



УДК 615.857.064.16

КООРДИНАЦИОННАЯ ИЗОМЕРИЯ В РЯДУ
ФТОРАЛКИЛКОБАЛАМИНОВ **Тачкова Е. М., Рудакова И. П., Мяснищева Н. В.,
Юркевич А. М.**Всесоюзный научно-исследовательский витаминный институт,
Институт экспериментальной и клинической онкологии
Академии медицинских наук СССР, Москва*

Восстановлением циан- или оксикобаламина до нуклеофильного коб(II)аламина и последующим алкилированием его фреонами получены β -фторалкилкобаламины и их координационные изомеры — α -фторалкилкобаламины, разделенные хроматографией на СМ-целлюлозе. Для доказательства строения проведено изучение спектрофотометрических, электрофоретических и хроматографических свойств полученных пар изомеров. Предлагается использовать метод КД-спектроскопии для отнесения органокобаламинов к одному из типов (α или β) координационных изомеров.

Одну из важнейших групп ферментативных реакций, протекающих с участием корриноидов, составляют реакции трансметилирования. При их изучении обнаружено образование Со-метилкорриноидов как промежуточных переносчиков метильной группы [2, 3].

Согласно современным представлениям, в процессах нормального метаболизма клеток первостепенным является синхронность взаимодействия соединений группы фолиевой кислоты и витамина В-12 [4, 5]; недостаток последнего вызывает нарушения клеточного деления [6, 7] и изменение биосинтеза ДНК в клетках. В появившихся в последнее время работах указывается на искажение нормальных процессов трансметилирования при опухолевом росте [8, 9]. Исследования Н. В. Мяснищевой с сотр. [10] показали стимулирующее действие метилкобаламина на пролиферативную активность клеток клеточной ткани. Все это указывает на целесообразность поисков активных антагонистов метилкобаламина для блокирования биохимических реакций, протекающих с его участием.

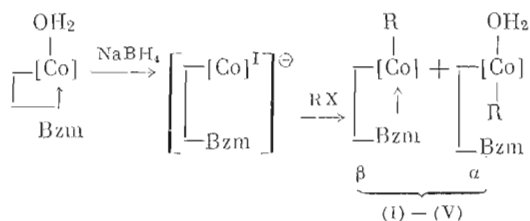
В данной работе мы сообщаем о синтезе и свойствах некоторых фторалкилкобаламинов и их координационных изомеров.

Ранее Вуд показал [11, 12], что фреонами можно алкилировать коб(II)аламин, полученный восстановлением цианкобаламина цинком в 10%-ном растворе хлористого аммония. Выделение фторалкилкобаламинов проводилось хроматографией на фосфате целлюлозы и на DEAE-целлюлозе. Так были получены дифтор-, дифторхлор-, дихлордифтор- и трифторметилкобаламины. Вуд с сотрудниками показал также, что в реакциях полигалактоидных углеводов с витамином В-12 атомы хлора,

* Предварительное сообщение см. [1].

брома и иода могут замещаться на атомы металла, тогда как атом фтора не может. Так, коб(І)аламин не реагирует с трифторметаном.

Мы подробно изучили взаимодействие фреонов с нуклеофильным коб(І)аламином, полученным восстановлением циан- или оксикобаламина боргидридом натрия. Выделение продуктов реакции проводилось хроматографией на СМ-целлюлозе:



где Bzm — α -(5,6-диметилбензимидазол)рибонуклеотид, $\left[\begin{array}{c} \text{ } \\ \text{ } \\ \text{ } \end{array} \right]$ — корриновый макроцикл витамина В-12,

(I) R = CF₂Cl, X = Cl,

(II) R = CF₂H, X = Cl,

(III) R = CH₃, X = J,

(IV) R = C₃F₇, X = J,

(V) R = CF₃, X = J.

По данным бумажной хроматографии и электрофореза, синтезированные β -фторалкилкобаламины были индивидуальны и по своим физико-химическим свойствам соответствовали соединениям, описанным Вудом [12].

При хроматографическом разделении продуктов реакции на СМ-целлюлозе после элюирования водой соответствующих фторалкилкобаламинов остается оранжево-желтая зона корриноидов. «Желтые» корриноиды, элюированные 0,2%-ной водной уксусной кислотой, были также индивидуальны при ВХ и электрофорезе (см. «Экспериментальную часть»), но отличались по подвижности от соответствующих основных фракций фторалкилкобаламинов, элюированных водой. Вероятно, в этой реакции помимо нормальных β -изомеров образуются координационные α -изомеры фторалкилкобаламинов, имеющие фторалкильную группу в «нижнем» аксиальном положении.

В 1968 г. Фридрих и Нордмайер [13] обнаружили явление координационной изомерии у метилкобаламина, ранее установленное Фридрихом [14] для цианаквакорриноидов.

Анализ спектра поглощения витамина В-12_s [15] показал, что в этом корриноиде 5,6-диметилбензимидазольная часть не координирована, поэтому нуклеофильный кобальт может быть атакован метилкатионом с обеих сторон корринового кольца с образованием α - и β -изомеров метилкобаламина.

α -Изомер метилкобаламина, имея метильную группу в α -положении, обладает некоординированной 5,6-диметилбензимидазольной частью и поэтому: 1) у него рН-независимый спектр поглощения, сходный со спектром β -метилкобаламина в кислой среде (вещество «желтое»), 2) более высокая основность (рК 4,7) по сравнению с β -метилкобаламином (рК 2,72) и 3) при облучении светом лампы накаливания он превращается в оксикобаламин [13].

Для подтверждения строения полученных α -изомеров фторалкилкобаламинов мы синтезировали тем же способом α -метилкобаламин. Его спектральные, электрофоретические и хроматографические характеристики соответствовали описанным в литературе [16].

«Желтые» корриноиды, выделенные в наших опытах, отличались от соответствующих основных фракций фторалкилкобаламинов по спектрам КД и спектрам поглощения в УФ- и видимой области.

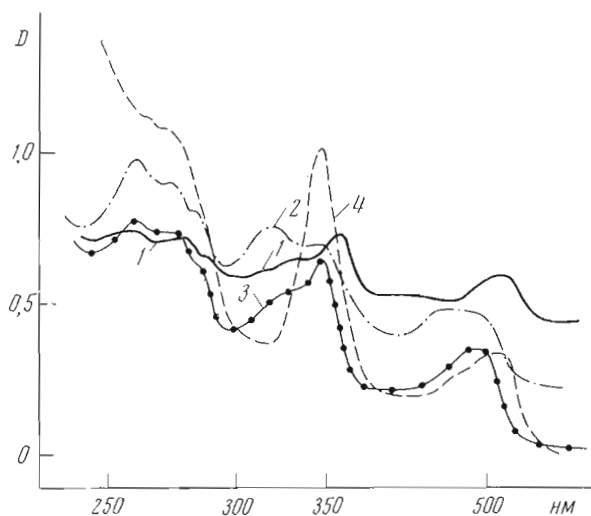


Рис. 1. Спектры поглощения: 1 — β -диформетилкобаламина ($\text{II}\beta$) в воде; 2 — ($\text{II}\beta$) в 0,1 н. HCl ; 3 — ($\text{II}\alpha$) в воде; 4 — ($\text{II}\beta$) после облучения (оксикобаламин)

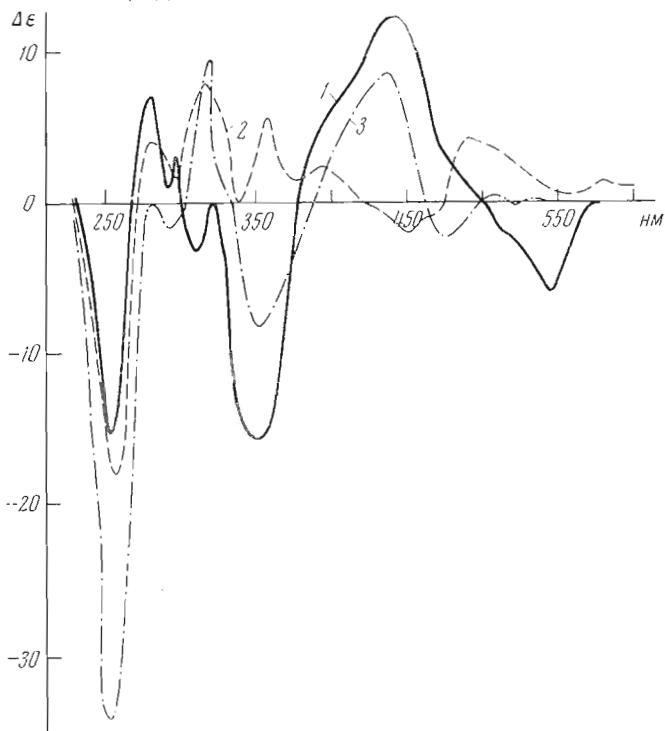


Рис. 2. Спектры КД: 1 — β -диформетилкобаламина ($\text{II}\beta$) в 0,2 М фосфатном буфере; 2 — ($\text{II}\alpha$) в фосфатном буфере; 3 — ($\text{II}\beta$) в 0,1 н. HCl

Если в спектрах поглощения основных фракций наблюдались максимумы 260, 276, 288, 325, 355—365 (в зависимости от фторалкильной группы), 520 нм (см. «Экспериментальную часть»), то в спектрах «желтых» соединений — 260, 275, 285, 325, 350, 490 нм, что позволяет сделать вывод об отсутствии координации $\text{Co}-\text{N}_{\text{Bzm}}$ во втором случае. При подкислении первой фракции 0,1 М соляной кислотой появлялись дополнительный максимум при 320 нм и гипсохромное смещение 520 \rightarrow 460 нм, у вторых же

Фракций спектр в области более 300 нм при подкислении не менялся (рис. 1). β -Метилкобаламин имеет в воде $\lambda_{\text{макс}}$ 264, 276, 286, 305, 340, 520 нм, после подкисления — 264, 276, 286, 305, 462 нм; для α -метилкобаламина в обеих средах $\lambda_{\text{макс}}$ 264, 277, 286, 308, 492 нм. Некоторые различия в спектрах α -изомеров метил- и фторалкилкобаламинов, по-видимому, вызваны влиянием атомов фтора в алкильном лиганде.

Исследование спектров кругового дихроизма некоторых производных витамина В-12 [17] показало, что спектры КД более чувствительны к изменениям в аксиальных лигандах, чем спектры поглощения. Согласно Пратту с сотр. [18], между экстремумами спектров КД и соответствующими полосами в спектре поглощения существует корреляция.

При сопоставлении спектров КД соответствующих пар изомеров метилкобаламина и фторалкилкобаламинов мы обнаружили для каждой пары инверсию экстремумов в области 300—600 нм. Это особенно характерно для фторалкилкобаламинов.

Сравнение спектров КД* «желтых» фторалкилкобаламинов со спектрами КД соответствующих β -изомеров показало, что этот метод может быть использован для отнесения органокобаламинов к одному из типов координационных изомеров (α или β).

Ни одна известная до сих пор [18, 19] модификация в ряду органокобаламинов не приводила к такому резкому изменению в спектре КД, как в случае α - и β -координационных изомеров метилкобаламина и изученных нами фторалкилкобаламинов (см. рис. 2 и «Экспериментальную часть»). Спектр КД β -изомера в 0,1 н. соляной кислоте имел сходство со спектром КД α -изомера в области 300—350 нм, но существенно отличался от него в области 350—600 нм. Таким образом, вклад в спектр КД, связанный с координационной связью $\text{Co}-\text{N}_{\text{Взм}}$, по-видимому, наиболее значителен в области 300—350 нм ($\lambda_{\text{экстр}}$ 317 нм).

По литературным данным, константа диссоциации (pK_a) бензимидазольного лиганда [12] для дифторметилкобаламина составляет 2,50, для хлордифторметилкобаламина — 2,43, для трифторметилкобаламина — 2,13. Значение pK_a для дифторметилкобаламина, определенное нами спектрофотометрически, совпало с литературными данными. Поскольку определение pK_a α -изомеров спектрофотометрически невозможно, мы применили электрофоретический метод определения. Для α -дифторметилкобаламина (II α) pK_a составил 4,67, для α -перфторпропилкобаламина (IV α) — 4,75, что также подтверждает строение этих соединений.

Фотолиз растворов α - и β -изомеров всех фторалкилкобаламинов привел к образованию оксикобаламина, что было установлено спектрофотометрическим и хроматографическим сравнением продукта реакции с заведомым образцом оксикобаламина.

При электрофорезе в 0,03 М ацетатном буфере ($\text{pH} \sim 7$) (система В) метил- и фторалкилкобаламины, а также их α -изомеры остаются нейтральными (как и витамин В-12) (см. «Экспериментальную часть»). При электрофорезе в 1 М уксусной кислоте (система А) наиболее высокой подвижностью из всех β -фторалкилкобаламинов обладает перфторпропилкобаламин, наиболее низкой — перфторметилкобаламин, остальные кобаламины имеют промежуточную между ними подвижность, что свидетельствует о различной степени ионизации кобаламинов в сильнокислом буфере. В кислой среде все α -изомеры имеют приблизительно одинаковую подвижность, что, очевидно, обусловлено отсутствием координационной связи $\text{Co}-\text{N}_{\text{Взм}}$.

При электрофорезе в основной системе С все изученные β -изомеры ведут себя так же, как и факторы В и В-12 Nm, т. е. остаются электронейтральными [16], тогда как α -изомеры с различной скоростью движутся

* Авторы приносят благодарность В. М. Гуревичу за снятие спектров КД.

к аноду. При этом подвижность α -метилкобаламина меньше подвижности витамина В-12, а подвижность α -фторалкилкобаламинов несколько выше.

При бумажной хроматографии в нескольких системах все β -изомеры имеют большие значения R_f , чем соответствующие α -изомеры.

Известно [11, 12], что аналоги метилкобаламина, содержащие вместо метильной группы CFCl_2 , CF_2Cl , CF_3 , являются конкурентными ингибиторами метилкобаламина в ферментативном образовании метана экстрактами клеток метаногенных бактерий.

При предварительном испытании основных фракций фторалкилкобаламинов обнаружено их тормозящее действие на рост клеток ауксотрофного по витамину В-12 и метионину штамма *E. coli* [10].

Несмотря на то что в эксперименте с *E. coli* и *O. malnamensis* α -изомер метилкобаламина оказался практически неактивным по сравнению с β -метилкобаламином [20], в опытах с глицериндегидратазой выявлена высокая степень сродства к В-12-зависимым ферментам других синтезированных нами аналогов [21, 22], связанная со строением корриновой макроциклической системы. Поэтому изучение α -изомеров Со — С-корриноидов может дать весьма существенные результаты для понимания механизма действия В-12-зависимых ферментов.

Экспериментальная часть

БХ проводили на бумаге FN11 (VEB, ГДР) в системах: 1) *n*-бутанол — *изо*-пропанол — вода — CH_3COOH , 100 : 70 : 99 : 1, 2) *втор*-бутанол — вода, 95 : 40, 3) *n*-бутанол — CH_3COOH — вода, 4 : 1 : 5 (верхняя фаза), электрофорез — на бумаге FN11 в системах: А — 1 н. CH_3COOH , В — 0,03 М CH_3COONa (рН 7), С — 0,05 М NaHCO_3 в воде с добавкой 100 мг/л KCN (рН 8,5). Подвижности при БХ даны относительно витамина В-12 ($R_{\text{В-12}}$). Подвижности при электрофорезе в системах А и В ($E_{\text{В-12a}}$) даны относительно В-12 ($E_f = 0$) и В-12а ($E_f = 1$), в системе С ($E_{\text{В-12нм}}$) — относительно В-12 ($E_f = 1$) и В-12 Nm ($E_f = 0$).

Спектры поглощения в УФ- и видимой области записывали на спектрофотометрах «Hitachi-124» (Япония) и «Zeiss Specord» (ГДР), количественные спектры поглощения — на спектрофотометре «Pye Unicam SP 800» (Англия), спектры КД — на спектрополяриметре «JASCO» ORD/UV-5 (Япония) в 0,2 М калийфосфатном буфере (рН 8) и в 0,1 М соляной кислоте*.

Хлордифторметилкобаламин (I). К раствору 400 мг витамина В-12 в 7 мл 10%-ного этанола, продутому в течение 40 мин аргоном, добавляли раствор 150 мг NaBH_4 в 5 мл воды, реакционный раствор при этом становился серовато-синим. Перемешивали 1,5 ч, затем в реакционную массу в течение 50 мин пропускали фреон 12 (CF_2Cl_2) (около 30 мл сжиженного), реакционный раствор становился красным. Разбавляли смесь водой до объема 50 мл, подкисляли ледяной CH_3COOH до рН ~ 5 и экстрагировали смесью фенол — хлороформ, 1 : 1 (5×4 мл). К полученному экстракту добавляли 10-кратный объем эфира и извлекали водой (5×4 мл). Водный экстракт промывали эфиром (2×20 мл) и наносили на колонку с СМ-целлюлозой в H^+ -форме (350×30 мм). Водой элюировали непрореагировавший витамин В-12, затем (в виде оранжевой полосы) 300 мг (75%) β -изомера хлордифторметилкобаламина (I β). Далее 0,2%-ной CH_3COOH элюировали небольшое количество оксикобаламина и сразу за ним 40 мг (10%) оранжево-желтого α -изомера соединения I (I α) (элюаты лиофилизировали в вакууме). УФ-спектры: (I β): $\lambda_{\text{макс}}$ 275, 363, 520 нм ($\epsilon \cdot 10^{-3}$ 17,2; 26,8; 8,1); (I α): $\lambda_{\text{макс}}$ 256, 346, 490 нм ($\epsilon \cdot 10^{-3}$ 1,31; 1,05; 0,60). Спектры КД: (I β): $\lambda_{\text{экстр}}$ 250, 276, 347, 440, 540 нм ($\Delta\epsilon$ —15,2; +7,8; —22,8; +16,4; —7,0); (I α): 260, 316, 360, 450, 491 нм ($\Delta\epsilon$ —25,5; +7,0; +4,6;

* Фреоны CF_2HCl , CF_3I и $\text{C}_3\text{F}_7\text{I}$ были любезно предоставлены нам д-ром хим. наук Б. Л. Дяткиным и д-ром хим. наук Л. С. Германом.

—0,9; +5,6). БХ: R_{B-12} в системе 1: (I α) 1,18, (I β) 1,24; в системе 2: (I α) 1,1, (I β) 1,4, в системе 3: (I α) 1,09, (I β) 1,25. Электрофорез: E_{B-12a} в системе А: (I α) 0,93, (I β) 0,23; в системе В: (I α) 0, (I β) 0; $E_{B-12N_{III}}$ в системе С: (I α) 1,09, (I β) 0.

Дифторметилкобаламин (II). Соединение получали так же, как и хлордифторметилкобаламин(I): из 500 мг витамина В-12 восстановленном его до коб(II)амина с последующим пропусканьем фреона 22(CF₂HCl). Выход β -изомера (II β) 150 мг (30%), α -изомера (II α) — около 50 мг (10%). (УФ-спектры (II β) и (II α) — см. рис. 1; спектры КД — см. рис. 2.) БХ: R_{B-12} в системе 1: (II β) 1,23, (II α) 1,21; в системе 2: (II β) 1,38, (II α) 0,97; в системе 3: (II β) 1,38, (II α) 1,18. Электрофорез: E_{B-12a} в системе А: (II β) 0,15, (II α) 0,76; в системе В: (II β) 0, (II α) 0; $E_{B-12N_{III}}$ в системе С: (II β) 0, (II α) 1,19, в 0,03 М ацетатном буфере (рН 4,67) (II α) электронейтрален.

Метилкобаламин (III). Получен аналогичным способом: раствор 400 мг витамина В-12 в 6 мл 10%-ного этанола восстанавливали 140 мг NaBH₄ в 5 мл воды. К смеси добавляли 4 мл CH₃I и перемешивали около 1 ч. Дальнейшая обработка — как при получении соединений (I) и (II). Получали 380 мг (95%) метилкобаламина (III β) и около 15 мг (~ 4%) изомера (III α). Спектры КД: (III α): $\lambda_{экстр}$ 260, 292, 330, 356, 383, 454, 506 нм ($\Delta\epsilon$ —24,5; +2,51; +9,5; —4,6; +4,4; —7,4; +15,8); (III β): $\lambda_{экстр}$ 262, 276, 320, 336, 360, 384, 426, 485 нм ($\Delta\epsilon$ —10,2; +5,0; —4,4; +1,3; —6,3; +10,0; —3,7; +15,3; —3,7). БХ: R_{B-12} в системе 1: (III β) 1,26, (III α) 1,32, в системе 2: (III β): 1,30, (III α) 1,17; в системе 3: (III β) 1,23, (III α) 1,16. Электрофорез: E_{B-12a} в системе А: (III β) 0,56, (III α) 0,91, в системе В: (III β) 0, (III α) 0; $E_{B-12N_{III}}$ в системе С: (III β) 0, (III α) 0,36.

Перфторпропилкобаламин (IV). К раствору 200 мг витамина В-12а в 40 мл воды, продутому аргоном в течение 45 мин, добавляли раствор 100 мг NaBH₄ в 3 мл воды. Цвет становился зеленовато-коричневым. Затем добавляли 3 мл иодистого перфторпропила и перемешивали в токе аргона 2,5 ч. Вещество выделяли так же, как и другие кобаламины. Получали 70 мг (35%) соединения (IV β) и около 5 мг (~ 2,5%) его изомера (IV α). УФ-спектры: (IV β): $\lambda_{макс}$ 278, 363, 520 нм ($\epsilon \cdot 10^{-3}$ 19,5; 27,2; 9,26), (IV α): $\lambda_{макс}$ 348, 458 нм ($\epsilon \cdot 10^{-3}$ 27,1; 13,0). Спектры КД: (IV β): $\lambda_{экстр}$ 250, 277, 298, 350, 444, 547 нм ($\Delta\epsilon$ —13,2; +14,0; +11,3; —8,5; +11,4; —4,9), (IV α): $\lambda_{экстр}$ 525, 454, 373, 348, 312, 284, 254 нм ($\Delta\epsilon$ +4,79; —11,0; —6,7; +11,3; +13,6; +6,25; —9,1). БХ: R_{B-12} в системе 1: (IV β) 1,25, (IV α) 1,15. Электрофорез: E_{B-12a} в системе А: (IV β) 0,78, (IV α) 0,93, в системе В: (IV β) 0, (IV α) 0, $E_{B-12N_{III}}$ в системе С: (IV β) 0, в 0,03 М ацетатном буфере (рН 4,75) (IV α) электронейтрален.

Трифторметилкобаламин (V). Соединение получали как и вещество (I). Восстанавливали 150 мг витамина В-12а, затем через смесь пропускали фреон CF₃J, кобаламин выделяли как описано выше. Получали 60 мг (40%) кобаламина (V β). УФ-спектр: $\lambda_{макс}$ 278, 358, 530 нм ($\epsilon \cdot 10^{-3}$ 21,8; 29,5; 12,7). Спектр КД: $\lambda_{экстр}$ 250, 278, 296, 355, 435, 546 нм ($\Delta\epsilon$ —16,5; +14,6; +7,2; —19,4; +19,7; —6,3). БХ: R_{B-12} 1,12 в системе 1. Электрофорез: E_{B-12a} 0,11 в системе А, 0 в системе В, $E_{B-12N_{III}}$ 0 в системе С.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рудакова И. П., Тачкова Е. М., Юркевич А. М. (1975) Тезисы докладов XII Всесоюзного Чугаевского совещания по химии комплексных соединений, с. 459.
2. Taylor R. T., Weissbach H. (1967) J. Biol. Chem., **242**, 1509—1516.
3. Taylor R. T., Weissbach H. (1969) Arch. Biochem. Biophys., **129**, 728—744.
4. Burke G. T., Mangum J. H., Brodie J. D. (1971) Biochemistry, **10**, 3079—3085.
5. Van der Weyden M. B., Cooper M., Firkin B. G. (1973) Blood, **41**, 299—308.
6. Wickramasinghe S. N., Chalmers D. G., Cooper E. H. (1967) Nature, **215**, 189—191.
7. Wickramasinghe S. N., Chalmers D. G., Cooper E. H. (1969) Acta haematol., **41**, 65—75.
8. Pegg A. E. (1971) FEBS Letters, **16**, 13—16.
9. Borek E. (1971) Cancer Res., **31**, 596—597.

10. Голенко О. Д., Мяснищева Н. В., Раушенбах М. О., Рудакова И. П., Тачкова Е. М., Юркевич А. М. (1974) *Вопр. мед. химии*, **20**, 549—554.
11. Wood J. M., Kennedy F. S., Wolfe R. S. (1968) *Biochemistry*, **7**, 1707—1713.
12. Penley M. W., Brown D. G., Wood J. M., Dennis G. (1970) *Biochemistry*, **9**, 4302—4310.
13. Friedrich W., Nordmeyer J. P. (1968) *Z. Naturforsch.*, **23b**, 1119—1120.
14. Friedrich W. (1965) *Biochem. Z.*, **342**, 143—160.
15. Beaven G. H., Johnson E. A. (1955) *Nature*, **176**, 1264—1265.
16. Friedrich W., Nordmeyer J. P. (1969) *Z. Naturforsch.*, **24b**, 588—596.
17. Legrand M., Viennet R. (1962) *Bull. Soc. chim. France*, 1435—1439.
18. Firth R. A., Hill H. A. O., Pratt J. M., Williams R. J. P., Jackson W. R. (1967) *Biochemistry*, **6**, 2178—2189.
19. Поспелова Т. А., Рудакова И. П., Юркевич А. М. (1975) *Биоорг. химия*, **1**, 779—786.
20. Kamikubo T., Takeda Y., Hayashi M., Friedrich W. (1972) *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 164—165.
21. Яковлев В. А., Познанская А. А., Просветова Н. К., Поспелова Т. А., Юркевич А. М. (1971) *Докл. АН СССР*, **197**, 230—234.
22. Просветова Н. К., Гусева А. С., Познанская А. А., Юркевич А. М., Яковлев В. А. (1974) *Биохимия*, **39**, 942—947.

Поступила в редакцию
14.VIII.1975

COORDINATION ISOMERISM IN A FLUOROALKYLCOBALAMINS SERIES

TACHKOVA E. M., RUDAKOVA I. P., MYASISHCHEVA N. V.,
YURKEVICH A. M.

*All-Union Institute for Vitamin Research, Moscow, Institute
of Experimental and Clinical Oncology, Academy of Medical
Sciences of the USSR, Moscow*

The synthesis and physico-chemical properties of fluoroalkylcobalamins and their coordination isomers have been described. Spectrophotometric, electrophoretic and chromatographic techniques have been employed to prove the structures of the obtained isomeric pairs. The use of CD spectroscopy has been proposed for assigning organocobalamins to one of the two types (α or β) of coordination isomers.
