

## 291. Wilhelm Friedrich und Konrad Bernhauer: Beiträge zur Chemie und Biochemie der „Cobalamine“, I. Mittel.: Über die Alkylierung von B<sub>12</sub>-Faktor III und Vitamin B<sub>12</sub>

[Aus dem Biochemischen Forschungslaboratorium der Aschaffenburger Zellstoffwerke A. G., Stockstadt a. M.]

(Eingegangen am 5. Mai 1956)

Die Alkylierung des phenolischen Hydroxyls des B<sub>12</sub>-Faktors III gelingt mittels Dialkylsulfaten oder Arylsulfonsäure-alkylestern. Die 5-Methoxy- und 5-Äthoxy-benzimidazol-cobalamin-Analogen des Faktors III werden in krist. Form gewonnen und charakterisiert.

Es wird eine allgemeine Methode zur Alkylierung von Benzimidazolcobalaminen am N<sup>3</sup>-Atom des Basenanteils beschrieben, die in der Einwirkung von Dimethylsulfat auf die betreffenden Cobalamin-Arten in Gegenwart von CN<sup>⊖</sup>-Ionen besteht. Die Cobalamin-Analogen mit 3.5.6-Trimethyl-benzimidazol, 3-Methyl-5-hydroxy-benzimidazol und 3-Methyl-5-methoxy-benzimidazol werden hergestellt und näher charakterisiert.

Die Struktur der neuen Cobalamin-Analogen wird durch ihren hydrolytischen Abbau zu den Nucleotiden und Basen sichergestellt. Die beiden durch Methylierung von Faktor III in Gegenwart von CN<sup>⊖</sup>-Ionen dargestellten Faktoren ergaben beim hydrolytischen Abbau 1-Methyl-6-hydroxy-benzimidazol. Daraus ergibt sich, daß im nativen Faktor III das Hydroxyl des Benzimidazol-Anteils in Stellung 5 zur Zuckerkomponente sich befindet.

Der Vitamin B<sub>12</sub>-Faktor III unterscheidet sich vom klassischen Vitamin B<sub>12</sub> dadurch, daß er als Basenanteil 5-Hydroxy-benzimidazol enthält<sup>1-6)</sup>, während Vitamin B<sub>12</sub> als Basenanteil 5.6-Dimethyl-benzimidazol besitzt. Durch das Vorhandensein eines phenolischen Hydroxyls nimmt der Faktor III eine Sonderstellung unter allen bisher bekannt gewordenen Cobalamin-Arten ein. Es bietet sich dadurch die Möglichkeit, durch Substitutionen an diesem Hydroxyl die mannigfachsten Umsetzungsprodukte des Faktors III herzustellen und deren biologische Eigenschaften zu prüfen.

Die Alkylierung des Faktors III an der phenolischen Hydroxyl-Gruppe geht mit Hilfe der üblichen Alkylierungsmittel überraschend leicht vor sich, ohne daß dabei Nebenprodukte entstehen. Die Hydroxyl-Gruppen des Ribose-Anteils werden nicht angegriffen.

Bei der Einwirkung von Dimethylsulfat, Benzol- oder *p*-Toluolsulfonsäuremethylester auf Faktor III in wäßriger, schwach alkalischer Lösung bei 37° erhält man in guter Ausbeute das 5-Methoxy-benzimidazol-cobalamin in prächtigen rubinroten Nadeln (nachfolgend kurz als „Faktor III m“ bezeichnet). Der Strukturbeweis wurde in folgender Weise erbracht:

1. Vitamin B<sub>12</sub> wird unter den gleichen Bedingungen nicht angegriffen (s. Tafel 1).

<sup>1)</sup> W. Friedrich u. K. Bernhauer, *Angew. Chem.* **65**, 627 [1953].

<sup>2)</sup> W. Friedrich u. K. Bernhauer, *Z. Naturforsch.* **9 b**, 686 [1954].

<sup>3)</sup> W. Friedrich u. K. Bernhauer, *Angew. Chem.* **67**, 619 [1955].

<sup>4)</sup> W. Friedrich u. K. Bernhauer, *Z. Naturforsch.* **11 b**, 68 [1956].

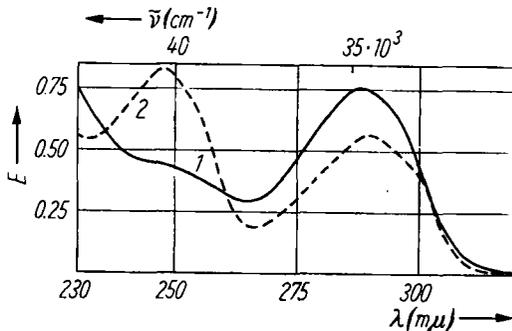
<sup>5)</sup> F. M. Robinson, I. M. Miller, J. F. McPherson u. K. Folkers, *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 5192 [1955]. <sup>6)</sup> W. Friedrich u. K. Bernhauer, *Angew. Chem.* **68**, 439 [1956].

Tafel 1. Verlauf der Methylierung von Vitamin B<sub>12</sub> und Faktor III mit Dimethylsulfat, abhängig von p<sub>H</sub> und CN<sup>⊖</sup>-Konzentrationen

Eingesetzter B <sub>12</sub> -Faktor	Puffer-substanz	CN <sup>⊖</sup> -Quelle	p <sub>H</sub> n. d. Reaktion	Entstandene B <sub>12</sub> -Faktoren geschätzt in %		
				B <sub>12</sub> Nm		
Vitamin B <sub>12</sub>	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	HCN NaCN ohne	9.3	40	40	0.0
	NaHCO <sub>3</sub>	HCN NaCN ohne	8.3	95	95	0.0
				F III <sub>m</sub>	F III <sub>Nm</sub>	F III <sub>mNm</sub>
Faktor III	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	HCN NaCN ohne	9.3	20 20 70	15 15 Spur ?	15 15 Spur ?
	NaHCO <sub>3</sub>	HCN NaCN ohne	8.3	Spur ? Spur ? 15	30 30 Spur ?	65 65 Spur ?

2. Faktor III<sub>m</sub> gibt beim Abbau mit 70-proz. Perchlorsäure Ätiocobalamin (Faktor B, Faktor I) und ein Nucleotid.

3. Aus dem Absorptionsspektrum des Nucleotides des Faktors III<sub>m</sub> (s. Abbild.1) ist ersichtlich, daß kein freies phenolisches Hydroxyl vorhanden ist.



Abbild. 1. Absorptionsspektrum des Nucleotides des Faktors III<sub>m</sub> in Wasser bei p<sub>H</sub> 1.0 (1), bei p<sub>H</sub> 8.0 und 12.0 (2)

Es fehlt nämlich die für das Nucleotid des Faktors III charakteristische Bandenverschiebung von 290 mμ auf 316 mμ beim Übergang ins alkalische Gebiet (s. Tafel 4).

4. Beim Abbau des Nucleotides des Faktors III<sub>m</sub> mit 6*n* HCl bei 150° erhält man 5-Hydroxy-benzimidazol.

Bei der Einwirkung von Diäthylsulfat auf Faktor III, im übrigen unter völlig gleichen Bedingungen wie bei Verwendung von Dimethylsulfat, erhält man

Tafel 2. Eigenschaften der Alkylierungsprodukte von Vitamin B<sub>12</sub> und Faktor III

B <sub>12</sub> -Faktor	Papierchromatographie in verschiedenen Entwicklern <sup>a)</sup>								Verteil.- Koeff. = 1 bei % (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> c)		
	wasserges. sek.-Butanol		sek.-Butanol + NH <sub>3</sub> b)		wasserges. sek.-Butanol + 1% Kalignost		Relative papier- elektrophoret. Be- weglichkeit Ätiocobalamin = 1				
	R <sub>B12</sub>	R <sub>FIII</sub>	R <sub>AC f)</sub>	R <sub>B12</sub>	R <sub>FIII</sub>	R <sub>B12</sub>	R <sub>FIII</sub>	R <sub>AC f)</sub>			
F III <sub>m</sub> .....		1.08			1.15		1.07		0.0	0.0	32
F III <sub>e</sub> .....	0.989	1.26		0.97	1.20		1.17		0.0	0.0	25.5
F B <sub>12</sub> N <sub>m</sub> .....			0.94					0.96	0.8	0.0	
F III <sub>m</sub> N <sub>m</sub> .....			0.75				1.56	0.49	0.8	0.0	
F III <sub>m</sub> N <sub>m</sub> ...			0.83				2.21	0.86	0.8	0.0	

a) Aufsteigend; Entwickler stets CN<sup>-</sup>-haltig. Entwicklungsdauer 24–48 Std.; Papier: Whatman 1. b) 100 cem sek.-Butanol + 14 cem 25-proz. wäfr. NH<sub>3</sub>-Lösung + 36 cem Wasser + 0.5 cem 1-proz. wäfr. Blausäure. c) Puffer: 0.5 m Essigsäure, enthaltend CN<sup>-</sup>, p<sub>H</sub> 2.7. d) In 0.05 m Phosphatpuffer, enthaltend CN<sup>-</sup>, p<sub>H</sub> 6.5. e) Verteilung zwischen gleichen Volumina n-Butanol und ammoniumsulfathaltigem Wasser. Die Zahlen bedeuten den Gehalt an (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in Wasser, bei dem der Verteilungskoeffizient = 1 ist. f)  $\bar{A}C$ -Ätiocobalamin.

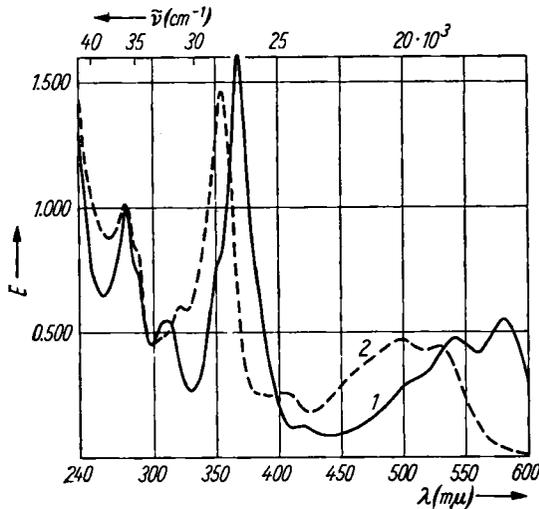
in guter Ausbeute das gleichfalls vorzüglich kristallisierende 5-Äthoxybenzimidazol-cobalamin (kurz als „Faktor IIIe“ bezeichnet). Für seine Struktur sprechen neben der Bildungsweise (analog der des Faktors III<sub>m</sub>) seine physikalischen Daten (s. Tafel 2) und die völlige Übereinstimmung seines Absorptionsspektrums mit dem des bereits auf biosynthetischem Weg gewonnenen Produktes<sup>7)</sup>.

Ganz anders verläuft die Alkylierung in Gegenwart von überschüssigen Cyanid-Ionen. Unter diesen Bedingungen reagiert nicht nur Faktor III, sondern auch Vitamin B<sub>12</sub>. Während aus diesem nur ein Reaktionsprodukt entsteht, gibt der Faktor III überwiegend zwei verschiedene Reaktionsprodukte. Alle drei Cobalamin-Faktoren verhalten sich ähnlich wie das basenfreie (inkomplette) Ätiocobalamin, d. h. sie sind in neutraler wäbriger Lösung bei CN<sup>-</sup>-Überschuß violett, und ihre Farbe schlägt beim Ansäuern, z. B. mit Essigsäure, auf p<sub>H</sub> 3 in Orange um. Sie sind in schwach saurem Gebiet positiv geladen, bewegen sich jedoch gegen die Kathode etwas langsamer als Ätiocobalamin. In neutralem Gebiet sind sie ebenso wie Ätiocobalamin elektrophoretisch neutral (s. Tafel 2). Die Absorptionsspektren aller drei Faktoren unterscheiden sich von dem des Ätiocobalamins im Bereich von ca. 270 bis 320 m $\mu$  (s. Abbild. 2 und 3) und ähneln bei CN<sup>-</sup>-Überschuß denen der Dicyanokomplexe der zugehörigen Muttersub-

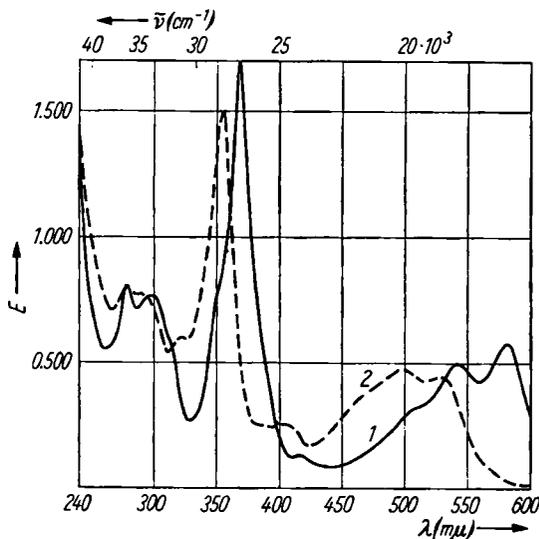
<sup>7)</sup> J. Pawełkiewicz u. K. Nowakowska, Acta biochim. polon. 2, 269 [1955].

stanzen<sup>1, 8)</sup>. Aus ihren Absorptionsspektren ist zu ersehen, daß die Basen im Molekül noch vorhanden sind.

Die Bildungsweise, die Absorptionsspektren und das elektrophoretische Verhalten der drei ätiocobalaminähnlichen B<sub>12</sub>-Faktoren ließen vermuten,



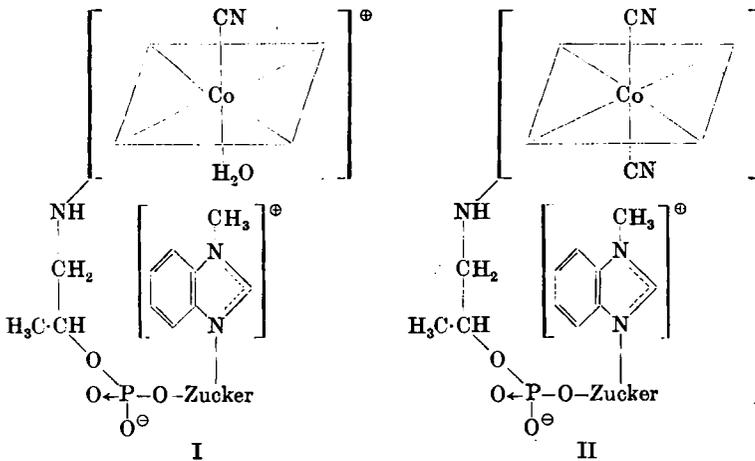
Abbild. 2. Absorptionsspektrum des Faktors B<sub>12</sub>Nm in Wasser bei CN<sup>⊖</sup>-Überschuß in neutralem und alkalischem p<sub>H</sub>-Bereich (1), in schwach saurem p<sub>H</sub>-Bereich (2)



Abbild. 3. Absorptionsspektren der Faktoren IIINm und IIIINm in Wasser bei CN<sup>⊖</sup>-Überschuß, in neutralem und alkalischem p<sub>H</sub>-Bereich (1), in schwach saurem p<sub>H</sub>-Bereich (2)

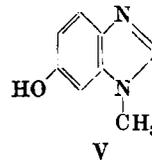
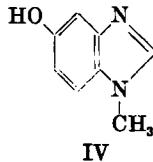
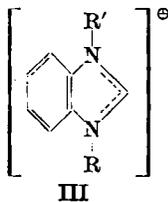
<sup>8)</sup> G. H. Beaven, E. R. Holiday, E. A. Johnson, B. Ellis u. V. Petrow, J. Pharmacy Pharmacol. 2, 944 [1950].

daß sie alle am N<sup>3</sup> der Benzimidazol-Komponente methyliert sind, und daß ihnen daher folgende Struktur zugrunde liegt:



in schwach saurem Milieu,  
bei CN<sup>-</sup>-Überschuß

in neutralem Milieu,  
bei CN<sup>-</sup>-Überschuß



Im Sinne dieser Formulierung ist aus Vitamin B<sub>12</sub> nur ein Methylierungsprodukt zu erwarten, während die Bildung von zwei Reaktionsprodukten aus Faktor III so zu erklären ist, daß der eine Faktor, der sich schneller bildet und chromatographisch langsamer wandert (s. Tafel 2 und 3), in der Benzimidazol-Komponente am N<sup>3</sup> methyliert ist, der andere Faktor, der sich aus Tafel 3. Methylierung von Faktor III in Gegenwart von NaHCO<sub>3</sub> und CN<sup>-</sup> in Abhängigkeit von der Zeit

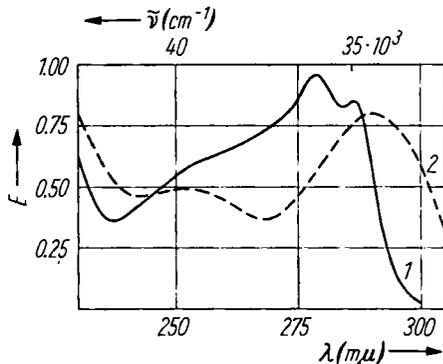
Reaktionsdauer	B <sub>12</sub> -Faktoren, geschätzt in %			
	F III <sup>a</sup> )	F III <sub>m</sub>	F III <sub>Nm</sub>	F III <sub>mNm</sub>
30	70	—	30	Spur
60	45	—	45	10
90	25	Spur?	50	25
180	10	Spur	25	65

a) unverbraucht.

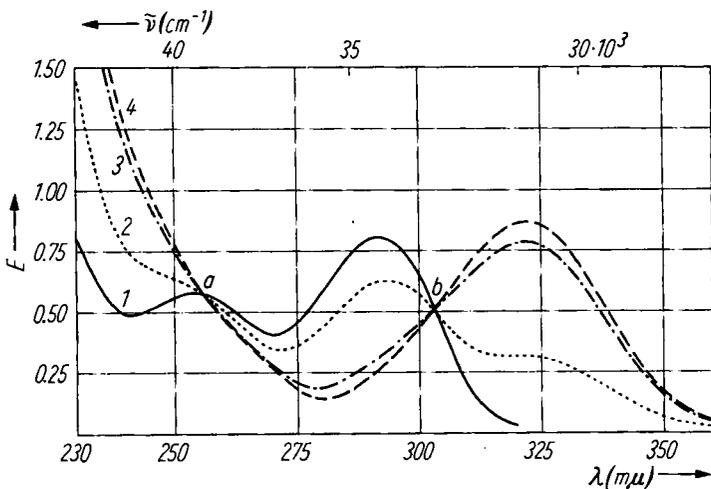
dem ersteren bildet (s. Tafel 3) und chromatographisch schneller wandert, sowohl am N<sup>3</sup> als auch am Hydroxyl. Die betreffenden Faktoren müßten daher folgendermaßen bezeichnet werden:

- 3.5.6-Trimethyl-benzimidazol-cobalamin („Faktor B<sub>12</sub>Nm“),
- 3-Methyl-5-hydroxy-benzimidazol-cobalamin (Faktor „IIINm“),
- 3-Methyl-5-methoxy-benzimidazol-cobalamin (Faktor „III mNm“).

Falls die Formeln I und II richtig sind, so müssen die aus den Faktoren B<sub>12</sub>Nm, IIINm und III mNm gewonnenen Nucleotide quartäre Ammonium-Ionen sein. Diese Forderung erfüllte sich vollkommen. Die Absorptionsspektren der Nucleotide (s. Abbild. 4 und 5) sind – mit Ausnahme des Nucleotides aus Faktor IIIINm, in dem die Veränderungen des Spektrums mit der Dissoziation des phenolischen Hydroxyls zusammenhängen – vom p<sub>H</sub> unabhängig, eine für 1.3-disubstituierte Benzimidazole charakteristische Eigenschaft. Solche Benzimidazole liegen bekanntlich als quartäre Ammonium-Ionen III vor und unterscheiden sich von Benzimidazolen, die zumindest ein nicht substituiertes Stickstoffatom besitzen, dadurch, daß sie die Fähigkeit zur Protonaddition verloren haben. Ihre Absorptionsspektren sind demzufolge vom p<sub>H</sub> unabhängig<sup>8, 9</sup>).



Abbild. 4. Absorptionsspektren der Nucleotide der Faktoren B<sub>12</sub>Nm (1) und III mNm (2) in Wasser im p<sub>H</sub>-Bereich 1–12



Abbild. 5. Absorptionsspektrum des Nucleotides des Faktors IIIINm in Wasser, bei p<sub>H</sub> 1.0 (1), bei p<sub>H</sub> 7.8 (2), bei p<sub>H</sub> 9.5 (3), bei p<sub>H</sub> 12.0 (4)  
 a und b sind isobestische Punkte für das Gleichgewicht  
 Phenol ⇌ Phenolat (p<sub>K</sub> = 8.5)

<sup>9)</sup> K. Hofmann, Imidazole and its derivatives, Interscience Publ., New York 1953, S. 253.

Aus dem Absorptionsspektrum des Nucleotides des Faktors IIINm (Abbild. 5) läßt sich die Dissoziationskonstante des phenolischen Hydroxyls ermitteln<sup>10</sup>). Der Wert für  $p_K$  beträgt 8–9 (geschätzt) und unterscheidet sich signifikant von den entsprechenden Werten für 5-Hydroxy-benzimidazol ( $p_{K_2} = 10.1$ )<sup>4</sup>) und für das Nucleotid des Faktors III ( $p_{K_2} = \text{ca. } 10.5$ ). Diese beträchtliche Erhöhung der Dissoziationskonstante des phenolischen Hydroxyls ist die Folge der Quaternierung und der dadurch verursachten positiven Ladung des Moleküls, durch deren elektrostatische Feldwirkung das Proton des phenolischen Hydroxyls abgestoßen wird. Es handelt sich hierbei um eine Analogie, z. B. zu den Betainen, in denen durch die Quaternierung des Aminostickstoffs die Dissoziationskonstante des Carboxyls weitgehend erhöht wird.

Eine Analyse der Ergebnisse der Tafeln 1 und 3 ergibt folgendes:

1. Die Methylierung am N<sup>3</sup> geht nur in Gegenwart von CN<sup>⊖</sup>-Ionen vor sich, und zwar viel rascher in Gegenwart von Hydrogencarbonat als von Carbonat.
2. Die Methylierung des Faktors III am phenolischen Hydroxyl ohne CN<sup>⊖</sup>-Zusatz verläuft rasch in Gegenwart von Carbonat und recht langsam in Gegenwart von Hydrogencarbonat.
3. Die Methylierung von Faktor III in Gegenwart von Hydrogencarbonat und CN<sup>⊖</sup>-Überschuß verläuft nach folgendem Schema:



Das phenolische Hydroxyl reagiert also erst nach erfolgter Methylierung des N<sup>3</sup>.

4. Die Reaktion Faktor IIINm  $\rightarrow$  Faktor IIImNm verläuft in Gegenwart von Hydrogencarbonat relativ schnell. Diese rasche Methylierung des phenolischen Hydroxyls ist die Folge der Quaternierung, denn der native Faktor III wird ohne Überschuß an CN<sup>⊖</sup>-Ionen in Hydrogencarbonat nur sehr langsam am phenolischen Hydroxyl methyliert.

Der Abbau der Faktoren III<sub>m</sub>, B<sub>12</sub>Nm, IIINm und III<sub>m</sub>Nm zu Nucleotiden mit kalter 70-proz. Perchlorsäure verläuft gleich schnell, ebenso wie der des Faktors III<sup>2</sup>), d. h. die Reaktion ist in 1½–2 Stdn. beendet. Aus jedem dieser Faktoren wurde außer dem betreffenden Nucleotid Ätiocobalamin gewonnen, dessen Identität durch papierchromatographischen und papier-elektrophoretischen Vergleich mit nativem Ätiocobalamin aus Faulschlamm erwiesen wurde.

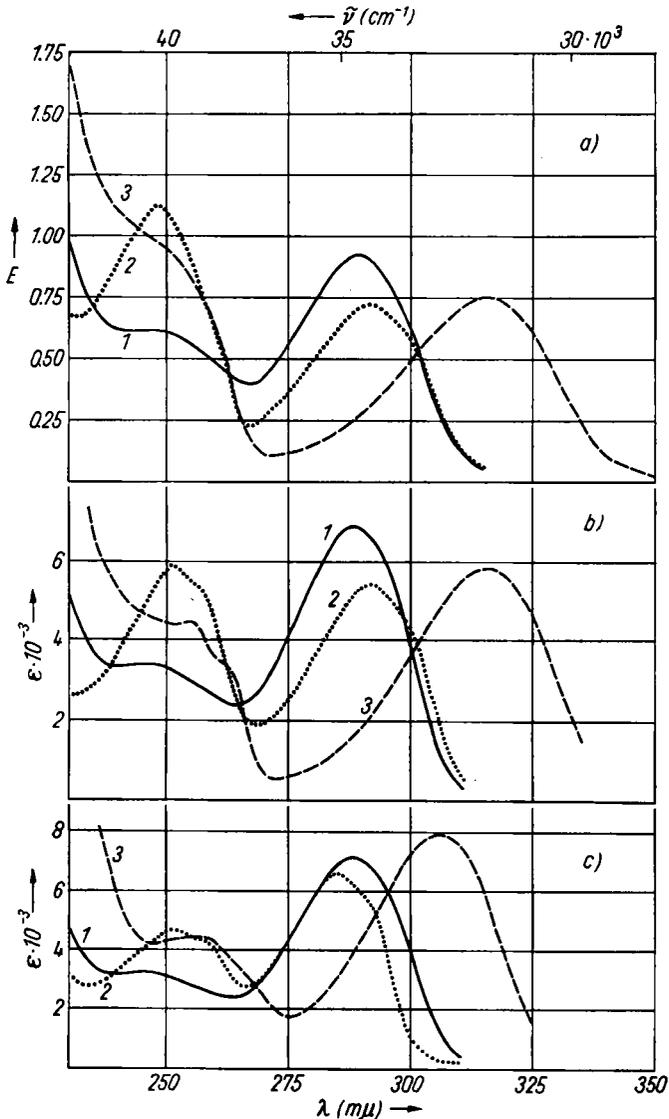
Zum endgültigen Strukturbeweis der Faktoren B<sub>12</sub>Nm, IIINm und III<sub>m</sub>Nm wurden die aus diesen Faktoren gewonnenen Nucleotide hydrolytisch gespalten und die hierbei erhaltenen Basen mit den entsprechenden Modellsubstanzen verglichen.

Die Hydrolyse des Nucleotides aus Faktor B<sub>12</sub>Nm mit 6*n* HCl bei 150° während 1½ Stdn. ergab 1.5.6-Trimethyl-benzimidazol, das durch Absorptionsspektrum, Schmp. und Misch-Schmp. mit einem authentischen Präparat eindeutig identifiziert wurde (s. Tafel 4).

Die beiden Nucleotide aus den Faktoren IIINm und III<sub>m</sub>Nm ergaben beim Abbau unter denselben Bedingungen die gleiche Base (gleiches chromatographisches Verhalten an Dowex-50 und gleiches Absorptionsspektrum, s. Abbild. 6 und Tafel 4). Bei der Hydrolyse des Nucleotides aus dem Faktor

<sup>10</sup>) Vergl. hierzu D. Shugar u. J. J. Fox, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **9**, 199 [1952]; J. J. Fox u. D. Shugar, ebenda **9**, 369 [1952].

III mNm wurde demnach gleichzeitig das Methoxyl gespalten. Die Ätherspaltung war in 6*n* HCl bei 150° nach 1½ Stdn. praktisch beendet. Der Verlauf wurde durch spektroskopische Messung verfolgt. Als logische Schlußfolgerung aus den gewonnenen Erkenntnissen sind nur die Strukturformeln IV oder V für die Base aus den Faktoren III Nm und III mNm möglich.



Abbild. 6. Absorptionsspektren des Nucleotides des Faktors III (a), des 1-Methyl-5-hydroxy-benzimidazols (b) und des 1-Methyl-6-hydroxy-benzimidazols (bzw. der Base aus den Faktoren III Nm und III mNm) (c) in Wasser bei p<sub>H</sub> 1.0 (1), bei p<sub>H</sub> 8.0 (2), bei p<sub>H</sub> 12.0 (3)

Tafel 4. Einige Eigenschaften der dargestellten Nucleotide und Basen

Substanz	Schmp. in °C (Kofler- Heizmikro- skop)	Abs.-Max. (in m $\mu$ ) und $\epsilon$ (in Klammern) in Wasser		
		p <sub>H</sub> 1.0	p <sub>H</sub> 8.0	p <sub>H</sub> 12.0
Nucleotid des Faktors III <sub>m</sub>		288	247.5, 289.5	247.5, 289.5
Nucleotid des Faktors B <sub>12</sub> N <sub>m</sub>		279, 286	279, 286	279, 286
Nucleotid des Faktors III <sub>Nm</sub>		254, 291.5	293	322
Nucleotid des Faktors III <sub>m</sub> N <sub>m</sub> .....		252, 290	252, 290	252, 290
Base des Faktors B <sub>12</sub> N <sub>m</sub> *) ..	141-144	277, 285	251-258 280, 288	251-258 280, 288
Nucleotid des Faktors III ..		289.5	248.5, 291.5	316
1-Methyl-5-hydroxy-benz- imidazol .....	263 265	245 (3400) 288 (6880)	251 (5860) 291.5 (5400)	255 (4460) 316 (5800)
1-Methyl-6-hydroxy-benz- imidazol und Base der Faktoren III <sub>Nm</sub> und III <sub>m</sub> N <sub>m</sub> .....	246-248	245 (3190) 288 (7100)	252 (4640) 285 (6540)	257 (4430) 306 (7880)

\*) Nach Schmp. u. Abs.-Spektrum identisch mit 1.5.6-Trimethyl-benzimidazol, für dessen Probe wir den British Drug Houses danken.

Zwecks Entscheidung zwischen den Formeln IV und V stellten wir die beiden Modellsubstanzen synthetisch her.

Bei der Synthese von 1-Methyl-5-hydroxy-benzimidazol (IV) gingen wir von 3-Nitro-4-amino-phenol-äthyläther<sup>11)</sup> aus. Nach Umsetzen mit *p*-Toluol-sulfonylchlorid, Methylierung mit Dimethylsulfat und hydrolytischer Abspaltung des Tosylrestes<sup>12)</sup> wurde mit Ameisensäure kondensiert und das Äthoxyl mit 6*n* HCl bei 150° gespalten. Das betreffende Benzimidazol wurde durch Chromatographie mit dem Kationenaustauscher Dowex-50 gereinigt und durch Behandlung mit dem schwachbasischen Anionenaustauscher Amberlite IR-4B aus der Hydrochloridform in die freie Base übergeführt.

Zur Synthese von 1-Methyl-6-hydroxy-benzimidazol (V) gingen wir von 4-Nitro-3-amino-phenol-methyläther<sup>13)</sup> aus. Im übrigen führten die gleichen Reaktionen wie bei der Herstellung von 1-Methyl-5-hydroxy-benzimidazol zum Ziel.

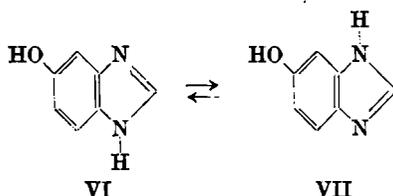
Die Base aus den Faktoren III<sub>Nm</sub> und III<sub>m</sub>N<sub>m</sub> erwies sich als identisch mit V (gleicher Schmp. und Misch.-Schmp., gleiches UV-Absorptionsspektrum) und verschieden von IV. Das UV-Absorptionsspektrum des Nucleotides aus Faktor III wiederum erwies sich als beinahe identisch mit IV (s. Abbild. 6 und Tafel 4). Beide Befunde bewiesen eindeutig, daß im nativen Faktor III das phenolische Hydroxyl die Stellung 5 gegenüber dem Zuckerrest einnimmt (s. dazu l. c.<sup>6)</sup>).

<sup>11)</sup> Hergest. nach l. c.<sup>7)</sup>.

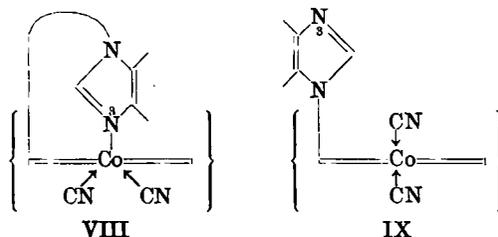
<sup>12)</sup> Zur allgemeinen Methodik vergl. G. R. Beaven, E. R. Holiday, E. A. Johnson, B. Ellis, P. Mamalis, V. Petrow u. B. Sturgeon, J. Pharmacy Pharmacol. 1, 957 [1949].

<sup>13)</sup> Hergest. nach F. Reverdin u. K. Widmer, Ber. dtsch. chem. Ges. 46, 4066 [1913].

Die Unterschiede in den Absorptionsspektren der 1.5- und 1.6-substituierten Hydroxybenzimidazole sind sehr markant. U. a. sind die Werte der Bandenverschiebung beim Übergang ins alkalische  $p_H$ -Gebiet sehr unterschiedlich, indem bei  $p_H$  12 die entsprechenden Absorptionsmaxima der 1.5-substituierten Benzimidazole bei 316  $m\mu$ , die der 1.6-substituierten bei 306  $m\mu$  liegen. Auch 5-Hydroxy-benzimidazol erleidet beim Übergang ins alkalische  $p_H$ -Gebiet eine für die 1.6-substituierten Hydroxybenzimidazole charakteristische Bandenverschiebung<sup>4)</sup>. Diese Tatsache spricht dafür, daß das Gleichgewicht der beiden mesomeren Formen VI und VII des 5-Hydroxy-benzimidazols weitgehend zugunsten der Form VII verschoben sein dürfte.



Aus den hier beschriebenen Versuchen ergeben sich nicht nur für die Struktur des Faktors III wichtige Schlüsse. Eine mehr allgemeine Bedeutung für die ganze  $B_{12}$ -Gruppe hat die Tatsache, daß die Alkylierung des mit dem zentralen Co-Atom koordinierbaren Stickstoffs nur in Gegenwart von Cyanidionen (in geringerem Ausmaß auch in Gegenwart anderer Anionen, die mit Kobalt koordinieren) möglich ist. Cooley u. a.<sup>14)</sup> zogen für das Dicyanocobalamin folgende zwei Formeln in Erwägung:



Unter diesen konnte nach dem damaligen Stand des Wissens nicht entschieden werden. Nach Formel VIII besitzt das zentrale Kobaltatom die Koordinationszahl 7, und das  $N^3$  der Benzimidazolkomponente ist an Kobalt gebunden. Nach Formel IX ist das  $N^3$  vom Kobaltatom gelöst. Auf Grund der mitgeteilten Versuchsergebnisse erscheint die Struktur VIII völlig ausgeschlossen und die Struktur IX gesichert\*). Mit Hilfe der Formel VIII läßt

<sup>14)</sup> G. Cooley, B. Ellis, V. Petrow, G. H. Beaven, E. R. Holiday u. E. A. Johnson, *J. Pharmacy Pharmacol.* **3**, 271 [1951].

\*) Die Struktur IX wurde bereits als wahrscheinlicher im Schrifttum akzeptiert, wenn auch die Beweise für ihre Richtigkeit fehlten. So schreibt z. B. E. L. Smith (*Biochem. Soc. Symposia* Nr. 13, *The Biochemistry of Vitamin B<sub>12</sub>*, Cambridge 1955, S. 3), daß die CN-Gruppe die koordinative Bindung zwischen Kobalt und  $N^3$  beseitigt.

sich das unterschiedliche Verhalten der Vitamine der  $B_{12}$ -Gruppe gegenüber Alkylierungsmitteln mit und ohne  $CN^{\ominus}$ -Überschuß nicht erklären, wohl aber sehr gut durch Formel IX: Im Dicyanokomplex ist  $N^3$  nicht an Kobalt gebunden und daher für Alkylierungsmittel zugänglich. Die mitgeteilten Versuche bestätigen gleichzeitig den von Beaven u. a.<sup>8)</sup> aus spektroskopischen Beobachtungen gezogenen Schluß, daß die Bindung zwischen  $N^3$  und Kobalt koordinativ und nicht valenzartig ist.

Es gelang bisher nicht, die Faktoren  $B_{12}Nm$ ,  $IIINm$  und  $IIIINm$  zu kristallisieren. Auch in dieser Hinsicht verhalten sie sich also ähnlich dem Ätiocobalamin, das bisher gleichfalls nur in amorphem Zustand bekannt ist. Nach den bisherigen Erfahrungen kristallisieren alle „kompletten“, d. h. nucleotidhaltigen Cobalamine, wogegen alle „in-kompletten“, d. h. nucleotidfreien Cobalamine (Ätiocobalamin, Ätiocobalamincarbon-säuren), nicht kristallisieren (mit Ausnahme der von Cannon u. a.<sup>15)</sup> isolierten Hexa-carbonsäure). Da die Faktoren  $B_{12}Nm$ ,  $IIINm$  und  $IIIINm$  sich in bezug auf ihre Kristallisierbarkeit wie die nucleotidfreien Faktoren verhalten, ist das Vorhandensein des Nucleotides für die Kristallisationsfähigkeit noch nicht ausreichend. Als zusätzliche Voraussetzung hierfür muß offenbar das  $N^3$ -Atom mit dem zentralen Kobaltatom koordiniert sein. In Übereinstimmung hiermit steht die Tatsache, daß die Dicyanokomplexe der sonst gut kristallisierbaren Cobalamine nicht kristallisieren, da in ihnen das Kobaltatom durch die Anlagerung eines zweiten  $CN^{\ominus}$ -Ions blockiert und für die koordinative Bindung mit  $N^3$  unzugänglich ist.

Die Faktoren  $B_{12}Nm$ ,  $IIINm$  und  $IIIINm$  sind gegenüber *E. coli* 113–3 inaktiv. Es gibt bereits zahlreiche Abwandlungsprodukte des Vitamins  $B_{12}$ , die sich von diesem nur im Basenanteil unterscheiden. Alle sind – soweit bisher bekannt – gegenüber *E. coli* aktiv, unabhängig davon, ob ihre Basen der Benzimidazol- oder Purin-Reihe angehören. Die Basen aller dieser  $B_{12}$ -Faktoren sind am nicht glykosidisch gebundenen Imidazol-N-Atom unsubstituiert, wodurch also eine koordinative Bindung zwischen diesem N-Atom und dem Kobaltatom möglich ist. Diese Möglichkeit besteht nicht bei den Faktoren  $B_{12}Nm$ ,  $IIINm$  und  $IIIINm$ , und dies dürfte die Erklärung ihrer mikrobiologischen Unwirksamkeit sein. Daraus ergibt sich der Schluß, daß die mikrobiologische Aktivität der  $B_{12}$ -Vitamine offenbar das Vorhandensein einer koordinativen Bindung zwischen einem Imidazolstickstoff und dem zentralen Kobaltatom zur Voraussetzung hat.

#### Beschreibung der Versuche\*)

Methylierung von Vitamin  $B_{12}$  und Faktor III unter verschiedenen Bedingungen: Es wurden in Reagenzgläser der Reihe nach eingefüllt: 3 mMole Puffer-substanz in fester Form, 1 ccm Wasser, 0.2 mg der betreffenden  $B_{12}$ -Art, gelöst in 0.2 ccm Wasser, 0.025 ccm 10-proz. HCN-Lösung oder 0.04 ccm 10-proz. NaCN-Lösung. Nach dem letzten Zusatz wurden die Reagenzgläser mit Korkstopfen verschlossen und 2 Stdn. bei 37° stehengelassen. Anschließend wurden alle Proben mit je 0.03 ccm Dimethylsulfat versetzt und in einem Schüttelgerät bei 37° geschüttelt. In einstündigen Zeitabständen wurden noch zweimal je 0.03 ccm Dimethylsulfat zugesetzt. Nach der letzten Zugabe wurde noch 1 Stde. geschüttelt. Dann versetzte man die Proben mit je 0.5 ccm 80-proz. wäbr. Phenollösung, schüttelte eine weitere Stde. bei 37° und ließ über Nacht bei 20°

<sup>15)</sup> J. R. Cannon, A. W. Johnson u. A. R. Todd, Nature [London] 174, 1168 [1954].

\*) Mikroanalysen von A. Bernhardt, Max-Planck-Institut für Kohlenforschung, Mülheim-Ruhr. Wir danken Dipl.-Chem. H. Burkhardt für die Mitarbeit bei der Herstellung der 1-Methyl-benzimidazole.

stehen. Sodann wurden die  $B_{12}$ -Faktoren in üblicher Weise extrahiert und papierchromatographisch und elektrophoretisch geprüft (Tafel 1).

**Faktor III<sub>m</sub> aus Faktor III:** In eine Mischung von 50 mg Faktor III und 300 g  $Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$  in 250 ccm Wasser wurden in einem 1 l fassenden Gefäß bei 37° unter lebhaftem Rühren während 4 Stdn. in kleinen Portionen 37.5 ccm Dimethylsulfat eingetragen. Aufarbeitung nach beendeter Reaktion: Zusatz von 150 ccm Wasser und 125 ccm einer 80-proz. wäbr. Phenollösung, 1 Stde. bei 37° gerührt, über Nacht bei Zimmertemperatur stehengelassen, rotgefärbte Phenolphase abgetrennt, mit 100 ccm *o*-Dichlorbenzol verdünnt, so oft mit Wasser gewaschen, bis das letzte Waschwasser neutral war. Zusatz von etwas Butanol und Äther, Überführung der  $B_{12}$ -Arten aus der Phenolphase in die wäbr. Lösung, diese mit Butanol und Äther gewaschen und i. Vak. auf ein kleines Volumen eingeeengt, Rückstand in etwas Kieselgur aufgenommen und i. Vak. über  $CaCl_2$  getrocknet. Trockenprodukt in eine Cellulose-Chromatographiesäule (Durchm. 6 cm, Höhe 14 cm, Whatman Cellulose Powder, Standard Grade) eingefüllt. Entwickler 775 ccm *sek.*-Butanol, 90 ccm 25-proz. wäbr. Ammoniak-Lösung, 135 ccm Wasser und 1 ccm 10-proz. HCN-Lösung. Bei der Entwicklung erhielt man zwei violette Zonen, nämlich eine untere, kräftige, schnell bewegliche Zone des Faktors III<sub>m</sub> vom *R*-Wert 0.33 und eine obere, schwache, langsam laufende Zone des unveränderten Faktors III vom *R*-Wert 0.12, die nach Elution der unteren Zone mit *sek.*-Butanol + 30% Wasser eluiert wurde.

Das Eluat der unteren Zone wurde zwecks Beseitigung von Ammoniak i. Vak. auf die Hälfte eingeeengt, mit etwas Äther versetzt und mit Wasser extrahiert. Die wäbr. Lösung, in üblicher Weise auf krist. Produkt verarbeitet, ergab dunkelrote, bis 1 cm lange feine Spieße. Ausbeute an völlig reinem krist. Produkt 29 mg (58%), Menge an regeneriertem Faktor III 15 mg.

Faktor III<sub>m</sub> ist aktiv gegenüber *E.coli* 113-3, *L.leichmannii* 313 und *Ochromonas malhamensis* (60–90% der  $B_{12}$ -Aktivität).

**Faktor III<sub>e</sub> aus Faktor III:** In eine Mischung von 50 mg Faktor III und 300 g  $Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$  in 250 ccm Wasser wurden ebenso wie zuvor bei 37° unter lebhaftem Rühren während 4 Stdn. in kleinen Portionen 33.7 ccm Diäthylsulfat eingetragen und wie im vorhergehenden Versuch aufgearbeitet. Bei der Chromatographie in der Cellulose-säule erhielt man zwei violette Zonen, nämlich eine untere, kräftige, schnell bewegliche Zone des Faktors III<sub>e</sub> vom *R*-Wert 0.4 und eine obere, schwache, langsam laufende Zone des unveränderten Faktors III mit dem *R*-Wert 0.12.

Nach Elution und üblicher Verarbeitung (wie zuvor) kristallisierte der Faktor III<sub>e</sub> in schönen, 1 cm langen, dunkelroten Spießchen. Ausbeute an völlig reinem krist. Produkt 34.2 mg (68.4%). Aus der oberen Zone wurden 10.0 mg Faktor III zurückgewonnen.

Faktor III<sub>e</sub> ist aktiv gegenüber *E.coli* 113-3, *L.leichmannii* 313 und *Ochromonas malhamensis* (ca. 50% der  $B_{12}$ -Aktivität). Das Absorptionsspektrum des Faktors III<sub>e</sub> ähnelt dem des Faktors III. In seinem chromatographischen Verhalten ist der Faktor III<sub>e</sub> von Vitamin  $B_{12}$  kaum zu unterscheiden.

**Faktor  $B_{12}$ Nm aus Vitamin  $B_{12}$ :** Eine Mischung von 50 mg Vitamin  $B_{12}$ , 63 g  $NaHCO_3$  und 1 g NaCN in 250 ccm Wasser wurde ebenso wie zuvor bei 37° unter lebhaftem Rühren während 3 Stdn. mit 22.5 ccm Dimethylsulfat in kleinen Portionen versetzt und wie zuvor aufgearbeitet. Entwickler bei der Säulenchromatographie: 750 ccm *sek.*-Butanol, 250 ccm Wasser, 5 g Tetraphenylbornatrium (Kalignost), 1 ccm 10-proz. Blausäure-Lösung. Der neue Faktor wanderte als kräftige, einheitliche violette Zone mit dem *R*-Wert 0.6. Es folgte eine schwache rote Zone des Vitamins  $B_{12}$  mit *R* 0.33 und eine dritte sehr schwache Zone mit *R* 0.15. Das Eluat des Faktors  $B_{12}$ Nm wurde mit Wasser extrahiert. Weitere Reinigung durch Extraktion der wäbr. Phase mit einem Gemisch von Phenol + *o*-Dichlorbenzol, Waschen dieser Lösung mit Wasser, Überführung des  $B_{12}$ -Faktors in die wäbr. Phase durch Zusatz von *sek.*-Butanol und Äther. Gelegentlich auftretende, durch Kalignost verursachte Emulsionen ließen sich durch minimale Mengen  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  völlig beseitigen. Die eingeengte wäbr. Phase wurde zwecks Entfernung letzter Spuren an Vitamin  $B_{12}$  säulenelektrophoretisch gereinigt (18 Stdn. bei 1200 V, Puffer: 0.5 *m* Essigsäure, enthaltend 0.005 Mol HCN im l,  $p_H$  2.7). Der Faktor

$B_{12}$ Nm wanderte in diesem Puffer kathodisch, ist also darin positiv geladen. Das wäbr. Eluat wurde nach der Elektrophorese mit Phenol + *o*-Dichlorbenzol extrahiert, Phenolphase mit Wasser gewaschen,  $B_{12}$ -Faktor nach Zusatz von *sek.*-Butanol und Äther in Wasser übergeführt. Die wäbr. Lösung wurde mit *sek.*-Butanol und Äther gewaschen, i. Vak. eingengt, in wenig Kieselgur aufgenommen, i. Vak. über  $CaCl_2$  getrocknet und das Trockenprodukt in eine mit Hahn versehene schmale Glassäule eingefüllt, die unten mit einem Wattepfropfen versehen und darüber mit einer einige mm hohen Aluminiumoxyd-Schicht gefüllt war. Die beschickte Säule wurde mit trockenem Aceton gewaschen und der Faktor  $B_{12}$ Nm mit einem Gemisch aus Aceton und 15–25% Wasser eluiert. Durch Verdampfen der Lösung i. Vak. erhält man den Faktor  $B_{12}$ Nm als amorphes Pulver. Absorptionsspektrum s. Abbild. 2. Gegen *E. coli* ist Faktor  $B_{12}$ Nm praktisch inaktiv.

Die Faktoren IIINm und IIImNm aus Faktor III wurden in gleicher Weise hergestellt wie Faktor  $B_{12}$ Nm. Der zeitliche Reaktionsverlauf wurde an entnommenen und analysierten Proben festgestellt (s. Tafel 3). Bei der Chromatographie in der Cellulosesäule erschienen zwei Hauptzonen, eine kräftige violette Zone des Faktors IIImNm mit dem *R*-Wert 0.40 und eine schwächere, gleichfalls violette Zone des Faktors IIINm mit dem *R*-Wert 0.1. Dazwischen lagen noch zwei sehr schwache rote Zonen, nämlich die des Faktors III (*R*-Wert 0.177) und die noch schwächere des Faktors IIIm (*R*-Wert etwa 0.25). Die eluierten Zonen der violetten Faktoren wurden, wie bereits bei Faktor  $B_{12}$ Nm beschrieben, extrahiert und säulenelektrophoretisch weiter gereinigt. Beide Faktoren wurden schließlich als amorphe Pulver gewonnen. Sie besitzen das gleiche Absorptionsspektrum (s. Abbild. 3).

Abbau der Faktoren IIIIm,  $B_{12}$ Nm, IIINm und IIImNm mit 70-proz. Perchlorsäure und Isolierung der Nucleotide: 10–40 mg der betreffenden Faktoren wurden in 1.5–3.0 ccm 70-proz. Perchlorsäure gelöst und 3–4 Stdn. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Die weitere Verarbeitung und Trennung der Nucleotide vom Ätiocobalamin geschah in üblicher Weise<sup>2)</sup>. Die farblosen Lösungen der Nucleotide dienten zur Aufnahme der Absorptionsspektren und zum Nachweis von Phosphorsäure. Dieser erfolgte nach Erhitzen der Nucleotid-Lösung in 6 *n* HCl bei 150° bzw. nach Aufschluß mit heißer Schwefelsäure (zur Methodik vergl. l. c.<sup>16)</sup>). In nicht aufgeschlossenen Proben konnte keine Phosphorsäure nachgewiesen werden.

Abbau der Nucleotide der Faktoren IIIIm,  $B_{12}$ Nm, IIINm und IIImNm und Isolierung der Basen: Farblose Lösungen der Nucleotide wurden i. Vak. zur Trockne gebracht, der Rückstand jeweils in 3–4 ccm 6 *n* HCl gelöst und im zugeschmolzenen Glasrohr 5½ Stdn. auf 150° erhitzt. Die Hydrolysate wurden zur Trockne verdampft, der Rückstand jeweils in 1–2 ccm Wasser gelöst, mit einigen Tropfen 0.5 *n* KOH neutralisiert und durch Säulen aus Dowex 50- $H^+$  (Durchm. 5 mm, Höhe 20 mm) langsam hindurchlaufen gelassen. Die Säulen wurden mit Wasser und 0.4 *n* HCl gewaschen, Basen schließlich mit 2 *n* HCl eluiert, Eluate i. Vak. eingengt und i. Vak. über NaOH getrocknet.

Das Absorptionsspektrum der Base aus Faktor IIIIm (gemessen in 0.1 *n* HCl, bei  $p_H$  8 und  $p_H$  12) erwies sich als identisch mit dem des 5-Hydroxy-benzimidazol<sup>3-5)</sup>.

Das Hydrochlorid der Base aus Faktor  $B_{12}$ Nm wurde in ca. 1 ccm Wasser gelöst und mit etwas Amberlite IR-4B neutralisiert. Nach Erwärmen, Filtrieren, weiterer Extraktion des Ionenaustauschers mit heißem Wasser und Einengen der Extrakte wurde die freie kristallisierte Base gewonnen. Schmp. sowie Misch-Schmp. mit 1.5.6-Trimethyl-benzimidazol 141–144° (Kofler-Heizmikroskop). Absorptionsspektrum (s. Tafel 4) identisch mit dem von 1.5.6-Trimethyl-benzimidazol.

Die UV-Absorptionsspektren der Hydrochloride der Basen aus den Faktoren IIINm und IIImNm erwiesen sich als völlig identisch, wodurch die von vornherein zu erwartende Identität der Stoffe bewiesen wurde. Die Hydrochloride wurden vereint und ähnlich wie das Hydrochlorid der Base aus Faktor  $B_{12}$ Nm zur freien kristallisierten

<sup>16)</sup> E. Volkin u. W. E. Cohn, in „Methods of Biochemical Analysis“, Interscience Publ., New York 1954, S. 299.

Base verarbeitet. Schmp. sowie Misch-Schmp. mit 1-Methyl-6-hydroxy-benzimidazol 246–248° (Kofler-Heizmikroskop).

*p*-Toluolsulfonsäure-[2-nitro-4-äthoxy-anilid]: Die Lösung von 1.6 g (0.01 Mol) 3-Nitro-4-amino-phenol-äthyläther in 5 ccm Pyridin wurde portionsweise mit 1.9 g (0.01 Mol) *p*-Toluolsulfochlorid versetzt und auf dem Wasserbad 2.5 Stdn. erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde mit 2 *n* HCl angesäuert, die ausgeschiedene graue klumpige Kristallmasse abfiltriert, mit Wasser gewaschen und nach dem Trocknen aus 10 ccm absol. Äthanol ockergelbe, olivgrün schimmernde Kristalle vom Schmp. 90–92° (Kofler-Heizbank) erhalten; Ausb. 2.57 g (82% d. Th.).

$C_{15}H_{16}O_5N_2S$  (336.3) Ber. N 8.33 Gef. N 8.2

*p*-Toluolsulfonsäure-[*N*-methyl-2-nitro-4-äthoxy-anilid]: 1.92 g (0.006 Mol) *p*-Toluolsulfonsäure-[2-nitro-4-äthoxy-anilid] wurden mit 5 ccm 4 *n* NaOH mit Hilfe eines Vibromischers gemischt und dabei mit 0.5 ccm Dimethylsulfat versetzt; anschließend wurde unter Rückfluß erhitzt, weitere 0.5 ccm Dimethylsulfat portionsweise zugesetzt und 10 *n* NaOH unter ständiger Einhaltung alkalischer Reaktion zutropfen gelassen. Nach dem letzten Zusatz von Dimethylsulfat kochte man noch 15 Min., kühlte, wusch den Niederschlag mit Wasser und kristallisierte aus Äthanol um. Ausb. 1.05 g (50% d. Th.). Hellgelbe feine Nadeln vom Schmp. 92–93° (Kofler-Heizbank).

$C_{16}H_{18}O_5N_2S$  (350.3) Ber. N 7.99 S 9.16 Gef. N 7.72 S 9.06

*N*-Methyl-2-nitro-4-äthoxy-anilin: 510 mg (0.0015 Mol) *p*-Toluolsulfonsäure-[*N*-methyl-2-nitro-4-äthoxy-anilid] erhitzte man mit einem Gemisch aus 0.57 ccm konz. Schwefelsäure und 0.25 ccm Eisessig 1.5 Stdn. auf dem siedenden Wasserbad, wobei die Reaktionslösung klar hellbraun wurde. Nach dem Abkühlen wurde auf ca. 20 g Eis gegossen, von sofort ausfallendem feuerrotem Produkt abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Nach Trocknen und Reinigen durch Sublimation (Ölbad 120°, 12 Torr) wurden 80 mg (26% d. Th.) feuerrote Nadeln vom Schmp. 75–77° (Kofler-Heizbank) erhalten.

$C_9H_{12}O_3N_2$  (196.2) Ber. N 14.28 Gef. N 14.1

1-Methyl-5-hydroxy-benzimidazol: Zu einer Mischung aus 1 ccm konz. Salzsäure und 118 mg (0.001 Mol) geraspelttem Zinn wurden 60 mg (0.0003 Mol) *N*-Methyl-2-nitro-4-äthoxy-anilin portionsweise zugesetzt. Nach jedem Zusatz erfolgte fast sofortige Entfärbung. Zum Schluß wurde 25 Min. auf 100° erhitzt, die Reaktionslösung in 60 ccm schwefelwasserstoffhaltiges Wasser gegossen und durch die schwach saure Lösung während 6 Stdn. Schwefelwasserstoff durchgeleitet. Nach Stehenlassen über Nacht wurde vom Zinnsulfid abfiltriert, die farblose klare Lösung i. Vak. im Stickstoffstrom bis zur Trockne eingengt und der krist. Rückstand über Nacht i. Vak. über Natriumhydroxyd getrocknet. Nach Zusatz von 2 ccm Ameisensäure kochte man 2.5 Stdn. unter Rückfluß, verdampfte die überschüssige Ameisensäure i. Vak., löste den krist. Rückstand zwecks Spaltung des Äthoxyls in 3 ccm 6 *n* HCl und erhitzte 5 Stdn. auf 150° im Bombenrohr. Nach Verdampfen i. Vak. und Trocknen über NaOH wurde der Rückstand in Wasser gelöst und durch eine Säule aus Dowex-50 (vorher gewaschen mit 6 *n* HCl und Wasser, Säulendurchm. 0.7 cm, Höhe 3 cm) chromatographiert. Die Entwicklung geschah mit 2 *n* HCl. Die symmetrische Elutionsbande deutete auf die Einheitlichkeit der Substanz hin. Der nach Einengen der Eluate i. Vak. und Trocknen über NaOH erhaltene farblose krist. Rückstand wurde in 5 ccm Wasser gelöst, mit 0.8 ccm Amberlite IR-4B (Korngr. 0.1 mm) versetzt und zum Sieden erhitzt. Nach dem Filtrieren und Abkühlen kristallisierte die freie Base in farblosen haarförmigen Spießen vom Schmp. 263–265° (Kofler-Heizmikroskop). Die Substanz wandelt sich bei ca. 220° in eine andere Kristallform (etwas größere Spieße) um. Ausb. 23 mg (50% d. Th.).

$C_8H_8ON_2$  (148.1) Ber. C 64.88 H 5.44 N 18.92 Gef. C 64.62 H 5.51 N 18.72

*p*-Toluolsulfonsäure-[2-nitro-5-methoxy-anilid]: 11.21 g (0.066 Mol) 4-Nitro-3-amino-phenol-methyläther, in 14 ccm Pyridin gelöst, wurden portionsweise mit 12.6 g (0.066 Mol) *p*-Toluolsulfochlorid versetzt. Nach 2stdg. Erhitzen auf 100° und Zusatz von 85 ccm 2 *n* HCl fielen gelbe Kristalle, die abfiltriert, mit Wasser

gewaschen und zweimal aus je ca. 300 ccm Äthanol umkristallisiert wurden. Rhombische, grobe hellgelbe Schuppen vom Schmp. 139° (Kofler-Heizbank). Ausb. 13.4 g (63% d. Th.).

$C_{14}H_{14}O_5N_2S$  (322.3) Ber. N 8.68 S 9.94 Gef. N 8.54 S 9.89

*p*-Toluolsulfonsäure-[*N*-methyl-2-nitro-5-methoxy-anilid]: Zu einer Mischung von 13.34 g (0.0414 Mol) *p*-Toluolsulfonsäure-[2-nitro-5-methoxy-anilid] und 10 ccm 4 *n* NaOH gab man unter heftigem Rühren unter Rückfluß 3.3 ccm Dimethylsulfat zu, anschließend weitere 7.9 ccm Dimethylsulfat in kleinen Portionen und tropfenweise 10 *n* NaOH, wobei das Reaktionsmedium stets alkalisch war. Nach dem letzten Zusatz von Dimethylsulfat wurde noch 15 Min. gekocht, der krist. Niederschlag mit Wasser gewaschen und zweimal aus Äthanol umkristallisiert. Ausb. 10.7 g (77% d. Th.) gelblicher feiner Nadeln vom Schmp. 143° (Kofler-Heizbank).

$C_{15}H_{16}O_5N_2S$  (336.3) Ber. N 8.33 S 9.53 Gef. N 8.17 S 9.43

*N*-Methyl-2-nitro-5-methoxy-anilin: In eine Mischung von 5 ccm Eisessig und 11.6 ccm konz.  $H_2SO_4$  wurden 10.54 g (0.031 Mol) *p*-Toluolsulfonsäure-[*N*-methyl-2-nitro-5-methoxy-anilid] eingetragen, die Lösung 2 Stdn. auf 100° erhitzt und dann auf Eis gegossen. Der ausgeschiedene gelbe, sehr feine Niederschlag wurde abfiltriert, gewaschen und aus Äthanol umkristallisiert. Messinggelbe feine Schuppen vom Schmp. 116° (Kofler-Heizbank). Ausb. 4.6 g (81% d. Th.).

$C_9H_{10}O_3N_2$  (182.2) Ber. N 15.37 Gef. N 15.42

1-Methyl-6-hydroxy-benzimidazol: 728 mg (0.004 Mol) *N*-Methyl-2-nitro-5-methoxy-anilin wurden in kleinen Portionen unter gelegentlicher Kühlung in ein Gemisch von 1.42 g (0.012 Mol) geraspeltm Zinn und 4.5 ccm konz. Salzsäure eingetragen. Die Substanz löste sich rasch unter Wärmeentwicklung. Nach erfolgter Umsetzung wurde 20 Min. auf 115 bis 125° erhitzt und das Reaktionsgemisch in 300 ccm  $H_2S$ -gesättigtes Wasser gegossen. Nach Durchleiten von  $H_2S$  während einiger Stdn. und Stehenlassen im verschlossenen Gefäß über Nacht wurde das braune Zinnsulfid abgesaugt und das wasserklare farblose Filtrat i. Vak. unter Stickstoff bis zur Trockne eingeeengt. Den farblosen krist. Rückstand versetzte man mit 5 ccm Ameisensäure, kochte die Lösung 2.5 Stdn. unter Rückfluß und destillierte die überschüss. Ameisensäure i. Vak. ab. Der rotbraune ölige Rückstand erstarrte bald in Form feiner Nadeln. Die aus 1-Methyl-6-methoxy-benzimidazol bestehende Substanz wurde ohne weitere Reinigung mit 12 ccm 6 *n* HCl in einem Bombenrohr 5 Stdn. auf 150° erhitzt, das Hydrolysat i. Vak. eingeeengt und über Natriumhydroxyd getrocknet. Den rotbraunen krist. Niederschlag nahm man in ca. 20 ccm Wasser auf und chromatographierte durch eine Säule aus Dowex-50 (vorher gewaschen mit 6 *n* HCl und Wasser; Säulendurchm. 1.2 cm, Höhe 10 cm). Nach Waschen mit Wasser wurde das 1-Methyl-6-hydroxy-benzimidazol in Form einer fast symmetrischen Elutionsbande mit 2 *n* HCl gewonnen (die rotbraunen Verunreinigungen blieben in der Säule). Die Eluate wurden i. Vak. eingeeengt, der leicht bräunlich gefärbte krist. Rückstand in 50 ccm Wasser gelöst und mit 8 ccm Amberlite IR-4B neutralisiert. Nach Aufkochen wurde der Austauscher abgetrennt und noch einige Male auf die gleiche Weise mit Wasser extrahiert. Die vereinigten Extrakte engte man i. Vak. ein und kristallisierte den Rückstand aus 30 ccm Wasser um. Ausb. 390 mg (66% d. Th.) farbloser bis einige cm langer Haare vom Schmp. 246–248° (Kofler-Heizmikroskop; ab ca. 180° bilden sich Sublimate feiner Spieße).

$C_8H_8ON_2$  (148.1) Ber. C 64.88 H 5.44 N 18.92 Gef. C 64.89 H 5.43 N 18.90

Nachtrag (eingeg. am 22. Mai 1956): K. Folkers und Mitarbb. (Privatmitteil.) konnten zeigen, daß das Nucleosid von Faktor III 5-Hydroxy-1-[ $\alpha$ -D-ribofuranosyl]-benzimidazol ist. Der Beweis für die Stellung des phenolischen Hydroxyls besteht in einer schrittweisen Behandlung des Nucleosides mit Diazomethan und Methyljodid. Die anschließende alkalische Hydrolyse gibt ein Monomethyl-*o*-phenylendiamin, das durch Umwandlung in 1-Methyl-6-methoxy-benzimidazol identifiziert wurde.