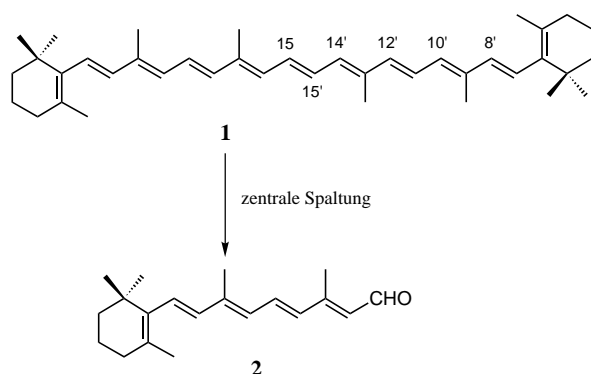


Ein supramolekulares Enzymmodell zur katalytischen Spaltung der zentralen Doppelbindung von β,β -Carotin**

Richard R. French, Philipp Holzer,
Michele G. Leuenberger und Wolf-D. Woggon*

Professor Albert Eschenmoser zum 75. Geburtstag gewidmet

Die enzymatische Spaltung von β,β -Carotin **1** zu Retinal **2**, der Vorstufe von Retinol (Vitamin A), ist von Bedeutung für die menschliche und tierische Ernährung.^[1] Gegenwärtig werden die folgenden Metabolismusvarianten diskutiert: 1) die kürzlich entdeckte nichtzentrische Spaltung von **1** zu Apocarotinolen, die durch β -Oxidation zu **2** abgebaut werden können, und 2) die zentrale Spaltung von **1**, die direkt zu Retinal **2** als einzigem Produkt führt (Schema 1).^[2, 3] Die



Schema 1.

entsprechenden Enzyme, die im Allgemeinen als Carotin-Dioxygenasen (CDO) bezeichnet werden, sind weder gereinigt worden, noch gibt es Informationen über die Struktur ihrer Cofaktoren. Untersuchungen zur Substratspezifität des Enzymes, das die zentrale Spaltung katalysiert, werden dahingehend interpretiert, dass der wahrscheinlich vorliegende, chemisch reaktive Metallkomplex ausschließlich die C(15)=C(15')-Bindung angreift, d. h., direkt über dieser Doppelbindung des Substrates in der Bindungsstelle platziert ist.^[4, 5]

Um diese erstaunliche Regiospezifität mit einem synthetischen Enzymmodell zu imitieren, wurde folgende Strategie angewendet. Zunächst war die Herstellung eines Rezeptors notwendig, dessen Bindungskonstante K_a für **1** um einige Zehnerpotenzen größer ist als die für **2**, um eine Produkt-hemmung zu vermeiden. Dieser Rezeptor sollte einen Metall-

komplex enthalten, der geeignet ist, (*E*)-konfigurierte, konjugierte Doppelbindungen unter Bildung von Aldehyden zu spalten. Schließlich musste ein Co-Oxidans gefunden werden, das in Abwesenheit des Metallkomplexes nicht mit **1** reagiert.

Wir haben bereits über die Synthese eines effizienten Rezeptors für **1** ($K_a = 2.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) berichtet, der symmetrisch aus zwei über ein metallfreies Porphyrin verbundene β -Cyclodextrin-Einheiten aufgebaut ist.^[6] In der Annahme, dass die Bindungskonstante für **1** ansteigt, wenn der gleiche Rezeptor ein vergleichsweise eingeebnetes Metalloporphyrin enthält und damit strukturell dem Zielmolekül entspricht, haben wir den entsprechenden Zink(II)-Komplex **3** hergestellt (Abbildung 1a). Die Bindungskonstante für die Bindung von **1** an **3** wurde durch Fluoreszenzspektroskopie^[6] zu $K_a = 8.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ bestimmt und damit sowohl die Voraussage bestätigt als auch sichergestellt, dass dieser Strukturtyp keine Produkthemmung zeigen würde. Zum Vergleich: Die Bindungskonstante für die Bindung von Retinal **2** an β -Cyclodextrin beträgt $K_a = 3.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$.^[7]

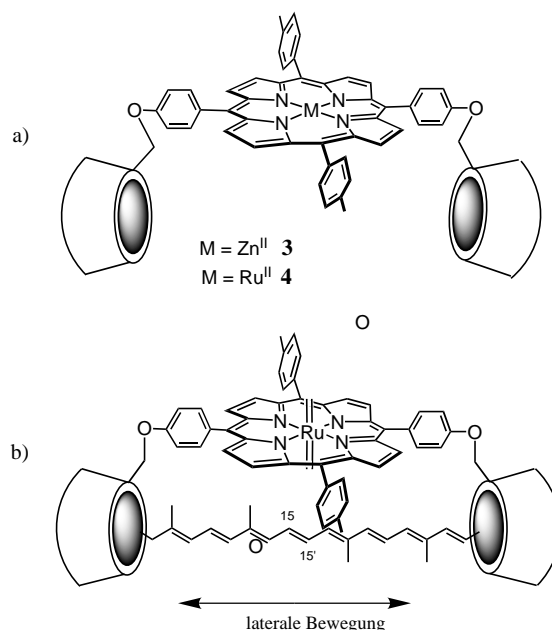
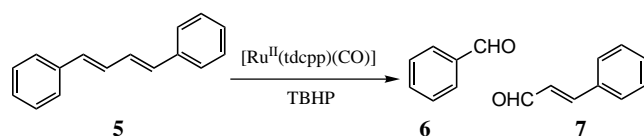


Abbildung 1. a) Strukturen der Rezeptoren **3** und **4**. b) Schematische Darstellung des Einschlusskomplexes aus **1** und **4**. Der Doppelpfeil deutet die laterale Bewegung des Substrates **1** in den β -Cyclodextrinen an.

Bezüglich der Wahl eines für die Doppelbindungsspaltung geeigneten Metalloporphyrins fand man lediglich einen Hinweis über die Umsetzung von α -Methylstyrol zu Acetophenon in Gegenwart von [Ru(tdfpp)] (tdfpp = Tetrakis(2,6-difluorphenyl)porphyrin) und *tert*-Butylhydroperoxid (TBHP).^[8] Die systematische Untersuchung des Reaktionsverhaltens verschiedener einfacher und sterisch gehinderter Ruthenium-Porphyrine in Gegenwart von TBHP mit (*E*)-konfigurierten, konjugierten Olefinen ergab ein optimales System, das z. B. in Gegenwart von [Ru(tdcpp)] (tdcpp = Tetrakis(2,6-dichlorphenyl)porphyrin) *trans,trans*-1,4-Diphenyl-1,3-butadien **5** in Benzaldehyd **6** und Zimtaldehyd **7** spaltet (Schema 2).^[9] Es wurde beobachtet, dass Epoxide als Zwischenprodukte der Doppelbindungsspaltung auftreten, die vermutlich in der Folge unter Beteiligung von Ru-

[*] Prof. Dr. W.-D. Woggon, Dipl.-Chem. R. R. French, Dipl.-Chem. P. Holzer, Dipl.-Chem. M. G. Leuenberger
Institut für Organische Chemie der Universität Basel
St. Johannis-Ring 19, 4056 Basel (Schweiz)
E-mail: wolf-d.woggon@unibas.ch

[**] Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds, von der Novartis AG und von der F. Hoffmann-La Roche AG unterstützt. Wir danken ferner der F. Hoffmann-La Roche AG für Carotinoid-Substanzproben und Prof. Dr. Jakob Wirz, Institut für Physikalische Chemie der Universität Basel, für die Berechnung der Bindungskonstante K_a von **1** an den Rezeptor **3**.



Schema 2.

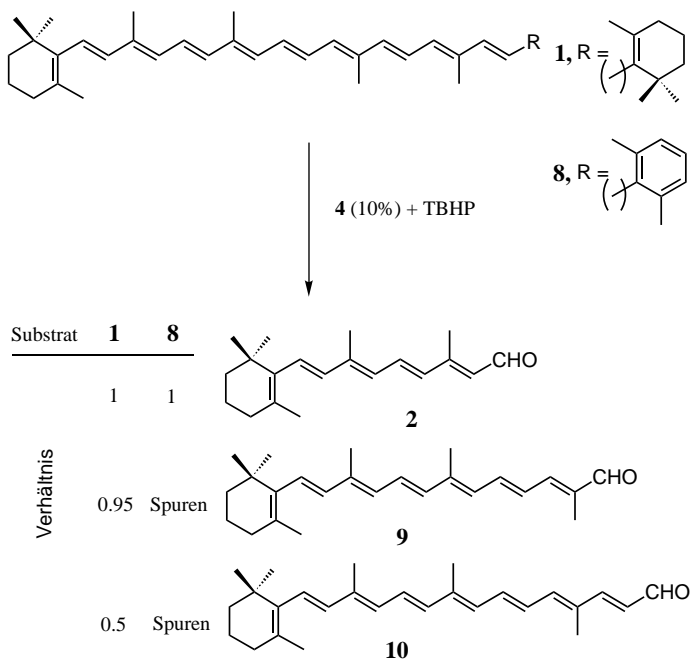
Porphyrin/TBHP zu den Aldehyden **6** und **7** fragmentieren. Die durchwegs einheitliche Reaktion verschiedener Oxo-Ru-Porphyrine mit (*E*)-konfigurierten Doppelbindungen ist ein neuer Aspekt und dokumentiert einen interessanten Unterschied im Vergleich zu den Oxo-Eisen-Porphyrinen^[10] und Oxo-Mangan-Salen-Komplexen,^[11] die eine eindeutige Präferenz für (*Z*)-Doppelbindungen aufweisen. Für die Eisen- und Mangan-Komplexe wird diese Selektivität im Allgemeinen mit einem seitlichen Angriff des Olefins an die Metall-Oxo-Bindung erklärt. Aus sterischen Gründen ist diese Wechselwirkung zwischen **5** und [Ru(tdcpp)(O)₂] oder zwischen **1** und dem Dioxo-Komplex von **4** jedoch ausgeschlossen. Der Befund, dass auch die Spaltung (*Z*)-konfigurierter Doppelbindungen mit Ru-Porphyrinen unterschiedlicher sterischer Hinderung gelingt, kann damit erklärt werden, dass die Ru=O-Gruppe sowohl (*E*)- als auch (*Z*)-Doppelbindungen („head-on“) senkrecht zur Ebene des Kohlenstoffgerüsts angreift.^[9] Demzufolge scheint es nicht zwingend, verschiedene, von der Konfiguration der Doppelbindungen abhängige Mechanismen für die Epoxidbildung anzunehmen.^[12] Schließlich haben wir auch die Stabilität von β,β -Carotin in Gegenwart von TBHP untersucht und keine Derivatisierung oder Abbaureaktionen innerhalb von 24 h bei Raumtemperatur festgestellt. Ein weiteres Kontrollexperiment mit [Ru(tpp)]/TBHP (tpp = Tetraphenylporphyrin) und β,β -Carotin in Dichlormethan gab nach vollständigem, unselektivem Abbau von **1** eine komplexe, nicht charakterisierbare Produktmischung. Somit waren alle Voraussetzungen, den supramolekularen Katalysator **4** als CDO-Enzymmodell zu nutzen, gegeben.

Die Komplexe **3** und **4** wurden durch Reaktion von käuflichem 6^A-*O*-(*p*-Tosyl)- β -cyclodextrin^[13] mit dem entsprechenden Metalloporphyrin in Gegenwart von Cäsiumcarbonat (DMF, 3 d, HPLC-Kontrolle) hergestellt,^[14] und anschließend mittels präparativer HPLC gereinigt.

Für die katalytische Spaltung von β,β -Carotin **1** wurde ein Zweiphasensystem bestehend aus **1** gelöst in Hexan/Chloroform (9/1) und **4** (10 Mol-%) und TBHP gelöst in Wasser verwendet. Unter diesen Bedingungen werden die Reaktionsprodukte (Schema 3) vom Rezeptor freigesetzt und in die organische Phase extrahiert, in der sie nach der gleichen HPLC-Methode analysiert wurden, die man für die Kontrolle der enzymatischen Reaktion entwickelt hatte.^[15] Die Metaboliten wurden durch Coinjektion authentischen Materials sowie UV-spektroskopisch identifiziert; zur Quantifizierung verwendete man Kalibrationskurven, anhand derer die in Schema 3 angegebenen Produktverhältnisse berechnet wurden.

Demzufolge wird β,β -Carotin offensichtlich nicht ausschließlich an der zentralen Doppelbindung gespalten, sondern auch an C(12')=C(11') sowie an C(10')=C(9') unter Bildung von 12'-Apocarotinal **9** bzw. 10'-Apocarotinal **10**. Die

Gesamtausbeute der Aldehyde **2**, **9** und **10** betrug 30 %, ein Wert, der in etwa dem der Effizienz des Enzyms β,β -Carotin-15,15'-Dioxygenase entspricht (20–25 % Ausbeute an **2**).^[4]

Schema 3. Produktverhältnisse bei der Oxidation von **1** und **8** mit dem Katalysator **4**.

Es ist bemerkenswert, dass die der zentralen Doppelbindung von **1** benachbarte C(14')=C(13')-Bindung nicht oxidiert wird. Dieser Befund ließe sich durch eine laterale Bewegung des Substrates **1** im Rezeptor **4** erklären (Abbildung 1b), wobei durch sterische Wechselwirkungen der Cyclohexen-Endgruppen von **1** mit den inneren Oberflächen der Cyclodextrin-Einheiten nur drei der möglichen Doppelbindungen für eine Oxidation durch die Ru=O-Einheit exponiert werden. Sollte diese Annahme vernünftig sein, würde man erwarten, dass ein Carotinoid mit mindestens einer modifizierten Endgruppe eine unterschiedliche Regioselektivität bei der Doppelbindungsspaltung aufweist.

Wir haben deshalb das Carotinoid **8** synthetisiert,^[16] das ebenfalls ein Substrat des Enzyms ist,^[17] und seine Oxidation mit dem Katalysator unter identischen Bedingungen untersucht. Im Unterschied zu **1** wird das Substrat **8**, in dem eine der Endgruppen durch eine *ortho*-Dimethylphenyl-Einheit ersetzt ist, nahezu ausschließlich an der C(15)=C(15')-Bindung gespalten. Dieses Resultat legt tatsächlich eine ausgeprägtere hydrophobe Wechselwirkung der aromatischen Endgruppe von **8** mit einer β -Cyclodextrin-Cavität nahe, die die laterale Mobilität des Substrates im 1:1-Komplex mit **4** einschränkt und selektiv die zentrale Doppelbindung zur Reaktion bringt.

Das hier vorgestellte supramolekulare Enzymmodell imitiert mit ungewöhnlicher Reaktivität und Selektivität die zentrale Spaltung von zwei Substraten des Enzyms β,β -Carotin-15,15'-Dioxygenase. Ein entsprechendes Enzymmodell, das die nichtzentrische Spaltung von Carotinoiden katalysiert, ist gegenwärtig in Bearbeitung.^[18]

Experimentelles

Physikalische Daten von **4**: $\lambda_{\text{max}} = 414$ (100%), 534 (10%) 570 (4%); $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, 25 °C, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 8.61$ (d, 4H, H-2,8,12,18, $J = 4.5$ Hz), 8.56 (d, 4H, H-3,7,13,17, $J = 4.5$ Hz), 8.06 (m, 4H, H-2'',6''), 7.94 (m, 4H, H-3'',5''), 7.58 (m, 4H, H-2',6'), 7.33 (m, 4H, H-3',5'), 5.9–5.6 (br. m, 28H, 2 OH), 5.0–4.8 (m, 14H, anomeres H), 4.7–4.4 (m, 12H, 1 OH), 3.8–3.25 (m, 84H, β -CD (H-2,3,4,5,6,6')), 2.65 (s, 6H, ArCH_3); MALDI-TOF-MS: m/z : 3007 $[\text{M}^+]$, 3024 $[\text{M}+\text{H}_2\text{O}]$; HPLC (LiChrospher 100Rp-18 (5 μm), 250-4) $R_t = 9.43$ min (20–60% Acetonitril in 20 min, Flow 1.5 mL min $^{-1}$).

Allgemeine Vorschrift für die oxidative Spaltung: Der Rutheniumkomplex **4** (2.3 mg, 10 Mol-%) wurde in H_2O (1 mL) unter Argon in einem geschlossenen 25-mL-Kolben gelöst und anschließend wurden 30 μL TBHP (70-proz. Lösung in Wasser, 30 Äquiv. bezogen auf **1**) hinzugefügt. β , β -Carotin **1** (4 mg) wurde in 10 mL Hexan/Chloroform (9/1) gelöst und hinzugegeben. Das resultierende Zweiphasensystem wurde während der gesamten Reaktionsdauer heftig mit einem Magnetrührer im Dunkeln gerührt, wobei zur Probenentnahme (20 μL) aus der organischen Phase jeweils das Rühren unterbrochen wurde. Die Aliquote wurden per HPLC analysiert (LiChrospher 100Rp-18 5 μm , Länge \times ID = 125 mm \times 4.6 mm, 25 °C, 1 mL min $^{-1}$, Gradient: Acetonitril/1-proz. $\text{NH}_4\text{OAc}_{(\text{aq})}$ (1/1) (100%) \rightarrow Acetonitril/*i*PrOH (1/1) (100%) in 10 min, dann 5 min Acetonitril/*i*PrOH (1/1) (100%), anschließend Acetonitril/*i*PrOH (1/1) (100%) \rightarrow Acetonitril/1-proz. $\text{NH}_4\text{OAc}_{(\text{aq})}$ (1/1) (100%) in 2 min. Detektion mit einem Dioden-Array-Detektor. $R_t = 10.39$ (**2**), 12.05 (**9**), 12.20 min (**10**). In allen Reaktionen wurden die Carotinoide **1** ($R_t = 14.0$ min) und **8** ($R_t = 15.3$ min) innerhalb von 24 h vollständig umgesetzt.

Eingegangen am 11. November 1999 [Z14254]

Eine unerwartete Kupplungs-Isomerisierungs-Sequenz als Einstieg zu neuartigen Dreikomponenten-Pyrazolinsynthesen**

Thomas J. J. Müller,* Markus Ansorge und Daniel Aktah

Konsekutivreaktionen^[1] sind immer stärker in den Mittelpunkt des Interesses gerückt, denn effiziente Synthesen stellen selbstredend den Anspruch, in wenigen Schritten mit hoher Chemo-, Regio- und Stereoselektivität aus einfachen Startmaterialien und in guten Ausbeuten ein Maximum an struktureller Komplexität aufzubauen. Dabei wird jeweils in der unmittelbar vorangehenden Reaktion die für den Folgeschritt notwendige Funktionalität gebildet. Für die Entwicklung neuer Kaskadenreaktionen, gerade im Hinblick auf Mehrkomponentenreaktionen, sind Methoden zur In-situ-Bildung reaktiver funktioneller Gruppen daher besonders gefragt. Idealerweise laufen dann alle diese Prozesse, gegebenenfalls unter sukzessiver Zugabe der Reagentien, ohne Isolierung der Intermediate im Sinne einer „Eintopfsynthese“ ab. Ein Vorbild für solche Konsekutivprozesse sind sowohl Mehrkomponenten-Kondensationen^[2] als auch palladiumkatalysierte Kaskadenreaktionen,^[3] die sich nicht zuletzt wegen der milden Reaktionsbedingungen und der ausgeprägten Toleranz für funktionelle Gruppen in vielen Fällen als besonders vielfältig gezeigt haben.

Im Laufe unserer Arbeiten zur Chemie von Aren- $\text{Cr}(\text{CO})_3$ -Komplexen mit konjugierten Seitenketten^[4] haben wir nun gefunden, dass die sonst sehr zuverlässige Sonogashira-Kupplung^[5] der Chlorarenkomplexe **1** mit 1-Arylprop-2-inolen **2** nicht zu den erwarteten Alkinkupplungsprodukten, den Propargylalkoholen **3**, führt, sondern dass sich in guten Ausbeuten die isomeren arylkomplexierten Chalcone **4**^[6] bilden (Schema 1).

Durch ein selektiv ^1H -entkoppeltes ^{13}C -NMR-Experiment konnte die Konstitution des komplexierten Chalcones **4a** zweifelsfrei aufgeklärt und somit eine Meyer-Schuster-Umlagerung^[7] ausgeschlossen werden. Bemerkenswerterweise entstehen die Chalcone mit ausgezeichneter *trans*-Selektivität ($^3J = 16$ Hz), was unter anderem auf eine thermodynamisch kontrollierte Bildung der Doppelbindung hinweist.

Unseres Wissens wurde diese ungewöhnliche Reaktion bisher nur im Fall der Kupplung von 2-halogensubstituierten Pyrimidinen beobachtet.^[8] Daher boten die Autoren als plausible Erklärung die Koordination eines Intermediates eines Hydropalladiumierungs-Dehydropalladiumierungs-Katalysezyklus an das heterocyclische Stickstoffatom an.^[8c] Es sind unter anderem bereits einige Übergangsmetall-katalysierte Redox-isomerisierungen von Propargylalkoholen zu α,β -ungesättig-

- [1] J. A. Olson, N. I. Krinsky, *FASEB J.* **1995**, *9*, 1547–1550, zit. Lit.
- [2] X.-D. Wang, G.-W. Tang, J. G. Fox, N. I. Krinsky, R. M. Russel, *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *285*, 8–16.
- [3] J. A. Olson, *J. Nutr.* **1989**, *119*, 105–108.
- [4] G. Wirtz, Dissertation, Universität Basel (Schweiz), **1998**.
- [5] G. Wirtz, A. Giger, R. K. Müller, H. Schneider, W.-D. Woggon, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [6] R. R. French, W.-D. Woggon, J. Wirz, *Helv. Chim. Acta.* **1998**, *81*, 1521–1527.
- [7] Q.-X. Guo, T. Ren, Y.-P. Fang, Y.-C. Liu, *J. Incl. Phenom. Mol. Recogn. Chem.* **1995**, *22*, 251–256.
- [8] S. Takagi, T. K. Miyamoto, *Inorg. Chim. Acta.* **1990**, *173*, 215–221.
- [9] R. R. French, P. Holzer, W.-D. Woggon, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [10] J. T. Groves, T. E. Nemo, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 5786–5791.
- [11] E. N. Jacobsen in *Comprehensive Organometallic Chemistry II*, Vol. 12 (Hrsg.: G. W. Wilkinson, F. G. A. Stone, E. W. Abel, L. S. Hegadus), Pergamon, New York, **1995**, Kap. 11.1.
- [12] C.-J. Liu, W.-Y. Yu, C.-M. Che, C.-H. Yeung, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7365–7374.
- [13] 6^A-*O*-(*p*-Tosyl)- β -cyclodextrin wurde bezogen von Cyclodextrin Technologies Development, Inc., Gainesville, FL 32068 (USA).
- [14] Die Porphyrinkondensation lieferte nach Entfernung der Schutzgruppen eine Mischung aus sechs metallfreien Porphyrinen, aus der der gewünschte Ligand **4** durch Säulenchromatographie (Kieselgel, Chloroform + 1% Ethanol) in reiner Form abgetrennt wurde; physikalische Daten von **4**: siehe Experimentelles.
- [15] G. Wirtz, C. Bornemann, W.-D. Woggon, Herbstversammlung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, Jena, **1998**.
- [16] M. G. Leuenberger, Dissertation, Universität Basel (Schweiz).
- [17] C. Bornemann, M. G. Leuenberger, W.-D. Woggon, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [18] P. Holzer, Dissertation, Universität Basel (Schweiz).

[*] Dr. T. J. J. Müller, Dipl.-Ing. M. Ansorge, D. Aktah
Institut für Organische Chemie
Ludwig-Maximilians-Universität München
Butenandtstraße 5–13 (Haus F), 81377 München (Deutschland)
Fax: (+49) 89-2180-7717
E-mail: tom@cup.uni-muenchen.de

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Wir danken Herrn Prof. Dr. Herbert Mayr für die großzügige Unterstützung.