 1.N⁶-Äthenadenosins dürfte den Nachweis der Spaltung erleichtern.

2',3'-Isopropyliden-1.N⁶-äthenadenosin wurde nach der für 1.N⁶-Äthenadenosin beschriebenen, jedoch etwas modifizierten Methode²⁴ dargestellt. Die aus Äthanol gut kristallisierende Substanz schmilzt bei etwa 175 °C mit Zersetzung, fluoresziert intensiv und hat erwartungsgemäß das Absorptionsspektrum

Tab. II. Papierchromatographische Beweglichkeiten der dargestellten Adenosinanaloge.

| Adenosinanalogon | Entwickler | | | | | | | |
|---|------------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| 1.N ⁶ -Äthenadenosin ^a | 0,91 | 0,90 | 0,99 | 1,21 | 1,30 | 0,78 | 0,65 | 1,04 |
| 2'.3'-Isopropyliden-1.N ⁶ -äthenadenosin ^b | 1,08 | 1,05 | 1,08 | 1,12 | 1,22 | 0,97 | 0,92 | 1,16 |
| 2'.3'-Isopropyliden-1.N ⁶ -äthenadenosin ^c | 1,98 | 2,08 | 2,02 | 1,34 | 1,70 | 1,89 | 2,60 | 2,40 |
| 2'.3'-Isopropyliden-5'-tosyl-1.N ⁶ -äthenadenosin ^d | | | | | | 1,26 | | |

^a Beweglichkeit des Adenosins = 1; ^b Beweglichkeit des 2'.3'-Isopropylidenadenosins = 1; ^c Beweglichkeit des 1.N⁶-Äthenadenosins = 1; ^d Beweglichkeit des 2'.3'-Isopropyliden-1.N⁶-äthenadenosins = 1.

des 1.N⁶-Äthenadenosins ²⁴. Ihre papierchromatographischen Eigenschaften zeigt Tab. II. Elektrophoretisch unterscheiden sich 1.N⁶-Äthenadenosin ²⁵ und 2'.3'-Isopropyliden-1.N⁶-äthenadenosin bei pH 2,5 (0,5 N Essigsäure) und pH 10,7 (0,05 M Natriumcarbonat) nicht vom Adenosin bzw. 2'.3'-Isopropylidenadenosin. 2'.3'-Isopropyliden-1.N⁶-äthenadenosin ist, ähnlich wie 1.N⁶-Äthenadenosin, in 0,01 N NaOH sehr instabil. Bereits nach 45 min werden stark erhöhte Extinktionen beobachtet, nach einigen Stunden sind die Maxima bei 265 und 275 nm durch ein höheres Maximum bei 267 nm und ein Minimum bei 242 nm ersetzt.

Tosylierung des 2'.3'-Isopropyliden-1.N⁶-äthenadenosins ergab das kristalline 2'.3'-Isopropyliden-5'-tosyl-1.N⁶-äthenadenosin, welches mit reduziertem Aqua-cobalamin (B_{12a}) zum Isopropyliden-1.N⁶-äthenadenosyl-cobalamin mit 70% Ausbeute umgesetzt wurde. Behandlung dieses Corrinoides mit 0,1 N HCl (20 min, 90 °C), Neutralisation, Phenol-extraktion und Säulenchromatographie an gepufferter (pH 4,4) CM-Cellulose führten zum 1.N⁶-Äthenadenosyl-cobalamin mit 40% Ausbeute, ausgehend vom Isopropyliden-corrinoid. Das neue Corrinoid unterscheidet sich vom Adenosyl-cobalamin durch sein charakteristisches Absorptionsspektrum im UV-

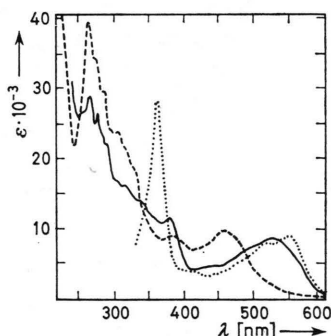


Abb. 1. Absorptionsspektrum von 1.N⁶-Äthenadenosyl-cobalamin in Wasser (—), in 0,05 N HCl (---) und nach Photolyse in Gegenwart von etwas HCN (.....).

Bereich (Abb. 1), die beiden Cobalamine ähneln jedoch einander papierchromatographisch (Tab. III) und elektrophoretisch (Tab. IV). Aus Elektrophoreseversuchen lassen sich die pK-Werte der dargestellten Corrinoiden abschätzen: 3,4 und 6,7 für

Tab. III. Papierchromatographische Beweglichkeiten der synthetisierten Corrinoiden (Beweglichkeit des Cyano-cobalamins = 1).

| Corrinoid | Entwickler | | | | |
|---|------------|------|------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 9 | 10 |
| Isopropylidenadenosyl-cobalamin | 1,36 | 1,48 | 1,34 | | |
| Isopropyliden-1.N ⁶ -äthenadenosyl-cobalamin | 1,38 | 1,32 | 1,30 | | |
| Adenosyl-cobalamin | 0,81 | 0,81 | 0,71 | | |
| 1.N ⁶ -Äthenadenosyl-cobalamin | 0,81 | 0,81 | 0,81 | | |
| Adenosyl-cobinamidphosphat | 0,22 | 0,32 | 0,18 | 0,40 | 0,24 |
| Adenosyl-Faktor I b | 1,12 | 1,16 | 1,11 | 0,82 | 1,07 |

Tab. IV. Relative papierelektrophoretische Beweglichkeiten von Adenosyl-cobinamidphosphat (1), Adenosyl-Faktor I b (2), Adenosyl-cobalamin (3) und 1.N⁶-Äthenadenosyl-cobalamin (4) gegen die Kathode (k) bzw. gegen die Anode (a). Beweglichkeiten stets bezogen auf Faktor B (= 1) und Cyano-cobalamin (= 0). Fleckfarben: Corrinoid 1 und 2 gelb, Corrinoid 3 und 4 orange bei pH ≤ 4 , ziegelrot bei pH $\geq 4,5$. Pufferlösungen: Glycin/HCl, 0,05 M (pH 2,0); Essigsäure, 0,5 N (pH 2,5); Citronensäure/Natriumcitrat, 0,05 M (pH 3,4 bis 5,2); Natriumacetat, 0,05 M (pH 6,5); Natriumhydrogencarbonat, 0,05 M (pH 8,0); Natriumcarbonat, 0,05 M (pH 10,8). Papier Schleicher u. Schüll 2043 bMgl.

| pH | Corrinoid | | | |
|------|-----------|----------|----------|----------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 2,0 | (k) 0,79 | (k) 0,65 | (k) 1,23 | (k) 1,30 |
| 2,5 | (k) 0,72 | (k) 0,57 | (k) 1,08 | (k) 1,21 |
| 3,4 | (k) 0,46 | (k) 0,34 | (k) 0,67 | (k) 0,75 |
| 4,0 | 0,0 | (k) 0,06 | (k) 0,15 | (k) 0,34 |
| 4,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 5,2 | (a) 0,11 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 6,5 | (a) 0,44 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 8,0 | (a) 0,92 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 10,8 | (a) 1,00 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |

Adenosyl-cobinamidphosphat, 3,0 für Adenosyl-Faktor Ib, 3,5 für Adenosyl-cobalamin und 3,7 für 1.N⁶-Äthenadenosyl-cobalamin. Aerobe Photolyse (zur Methodik vgl. Taylor *et al.*²⁷) in Wasser unter Verwendung einer Wolframlampe (100 W, Entfernung 45 cm) zeigte, daß 1.N⁶-Äthenadenosyl-cobalamin etwas stabiler ist als Adenosyl-cobalamin (etwa 85% der Lichtempfindlichkeit des Adenosyl-cobalamins).

Gegenüber *Escherichia coli* 113-3 ist 1.N⁶-Äthenadenosyl-cobalamin deutlich weniger aktiv (70%) als Adenosyl-cobalamin (84%) und Cyano-cobalamin (100%). Nach Belichtung in Gegenwart von etwas Blausäure werden erwartungsgemäß keine Aktivitätsunterschiede beobachtet.

Nach Abschluß dieser Arbeit nehmen wir zur Kenntnis, daß auch einer russischen Arbeitsgruppe²⁸

die Synthese von 1.N⁶-Äthenadenosyl-cobalamin gelang. Diese wurde dort jedoch auf einem anderen Wege erzielt.

Man setzte Adenosin und Essigsäure- α,β -dibromäthylester zum 1.N⁶-Äthenadenosin um. Das Produkt wurde mittels Phenylborsäure an C-2' und C-3' verschlossen und dann an C-5' tosyliert. Reaktion mit B₁₂s und Hydrolyse ergab 1.N⁶-Äthenadenosyl-cobalamin. Dieses ließ sich auch auf direktem Wege durch Reaktion des Adenosyl-cobalamins mit Essigsäure- α,β -dibromäthylester gewinnen. Das neue Cobalamin war im Glycerindehydratase-Test aktiv²⁸.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie für die Unterstützung dieser Arbeit.

- ¹ J. M. Pratt, Inorganic Chemistry of Vitamin B₁₂, Academic Press, London, New York 1972.
- ² D. Dodd u. M. D. Johnson, J. Organomet. Chem. **52**, 1–232 [1973].
- ³ W. Friedrich, Vitamin B₁₂ und verwandte Corrinoiden, Thieme, Stuttgart 1975.
- ⁴ A. W. Johnson, L. Mervyn, N. Shaw u. E. L. Smith, J. Chem. Soc. **1963**, 4146.
- ⁵ C. G. D. Morley u. H. P. C. Hogenkamp, Arch. Biochem. Biophys. **123**, 207 [1968].
- ⁶ H. P. C. Hogenkamp, W. H. Pailles u. C. Brownson, Methods Enzymol. **18 C**, 57 [1971].
- ⁷ E. L. Smith, L. Mervyn, P. W. Muggleton, A. W. Johnson u. N. Shaw, Ann. N. Y. Acad. Sci. **112**, 565 [1964].
- ⁸ B. Zagalak u. J. Pawelkiewicz, Acta Biochim. Pol. **12**, 219 [1965].
- ⁹ P. Y. Law, D. G. Brown, E. L. Lien, B. M. Babior u. J. M. Wood, Biochemistry **10**, 3428 [1971].
- ¹⁰ R. R. Schmidt u. F. M. Huennekens, Arch. Biochem. Biophys. **118**, 253 [1967].
- ¹¹ M. Schlecht u. O. Müller, Z. Naturforsch. **28 c**, 351 [1973].
- ^{11a} R. R. Schmidt, U. Schloz u. D. Schwille, Chem. Ber. **101**, 590 [1968].
- ¹² Hersteller: Pharma Waldhof, Papierwerke Waldhof-Aschaffenburg, D-6800 Mannheim.
- ¹³ Z. Schneider u. H. C. Friedmann, Arch. Biochem. Biophys. **152**, 488 [1972].
- ¹⁴ H. P. C. Hogenkamp, Biochemistry **13**, 2736 [1974].
- ^{14a} Zur Nomenklatur der Corrinoiden vgl. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, The Nomenclature of Corrinoids, Biochemistry **13**, 1555 [1974].
- ¹⁵ H. P. C. Hogenkamp u. W. H. Pailles, Biochem. Preparations **12**, 124 [1968].
- ¹⁶ C. G. D. Morley u. R. L. Blakley, Biochemistry **6**, 88 [1967].
- ¹⁷ C. G. D. Morley, R. L. Blakley u. H. P. C. Hogenkamp, Biochemistry **7**, 1231 [1968].
- ¹⁸ B. Zagalak u. J. Pawelkiewicz, Acta Biochim. Pol. **11**, 49 [1964].
- ¹⁹ E. L. Smith, L. Mervyn, A. W. Johnson u. N. Shaw, Nature **194**, 1175 [1962].
- ²⁰ K. Bernhauer, O. Müller u. G. Müller, Biochem. Z. **336**, 102 [1962].
- ²¹ O. Müller u. G. Müller, Biochem. Z. **336**, 299 [1962].
- ²² O. Müller u. G. Müller, Biochem. Z. **337**, 179 [1963].
- ^{22a} H. Vogelmann u. F. Wagner, J. Chromatogr. **76**, 359 [1973].
- ²³ R. A. Ronzio u. H. A. Barker, Biochemistry **6**, 2344 [1967].
- ²⁴ N. K. Kochetkov, V. N. Shibaev u. A. A. Kost, Tetrahedron Lett. **1971**, 1993.
- ²⁵ J. R. Barrio, J. A. Secrist u. N. J. Leonard, Biochem. Biophys. Res. Commun. **46**, 597 [1972].
- ²⁶ J. A. Secrist III, J. R. Barrio, N. J. Leonard u. G. Weber, Biochemistry **11**, 3499 [1972].
- ²⁷ R. T. Taylor, L. Smucker, M. L. Hanna u. J. Gill, Arch. Biochem. Biophys. **156**, 521 [1973].
- ²⁸ I. P. Rudakova, A. M. Yurkevich u. V. A. Yakovlev, Dokl. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim. **218**, 588 [1974].
- ²⁹ J. R. Barrio, J. A. Secrist u. N. J. Leonard, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. **69**, 2039 [1972].