

Über die Darstellung sowie Elektronen- und CD-Spektren der Co(I)-Form einiger natürlicher Corrinoide

Synthesis and Spectra (Electronic, CD) of the Co(I) Form of Several Natural Corrinoids

Matthäus Moskophidis

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Hamburg, Gindelallee 117, D-2000 Hamburg 13

Z. Naturforsch. **34 c**, 689 – 694 (1979); eingegangen am 19. Februar/9. April 1979

Vitamin B₁₂, B₁₂-Analogues, Co(I)-corrinoids, Electronic Spectra, CD-Spectra

Several natural corrinoids, cobalamin, 5-hydroxybenzimidazolyl cobamide (factor III), adenyl cobamide (pseudovitamin B₁₂), 2-methyladenyl cobamide (factor A) and cobyrinic acid, were reduced with sodium borohydride. The reduction of cyanocobalamin is slow as compared with that of factor III and especially of the other corrinoids under study. At longer wavelengths ($\lambda > 300$ nm) the electronic spectra of the Co(I)-corrinoids are nearly identical. The same is to say about the CD-spectra of the Co(I)-corrinoids examined.

Die Co(I)-Formen der natürlichen Corrinoide sind höchstwahrscheinlich Zwischenstufen der Biosynthese von Adenosyl- und Methylcorrinoiden (den Coenzymformen der B₁₂-Vitamine). Sie beanspruchen deshalb ein besonderes Interesse. Auch die Kinetik ihrer Bildung aus den Co(III)-Formen ist von Bedeutung. Wenn man nämlich annimmt, daß die Reduktionsraten *in vitro* und in der lebenden Zelle wenigstens grob einander entsprechen, dann müßten *in vitro*-Versuche gewisse Aussagen über die *in vivo*-Verwertbarkeit mancher Corrinoidformen (z. B. der Cyano- und Aqua-Form des Cobalamins) gestatten. Langsame Reduktion eines applizierten Cobalamins führt zu dessen langsamer Fixierung in der Zelle und rascher Ausscheidung.

Die Co(I)-Corrinoide sind extrem sauerstoffempfindlich und ihre Spektren deshalb schlecht darstellbar. Diese Schwierigkeit wird durch die Notwendigkeit des Zusatzes eines Reduktans vergrößert. Darauf ist es vielleicht zurückzuführen, daß Elektronen- und CD-Spektren der Co(I)-Corrinoide relativ selten publiziert wurden [1–3].

Die bisher publizierten Elektronenspektren des Co(I)-Cobalamins (des B_{12s}) [1] sind unvollständig, es fehlen nämlich entweder das kurzwellige Maximum (bei 248 nm) oder die Maxima bei 280 nm und bei 552 nm. Elektronenspektren der Co(I)-Form von Analoga des Vitamins B₁₂ wurden bisher nicht beschrieben. Dasselbe bezieht sich auf ihre CD-Spektren.

Sonderdruckanforderungen an Dr. M. Moskophidis.

0341-0382/79/0900-0689 \$ 01.00/0

Experimenteller Teil

Reagenzien

Aquacobalamin wurde aus Methylcobalamin durch Belichtung und anschließende CM-Cellulose-Chromatographie (Eluens: 0,5 N Essigsäure) dargestellt. Cobyrinsäure, 5-Hydroxybenzimidazolylcobamid (Faktor III), 2-Methyladenylcobamid (Faktor A) und Adenylcobamid (Pseudovitamin B₁₂) wurden aus Faulschlamm gewonnen und lagen in kristalliner Form vor. p-Kresylcobamid (Faktor Ib) wurde in amorper Form aus Faulschlamm gewonnen. Die oben genannten Corrinoide außer Aquacobalamin erhielt ich von Prof. Dr. W. Friedrich. Alle Corrinoide, bis auf Aquacobalamin, lagen in der Monocyaniform vor. Natriumborhydrid „zur Analyse“ (eine etwa 8×10^{-3} M Lösung beeinflußt das Spektrum im Bereich von 230–600 nm nicht) sowie Cyanocobalamin wurden von E. Merck, Darmstadt, bezogen.

Spektralphotometrische Messungen

Elektronenspektren wurden mit Hilfe der Geräte Beckman DU sowie Shimadzu/Bausch & Lomb Spectronic 200 durchgeführt. Alle gemessenen Corrinoidlösungen waren $23,9 \times 10^{-6}$ M, dabei basierte die Konzentrationseinstellung auf den Werten $\epsilon_{361\text{ nm}} = 28060$ (bei den nucleotidhaltigen Corrinoiden) und $\epsilon_{354\text{ nm}} = 27360$ (bei der Cyanoaquacobyrinsäure). Für die CD-Spektren wurde das Gerät Dichrograph III benutzt.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

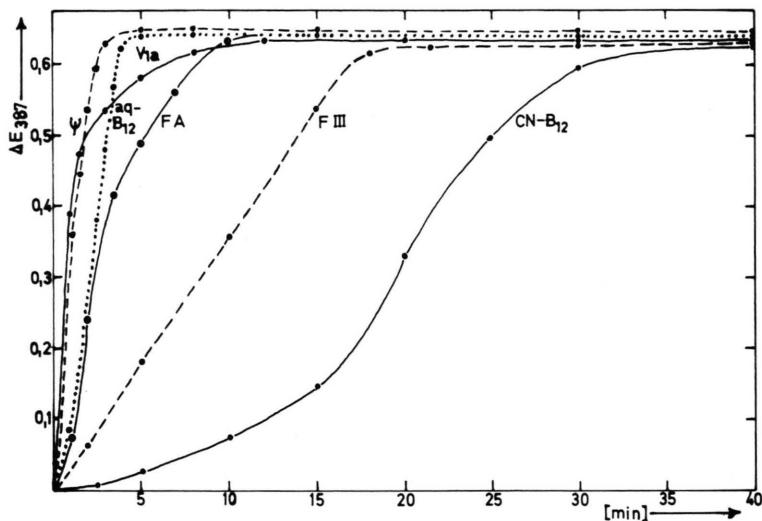


Abb. 1. Kinetik der Reduktion einiger B_{12} -Formen (stets $23,9 \times 10^{-6} \text{ M}$) durch $8,73 \times 10^{-3} \text{ M} \text{ NaBH}_4$ in Wasser (pH 8,8) in N_2 -Atmosphäre. $CN-B_{12}$ = Cyanocobalamin, $F III$ = Faktor III, FA = Faktor A, ψ = Pseudovitamin B_{12} , $aq-B_{12}$ = Aquacobalamin, V_{1a} = Cobyrnsäure.

Reduktion der Corrinoide mittels NaBH_4

Die untersuchte Corrinoidlösung (stets $23,9 \times 10^{-6} \text{ M}$, 3,0 ml) wird in einer gelochten Quarzküvette (Länge 1,0 cm) während 15 min mit N_2 begast und anschließend mit 1 mg ($8,73 \times 10^{-3} \text{ M}$) NaBH_4 versetzt. Das Reaktionsgut wird während einer weiteren Minute mit N_2 begast und die Kuvette anschließend luftdicht verschlossen. Von diesem Zeitpunkt ($=0,0 \text{ min}$) an wird – bis zur Erreichung des Plateau – ΔE bei 387 nm (dem Hauptmaximum der Co(I)-Corrinoide) gemessen. Unmittelbar danach erfolgte die Aufnahme des Spektrums.

Ergebnisse und Diskussion

Reduktion der Co(III)-Corrinoide

Erwartungsgemäß verläuft die Reduktion des Cyanocobalamins (Abb. 1) viel langsamer als die der anderen untersuchten Corrinoide, entsprechend der starken koordinativen Bindung zwischen Kobaltatom und 5,6-Dimethylbenzimidazol-Rest. Die Bindung zwischen Kobalt und Nucleotidbase [4] ist nach den bisherigen Ermittlungen stärker bei den Cobalaminen als bei allen übrigen Corrinoiden. Die ausgesprochene Sigmoidität der Reduktionskurve

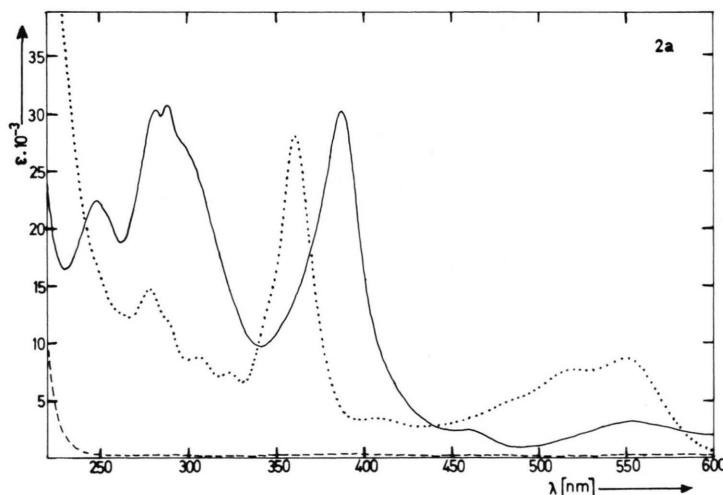
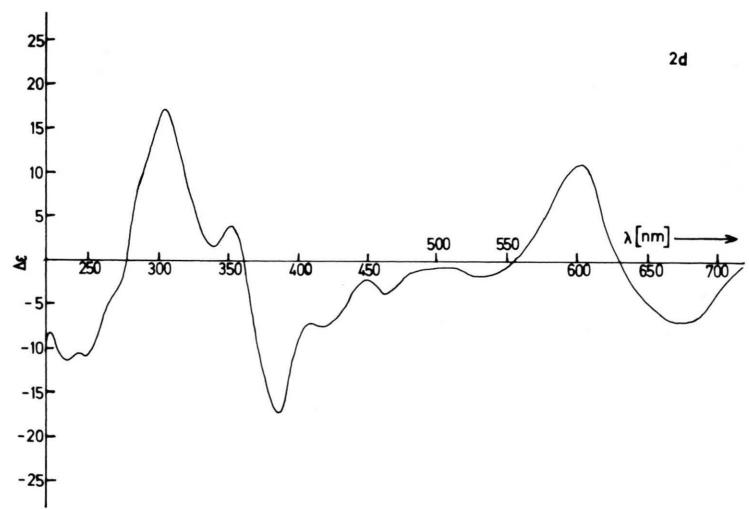
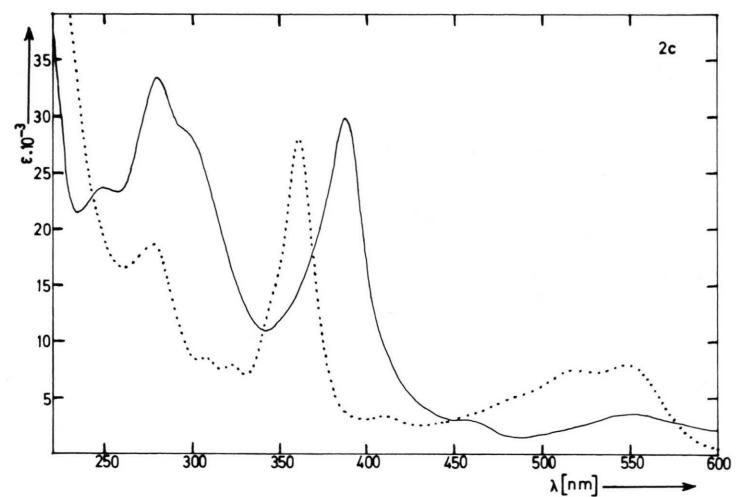
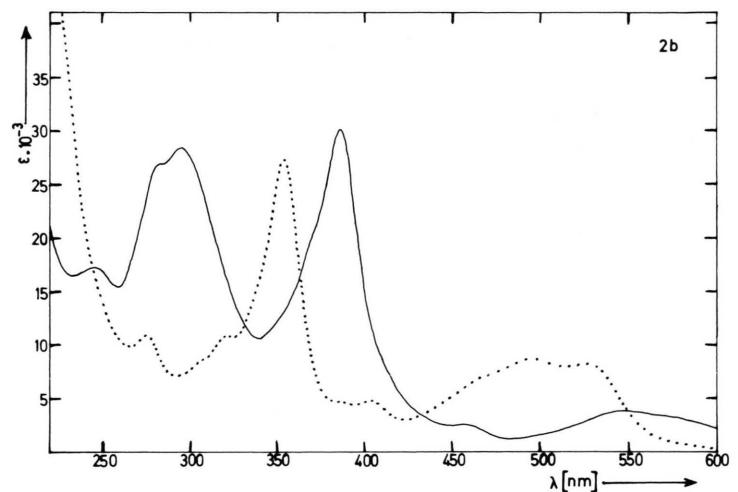


Abb. 2a–2d. Elektronenspektren (2a–2c) einiger Co(I)-Corrinoide (—) und Co(III)-Corrinoide (.....) und CD-Spektrum (2d) von Co(I)-Cobalamin. 2a, Cobalamin; 2b, Cobyrnsäure; 2c, Pseudovitamin B_{12} . Reduktion zur Co(I)-Form erfolgte durch Zusatz von NaBH_4 (Endkonzentration $8,73 \times 10^{-3} \text{ M}$) in N_2 -Atmosphäre. In Abb. 2a (—) wird gezeigt, daß NaBH_4 ($8,73 \times 10^{-3} \text{ M}$) in Wasser im gemessenen Bereich nicht absorbiert.



des Cyanocobalamins (Abb. 1) ist wohl auf den betont stufenweisen Ablauf der Reaktion zurückzuführen, in deren Verlauf B_{12r} als Zwischenprodukt auftritt (vor Erreichen des Plateau treten stark ausgeprägte Absorptionsmaxima des B_{12r} bei 310 nm und 473 nm auf). Das intermediäre Auftreten von B_{12r} bei der Reduktion von Cyanocobalamin wurde erstmals von Hill *et al.* [5] beobachtet.

Der ausgesprochen lineare Verlauf der Reduktion von Faktor III spricht dafür, daß hier beide Reaktionen, Bildung von Co(II)-Faktor III und von Co(I)-Faktor III, rasch nacheinander ablaufen. Entsprechend dieser Annahme beobachtete man hier während der Reaktion nur sehr schwach angedeutete Absorptionsmaxima von Co(II)-Faktor III.

Faszinierend ist die außerordentlich rasche Reduktion des Aquacobalamins (Abb. 1). Sie ent-

Tab. I. Absorptionsdaten einiger Co(I)-Corrinoide (stets $23,9 \times 10^{-6}$ M in H_2O in Gegenwart von $NaBH_4$ ($8,73 \times 10^{-3}$ M). pH der Lösung etwa 8,8. Sch. = Schulter.

λ_{\max} [nm]	$\epsilon \cdot 10^{-3}$	λ_{\min} [nm]	$\epsilon \cdot 10^{-3}$
Co(I)-Cobalamin (B_{12s})			
248	22,3	230	16,3
281,5	30,3	263	18,7
288	30,8	285	29,7
387,5	30,2	342	9,7
458	2,4	488	0,9
552	3,3		
Co(I)-Cobyrnsäure			
245	17,3	233	16,4
282	26,9	259	15,4
294,5	28,5	340	10,7
386	30,2	485	1,3
458	2,6		
550	3,8		
Co(I)-Faktor A			
247	24,4	235	22,9
281	34,4	259	22,6
387,5	30,0	342	10,9
458	3,0	488	1,4
552	3,5		
Co(I)-Pseudovitamin B_{12}			
248	23,7	234	21,4
280	33,4	258	23,3
295 (Sch.)	28,8	342	10,9
387	30,0	488	1,6
458	3,0		
552	3,6		
Co(I)-Faktor III			
248	24,5	235	21,9
285 (Sch.)	30,0	255	19,2
295	32,2	342	10,8
387,5	30,6	488	1,3
458	2,8		
552	3,3		

spricht grob dem Reaktionsablauf der Cyanoaquacobyrnsäure (obwohl einige Details der Reaktionskurven in beiden Fällen verschieden sind). Wahrscheinlich ist Wasser als Ligand leicht austauschbar gegen das Hydridion. Pseudovitamin B_{12} und Faktor A verhalten sich in Bezug auf die Reaktionskinetik ähnlich wie Aquacobalamin und Cobyrnsäure, Faktor A wird allerdings deutlich langsamer (als Pseudovitamin B_{12}) reduziert, entsprechend seiner stärkeren koordinativen Bindung [6] zur Nucleotidbase. Es ist möglich, daß die oft beim Menschen beobachtete längere Verweilzeit des Aquacobalamins (verglichen mit Cyanocobalamin) [7] auf dessen relativ schnelle Reduktion und Deponierung in der Zelle zurückzuführen ist.

Elektronenspektren der Co(I)-Corrinoide

Aus dem Auftreten der Maxima des 5,6-Dimethylbenzimidazols bei 282 nm und 288 nm im Elektronenspektrum des B_{12s} (Abb. 2 a) wurde geschlossen, daß hier das Kobaltatom tetrakoordiniert und unfähig ist, Axialliganden zu binden [8]. Eine der Möglichkeiten, die Richtigkeit dieser Annahme zu prüfen, ist die Untersuchung und Vergleich der Co(I)-Spektren mehrerer B_{12} -Formen. Die Spektren müssen, wenn diese Annahme richtig ist, im Wellenlängenbereich von etwa 300 nm bis 600 nm identisch sein, sie müssen ferner bei $\lambda < 300$ nm einige Details des (hier nicht koordinierten) Nucleosidanteils wiedergeben. Aus Abb. 2 und Tab. I ist ersichtlich, daß dies der Fall ist. Die im Wellenlängenbereich von 300–600 nm gefundenen Maxima und Minima sind bei den untersuchten Corrinoiden weitgehend gleich. Aus den fünf gemessenen Co(I)-Corrinoiden ergibt sich für das Hauptmaximum des Elektronenspektrums der mittlere Wert $\epsilon_{387 \text{ nm}} = 30 \times 10^3$. Die Spektrenunterschiede im kurzweligen Bereich ($\lambda < 300$ nm) sind auf die Nucleosidanteile der Corrinoide zurückzuführen. Diese sind nicht koordiniert, da die ϵ -Werte der Co(I)-Corrinoide sich aus den entsprechenden ϵ -Werten der Co(I)-Cobyrnsäure (Abb. 2 b) und der jeweiligen Nucleoside weitgehend additiv zusammensetzen.

CD-Spektren der Co(I)-Corrinoide

Die CD-Spektren der Co(I)-Corrinoide (Tab. II) sind, ähnlich wie die Elektronenspektren, im Wellenlängenbereich von etwa 300–670 nm einander fast gleich, ihre Unterschiede im kurzweligen Be-

λ_{\max} [nm]	$\Delta\epsilon$	λ_{\max} [nm]	$\Delta\epsilon$	λ_{\max} [nm]	$\Delta\epsilon$
Cyanocobalamin					
228,5	+ 15,5	251	- 9,9	235	- 11,3
250	- 13,3	265 (Sch.)	- 1,9	250	- 10,7
276,5	+ 5,6	279	- 0,9	305,5	+ 17,1
293 (Sch.)	+ 1,9	308,5	- 13,8	351,5	+ 3,9
308,5	- 3,0	325	- 9,4	386	- 17,3
325,5	- 5,1	350,5	- 13,1	420	- 7,3
363,5	- 20,5	369	- 12,0	462	- 3,7
387,5	+ 0,7	398	+ 21,7	533,5	- 1,5
433	+ 15,1	427	+ 13,5	603	+ 11,1
484	- 5,2	500	- 3,2	667	- 6,8
550	- 2,5	532 (Sch.)	- 2,5		
		580	- 1,9		
Monocyano-Faktor III					
227	+ 15,2	251	- 12,3	233	- 13,8
249,5	- 11,4	265 (Sch.)	- 2,8	252,5	- 11,4
274,5	+ 4,7	280,5	- 2,5	303	+ 17,2
290	+ 3,1	308	- 16,1	351	+ 4,0
310	- 7,1	324	- 9,9	386,5	- 19,3
325	- 7,0	350	- 13,5	421,5	- 8,4
363	- 18,5	368,5	- 11,0	462,0	- 4,0
387	+ 1,1	398	+ 22,9	532	- 1,6
433	+ 15,0	425,5	+ 13,9	600,5	+ 12,8
484	- 5,1	500	- 3,5	668	- 6,4
548	- 2,1	532 (Sch.)	- 2,9		
		580	- 2,3		
Monocyano-Faktor A					
247	- 7,5	250	- 14,1	247,5	- 12,1
270,5	- 5,9	265 (Sch.)	- 4,9	305	+ 15,1
290 (Sch.)	- 3,6	278,5	- 4,5	351	+ 4,1
310	- 7,7	307	- 16,9	387	- 19,3
321,5	- 10,0	323,5	- 10,5	420	- 8,8
348	- 9,7	349,5	- 12,9	462	- 5,4
364,5	- 14,0	368	- 9,4	532	- 2,6
385,5 (Sch.)	- 0,9	397,5	+ 20,4	600,5	+ 10,3
431	+ 14,0	426	+ 12,3	669	- 8,2
483	- 6,9	500	- 3,3		
503 (Sch.)	- 6,4	432 (Sch.)	- 2,4		
548	- 3,3	580	- 1,6		
Monocyano-Faktor Ib					
228,5	+ 6,7	250	- 13,8	232	- 9,4
252	- 12,8	265 (Sch.)	- 4,3	248,5	- 8,9
304,5	- 5,3	280	- 3,3	300,5	+ 18,7
319	- 5,1	307,5	- 14,0	350	+ 3,7
335 (Sch.)	+ 0,8	324	- 7,6	386,5	- 22,9
325,5	+ 5,4	350	- 11,4	418	- 9,4
368,5	- 2,1	368	- 9,2	461	- 4,8
388	- 2,6	397,5	+ 19,5	532	- 2,5
433,5	+ 10,2	426	+ 12,0	600	+ 11,9
492	- 5,2	498	- 3,3	667	- 7,7
550	+ 1,9	480	- 1,6		

Tab. II. CD-Spektren einiger Mono- und Dicyano-corrinoide und ihrer mittels NaBH_4 ($8,73 \times 10^{-3}$ M) dargestellten Co(I)-Formen in Wasser. Sch. = Schulter.

reich sind überwiegend auf den Einfluß des (hier nicht koordinierten) Nucleosidanteils zurückzuführen. Das CD-Spektrum des Co(I)-Cobalamins ist in Abb. 2 d enthalten. Es hat zwei markante Maxima, bei 305,5 nm ($\Delta\epsilon = +17,1$) und 603 nm ($\Delta\epsilon = +11,1$) und ein schwach positives Maximum bei

351,5 nm ($\Delta\epsilon = +3,9$). Außer den zwei starken negativen Maxima bei 386 nm ($\Delta\epsilon = -17,3$) und 667 nm ($\Delta\epsilon = -6,8$) sind fünf weitere (bei 235; 250; 420; 462 und 533,5 nm) zu finden.

Für die Zwecke der Dokumentation wurden zusätzlich die CD-Spektren der Monocyano- und Di-

cyanoformen der seltenen Corrinoide: Faktor III, Faktor A und Faktor Ib tabellarisch erfaßt (Tab. II). Die (bereits bekannten) CD-Spektren von Cyanoo- und Dicyanocobalamin [9] wurden erneut aufgenommen und werden hier zum Vergleich mitgeführt. Die CD-Spektren der Monocyanocorrinoide haben als gemeinsame Merkmale jeweils ein starkes negatives Maximum ($\Delta\epsilon = -7,5$ bis $-13,3$) bei etwa 250 nm, ein starkes positives Maximum ($\Delta\epsilon = +10,2$ bis $+15,1$) bei 433 nm und ein mittelstarkes negatives Maximum ($\Delta\epsilon = -5,2$ bis $-6,9$) bei 483–492 nm. Fast einander gleich sind die CD-Spektren der Dicyanocorrinoide (Tab. II). Dies ist wegen der

Identität der Axialliganden (beide sind CN) verständlich. Die CD-Spektren zeichnen sich aus durch ein markantes positives Maximum ($\Delta\epsilon = +19,5$ bis $+22,9$) bei 398 nm, ein schwächeres positives Maximum ($\Delta\epsilon = +12,0$ bis $+13,9$) bei etwa 426 nm und mehrere negative Maxima.

Acknowledgements

Die CD-Spektren wurden im Institut von Herrn Prof. Dr. G. Snatzke, Bochum, aufgenommen, wofür ihm der Verfasser zu Dank verpflichtet ist.

- [1] W. Friedrich, Vitamin B₁₂ und verwandte Corrinoide, **Bd. III/2**, S. 46 ff. (R. Ammon u. W. Dirschedl, Hrsg.), Thieme-Verlag, Stuttgart 1975.
- [2] J. M. Pratt, Inorganic Chemistry of Vitamin B₁₂, S. 107 ff., Academic Press, New York 1972.
- [3] B. M. Babior (Hrsg.), Cobalamin, Biochemistry and Pathophysiology, S. 53 ff. Wiley 1975.
- [4] W. Friedrich, K. Bernhauer, Medizinische Grundlagenforschung, **Bd. II**, S. 671, (K. Fr. Bauer, Hrsg.), Thieme-Verlag, Stuttgart 1959.
- [5] J. A. Hill, J. M. Pratt u. R. J. P. Williams, J. Theor. Biology 3, 423 (1962).
- [6] Zit. 4, S. 661.
- [7] Zit. 1, S. 328.
- [8] Zit. 1, S. 102.
- [9] R. Bonett, J. M. Godfrey u. V. B. Math, J. Chem. Soc. (London) 1973, 253.