

2.4.6-Trijod-anilin: Die Reaktion erfolgte wie beim 2.4-Dijod-anilin, aber mit 120 g Jod (4 Moll./Mol. Anilin) in 670 ccm Methanol: 103.3 g Rohprodukt, dazu 8.6 g durch Verdünnen der methanol. Mutterlauge mit 500 ccm Wasser. Man kristallisierte mit Aktivkohle in 5 Portionen unter Verwendung der Mutterlaugen aus 500 ccm Bzl. um: 75.4 g (64.5% d. Th.) hellbraune Nadeln, die nach nochmaliger Umkrist. aus Bzl. fast farblos waren; Schmp. 188°.

Kupplungsversuche mit 2.4.6-Trijod-anilin: a) 48.0 g *2.4.6-Trijod-anilin*, 16.6 g *meso- α,α' -Dibrom-adipinsäure-dimethylester*, 20.0 g trockenes K_2CO_3 und 280 ccm trockenes Methyläthylketon rührte man 54 Stdn. in der Siedehitze und behandelte das kalt abgesaugte Produkt mit 200 ccm Wasser: 45.7 g, Schmp. 185–187° (keine Depression mit *2.4.6-Trijod-anilin*). b) 23.6 g *2.4.6-Trijod-anilin*, 1.2 g Natrium in 200 ccm absol. Äthanol und 9.8 g *α -Brom-n-buttersäure-äthylester* hielt man 22 Stdn. im Sieden, wusch das kalt abgesaugte Produkt mit 200 ccm Wasser und kochte es mit 70 ccm Äthanol aus: 22.5 g, Schmp. 187° (keine Depression mit *2.4.6-Trijod-anilin*).

WILHELM FRIEDRICH und KONRAD BERNHAUER

Beiträge zur Chemie und Biochemie der „Cobalamine“, III¹⁾

ÜBER DEN ABBAU DES FAKTORS A MIT CER(III)-HYDROXYD

Aus dem Biochemischen Forschungslaboratorium
der Aschaffenburger Zellstoffwerke AG., Stockstadt a. M.

(Eingegangen am 22. Oktober 1956)

Aus dem Cer(III)-Hydrolysat des Faktors A wird nach Chromatographie mit Hilfe der Ionenaustauscher Dowex-2 und Amberlite IRC-50 ein kristallisiertes Nucleosid gewonnen, dessen Eigenschaften für 2-Methyl-7-[D-ribofuranosido]-adenin sprechen. Das elektrophoretische Verhalten von Pseudovitamin B₁₂ und Faktor A wird näher untersucht.

Wir berichteten vor kurzem über die Spaltbarkeit von B₁₂-Faktoren mit Cer(III)-hydroxyd und Isolierung des kristallisierten Nucleosides des Pseudovitamins B₁₂^{1,2)}. Gegenstand dieser Mitteilung ist die analoge Spaltung des Faktors A in präparativem Maßstab und Isolierung des entsprechenden Nucleosides in kristallisiertem Zustand.

Über den Nucleotid-Anteil des Faktors A³⁾ war bisher bekannt, daß er 2-Methyladenin^{4,5)} und Ribose⁴⁾ enthält. Uns interessierte vor allem die Struktur des Nucleosides, von dem als Folge der Konstitutionsaufklärung des Vitamins B₁₂⁶⁾ die Kon-

1) II. Mitteil.: W. FRIEDRICH und K. BERNHAUER, Chem. Ber. 89, 2507 [1956].

2) W. FRIEDRICH und K. BERNHAUER, Angew. Chem. 68, 580 [1956].

3) J. E. FORD und J. W. G. PORTER, Biochem. J. 51, V [1952]; Brit. J. Nutrit. 7, 326 [1953].

4) H. W. DION, D. G. CALKINS und J. J. PFIFFNER, J. Amer. chem. Soc. 76, 948 [1954].

5) F. B. BROWN und E. LESTER SMITH, Biochem. J. 56, XXXIV [1954]; F. B. BROWN, J. C. CAIN, D. E. GANT, L. F. J. PARKER und E. LESTER SMITH, ebenda 59, 82 [1955].

6) D. C. HODGKIN, J. PICKWORTH, J. H. ROBERTSON, K. N. TRUEBLOOD, R. J. PROSEN, J. G. WHITE; R. BONNET, J. R. CANNON, A. W. JOHNSON, I. SUTHERLAND, A. R. TODD und E. LESTER SMITH, Nature [London] 176, 325, 328 [1955].

figuration 7- α verlangt wird⁷⁾. Die bisher in der Natur aufgefundenen Purinnucleoside haben bekanntlich die 9- β -Konfiguration.

Wir gewannen das Nucleosid aus Faktor A im Prinzip nach der bereits beschriebenen Methode¹⁾. Infolge der verhältnismäßig hohen Basizität dieses Nucleosides mußte jedoch seine weitere Reinigung mit Hilfe des Kationenaustauschers Amberlite IRC-50 modifiziert werden: Nach Adsorption und Entwicklung mit Wasser wurde die Säule zerschnitten und die nucleosidhaltigen Teile des Austauschers mit verdünnter Ammoniaklösung eluiert. So konnte das Nucleosid (das im mittleren Teil der Säule gefunden wurde) vom Ätiocobalamin (das am oberen Ende der Säule adsorbiert war) vollkommen getrennt werden.

Das Nucleosid kristallisiert aus Wasser als Trihydrat in langen haarförmigen Nadeln, die i. Vak. über Natriumhydroxyd bei 20° ihre Zusammensetzung nicht verändern, im Kofler-Mikroschmelzpunkt-Apparat bei mäßigem Erhitzungstempo ab 70° langsam einen Teil des Kristallwassers verlieren und bei 143–145° als Hydrat schmelzen. Die aus Methanol umkristallisierte Substanz ist wasserfrei und schmilzt bei 219–220°, nach erneutem Umkristallisieren aus Wasser erwartungsgemäß wieder bei 143–145°. Im Papierchromatogramm läuft das Nucleosid aus Faktor A etwas langsamer als Adenosin. Nach Entwicklung mit (1) n-Butanol-Äthanol-Wasser-NH₃ bzw. mit (2) wäbr. n-Butanol wurden für R_{Adenosin} die Werte (1) 0.86 und (2) 0.79 gefunden^{8,9)}.

Beim Erhitzen in 0.05 *n* HCl auf 100° während 15 Min. wird die Substanz in 2-Methyl-adenin und D-Ribose gespalten. 2-Methyl-adenin wurde durch Ermittlung des Absorptionsspektrums¹⁰⁾ bei p_{H} 1 und 12 nachgewiesen, D-Ribose durch Papierchromatographie^{8,11)}. Nach Entwicklung mit (1) n-Butanol-Essigsäure-Wasser bzw. mit (2) n-Butanol-Äthanol-Wasser-NH₃ und Besprühen mit Anilinphthalat wurden Flecke mit den R_{F} -Werten (1) 0.25 und (2) 0.17 beobachtet. D-Ribose (Handelspräparat) hatte die gleichen R_{F} -Werte. Bei der quantitativen Säurehydrolyse ergab 1 Mol der Substanz (335.3) 1 Mol 2-Methyl-adenin (spektrophotometrisch bestimmt) und 1 Mol Ribose (bestimmt mit Hilfe der Orcin-Reaktion¹²⁾). 1 Mol der Substanz verbraucht in wäbr. Lösung während 5 bzw. 20 Min. 1 Mol Perjodat¹³⁾. Diese Eigenschaften, gestützt durch das Ergebnis der Elementaranalyse, charakterisieren die Substanz eindeutig als 2-Methyl-adenin-ribofuranosid.

Zur Bestimmung des Verknüpfungsortes des 2-Methyl-adenins mit dem Ribosemolekül konnten wir vorläufig nur die Löslichkeitseigenschaften und das Absorptionsspektrum des Nucleosides heranziehen. Das Nucleosid des Faktors A ist in 0.1 *n* NaOH unlöslich, woraus zu entnehmen ist, daß das Ribosemolekül am Imidazolring gebunden ist¹⁰⁾. Im Absorptionsspektrum der Nucleosidbase aus Faktor A tritt bemerkens-

⁷⁾ D. C. HODGKIN, s. dazu Biochem. Soc. Symposium No. 13, „The Biochemistry of Vitamin B₁₂“, Cambridge, University Press 1955, S. 28, Fußnote.

⁸⁾ Schleicher & Schüll-Papier Nr. 2043 a; aufsteigend; Entwicklungsdauer 39 Stdn.

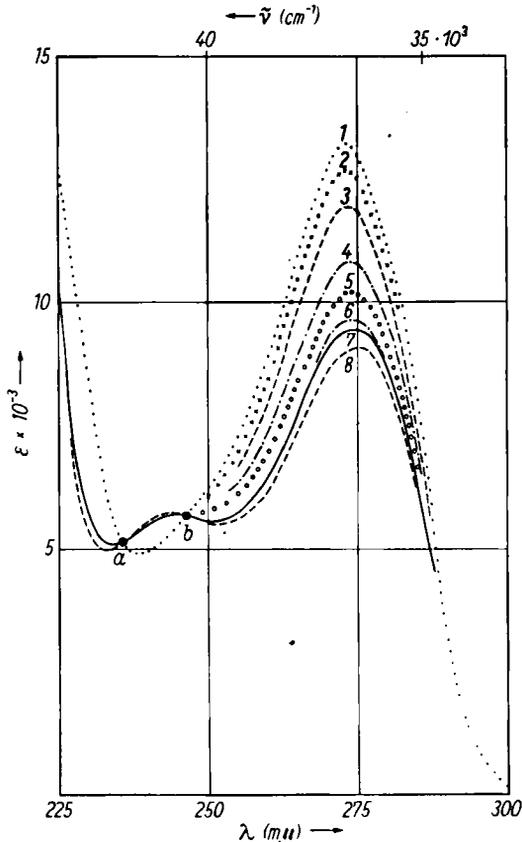
⁹⁾ Die Flecken wurden mit Hilfe der Analysenlampe PL 320 der Quarzlampen-Gesellschaft m. b. H., Hanau, sichtbar gemacht.

¹⁰⁾ J. BADDILEY, B. LYTCHGOE und A. R. TODD, J. chem. Soc. [London] 1944, 318.

¹¹⁾ F. CRAMER, Papierchromatographie, 2. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., 1953.

¹²⁾ D. GLICK, Methods of Biochemical Analysis, Interscience Publ., New York, Vol. I, 1954, S. 298. ¹³⁾ I. c.¹²⁾, Vol. III, 1956, S. 111 ff.

weiterweise bei 244 $m\mu$ eine zweite wenig ausgeprägte Bande auf, die u. a. auf die induktive Wirkung der 2-Methylgruppe zurückzuführen ist, und die auf die Existenz zweier mesomerer Gleichgewichtsformen hindeutet. In sehr geringem Ausmaß dürfte eine analoge Gleichgewichtsform in der wäßrigen Lösung der Nucleosidbase aus Pseudovitamin B₁₂ vorhanden sein, worauf die Schleife bei 239–249 $m\mu$ und die ähnliche Lage der isobestischen Punkte hindeuten ¹⁾. Das Absorptionsmaximum der Hauptbande des Nucleosides aus Faktor A (vgl. Abbild. 1 und Tab.) stimmt in seiner Lage mit dem Maximum des 2.7-Dimethyl-adenins weitgehend überein und



Abbild. 1. Absorptionsspektrum des Nucleosides aus Faktor A in 0.1–0.001 n HCl sowie in 0.05 m Glykokollpuffer vom p_H 3.4 (1), in 0.05 m Acetat-Essigsäure-Puffer vom p_H 4.1 (2), p_H 4.4 (3), p_H 5.0 (4), p_H 5.3 (5), p_H 5.6 (6), in Wasser (7), in 0.15 m NH_4Cl-NH_4OH -Puffer vom p_H 7.8 sowie in 0.01 n KOH (8). Die isobestischen Punkte a und b entsprechen dem Gleichgewicht $Kation \rightleftharpoons freie\ Base$ ($p_K = 4.8$)

unterscheidet sich deutlich von den Maxima des 2.9-Dimethyl-adenins und des 2-Methyl-9-[D-xylosido]-adenins (vgl. Tab.). Zur Verdeutlichung sind in der Tab. zwei Gruppen von Adeninderivaten zusammengestellt, nämlich solche, die entweder

am N-9 oder am N-7 substituiert sind. Die Absorptionsbanden der Basenformen der ersten Gruppe zeigen meist sehr deutlich eine Bandenerhöhung, die durch den Beitrag des einsamen Elektronenpaares des Aminostickstoffes zur Mesomerie der Ringstruktur hervorgerufen sein dürfte. Die Absorptionsbanden der zweiten Gruppe zeigen diese Eigenschaft nicht, im Gegenteil, sie sind alle niedriger als die Kationenformen. Hier dürfte also die Resonanz des einsamen Elektronenpaares des Aminostickstoffes durch die Nachbarschaft des N-Substituenten gestört sein. Die spektroskopischen Eigenschaften des Nucleosides aus Faktor A weisen es in die zweite Gruppe. Auf Grund dieser Tatsache sowie des bereits früher Gesagten erscheint N-9 des 2-Methyl-adenins als Verknüpfungsstelle mit dem Ribosemolekül ausgeschlossen und N-7 gesichert.

UV-Absorption des Nucleosides des Faktors A und einiger verwandter Verbindungen

Verbindung	Kation			Base		
	λ in $m\mu$	$\epsilon \cdot 10^{-3}$	Puffer	λ in $m\mu$	$\epsilon \cdot 10^{-3}$	p_H bzw. Puffer
Adenosin ¹⁴⁾	257	14.6	0.06 <i>n</i> HCl	259.5	14.9	H ₂ O, p_H 6.4
9-Methyl-adenin ¹⁵⁾	260	14.2	0.05 <i>n</i> HCl	260	14.7	0.05 <i>n</i> NaOH
2.9-Dimethyl-adenin ¹⁰⁾	264	12.7	0.1 <i>n</i> HCl	264	16.2	0.01 <i>n</i> NaOH
2-Methyl-9-[D-xylosido]-adenin ¹⁰⁾	260.5	12.5	0.1 <i>n</i> HCl	262.5	14.7	0.1 <i>n</i> NaOH
Nucleosid aus Faktor A	273	13.2	0.1 <i>n</i> HCl	276	9.1	p_H 12
				244	5.7	
2.7-Dimethyl-adenin ¹⁰⁾	273	16.2	0.1 <i>n</i> HCl	277	13.2	0.1 <i>n</i> NaOH
7-Methyl-adenin ¹⁵⁾	269	14.6	0.05 <i>n</i> HCl	269	11.4	0.05 <i>n</i> NaOH

Zur Strukturaufklärung von Purinnucleosiden leistet der Vergleich ihrer Absorptionsspektren mit denen entsprechend alkylierter Purine^{1,10,16)} sehr gute Dienste. Wie wir vor kurzem zeigen konnten¹⁷⁾, läßt sich diese Methode auch auf die Nucleoside bzw. Nucleotide asymmetrischer Benzimidazole anwenden. So ist z. B. das Absorptionsspektrum des Nucleotides des Faktors III beinahe identisch mit dem des 1-Methyl-5-hydroxy-benzimidazols¹⁷⁾. Es ist zu erwarten, daß die Absorptionsspektren der Nucleoside bzw. Nucleotide und entsprechend substituierter Alkylderivate in der Benzimidazolreihe besser übereinstimmen als in der Purinreihe, wo im Pyrimidinring weitere Stickstoffatome auftreten, die mit der Zuckerkomponente die Mesomerie der Ringstruktur störende lockere Bindungen eingehen können. Dieser Erwartung entsprechen auch die Unterschiede in den Absorptionsspektren des Nucleosides aus Faktor A und des 2.7-Dimethyl-adenins (dem z. B. das zweite Maximum fehlt und dessen isobestische Punkte anders gelegen sind¹⁸⁾) einerseits, sowie in den Spektren des 2-Methyl-9-[D-xylosido]-adenins und des 2.9-Dimethyl-adenins andererseits.

¹⁴⁾ G. H. BEAVEN, E. R. HOLIDAY und E. A. JOHNSON, in E. CHARGAFF und J. N. DAVIDSON, „The nucleic acids“, Academic Press Inc., Publ. New York, 1955, Vol. I, S. 502.

¹⁵⁾ J. M. GULLAND und E. R. HOLIDAY, J. chem. Soc. [London] 1936, 765.

¹⁶⁾ J. M. GULLAND und Mitarbb., J. chem. Soc. [London] 1934, 1639; 1936, 765; 1937, 1912; 1938, 259, 692.

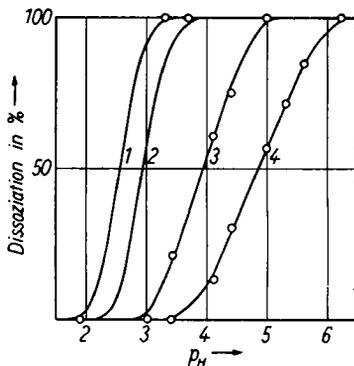
¹⁷⁾ W. FRIEDRICH und K. BERNHAUER, Chem. Ber. 89, 2030 [1956].

Bei der Elektrophorese in Essigsäure-Puffer (p_H ca. 2.6) bewegt sich Faktor A bekanntlich etwa doppelt so schnell als Pseudovitamin B₁₂¹⁹⁾. Dieses Verhalten wurde nun durch folgende Beobachtungen geklärt:

1. Beide Pseudofaktoren sind elektrophoretisch unterhalb von p_H 1.9 gleich beweglich (kathodisch), oberhalb von p_H 3.7 unbeweglich, innerhalb dieses Bereiches wandern sie aber infolge ihrer unterschiedlichen Basizität verschieden schnell. Dies ist bei dem etwa in der Mitte liegenden p_H -Wert von 2.6 besonders deutlich. Sie sind daher nur in diesem p_H -Gebiet elektrophoretisch unterscheidbar und voneinander trennbar (s. dazu Abbild. 2).

2. Die Unterschiede in der Basizität prägen sich bei den zugehörigen Nucleosiden noch deutlicher aus, allerdings in anderen p_H -Bereichen. Das Nucleosid des Faktors A ist bedeutend basischer als das des Pseudovitamins B₁₂ (s. Abbild. 2).

Die beiden Pseudofaktoren verdanken also ihre Basizität nur je einer basischen Gruppe, und zwar der Aminogruppe des Adenins bzw. des 2-Methyl-adenins. Die Basizität dieser Aminogruppe der Pseudofaktoren ist, verglichen mit der Basizität der isolierten Nucleoside, stark vermindert (vgl. Abbild. 2), was dadurch erklärt werden kann, daß das einsame Elektronenpaar des Aminostickstoffs über die Ringstruktur an der N-9-Co-Bindung teilnimmt, wodurch seine Fähigkeit, ein Proton zu binden, herabgesetzt ist.



Abbild. 2. Elektrolytische Dissoziation des Kations des Pseudovitamins B₁₂ (1), des Faktors A (2) und der Nucleoside aus Pseudovitamin B₁₂ (3) und Faktor A (4), abhängig vom p_H . (1) und (2) geschätzt aus der elektrophoretischen Beweglichkeit der Pseudofaktoren und ihrer Desaminierungsprodukte (Faktoren G und H) bei verschiedenen p_H -Werten in 0.05 *m* Glykokoll-HCl-Puffer bei 300 Volt während 3 Stdn. (3) und (4) ermittelt aus den Absorptionsspektren der Nucleoside aus Pseudovitamin B₁₂¹⁾ und Faktor A

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE*)

Nucleosid des Faktors A: In einem 250 ccm fassenden, mit Rückflußkühler versehenen Rundkolben wurden 500 mg ($3.18 \cdot 10^{-4}$ Mol) Faktor A in 64 ccm Wasser gelöst und in der gleichen Reihenfolge mit 38.4 ccm ($128 \cdot 10^{-4}$ Mol) einer 0.333 *m* Lösung von $Ce(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$, 32 ccm 1.0 *n* NaOH ($320 \cdot 10^{-4}$ Äquival.) und 1.92 ccm ($64 \cdot 10^{-4}$ Mol) einer 10-proz. HCN-Lösung versetzt. Das Gemisch wurde unter zeitweisem Schütteln 45 Min. auf dem siedenden Wasserbad erhitzt und nach Erkalten (End- p_H ca. 5) mit wäßriger Ammoniaklösung auf p_H ca. 8.5 gebracht (bei diesem p_H ist die Absetzbarkeit und Filtrierbarkeit des Cerhydroxyds gut, bei höheren p_H -Werten bildet sich dagegen ein nicht absetzbares und nicht filtrierbares Sol). Nach Stehenlassen über Nacht bei +3° wurde die klare Flüssigkeit abdekantiert, der cerhydroxyd-haltige Rest durch ein Sinterglasfilter (G3) filtriert und der Filtrerrückstand

¹⁸⁾ Ermittelt an einer von SIR A. R. TODD freundlicherweise zur Verfügung gestellten Probe, für deren Überlassung wir auch hier verbindlichst danken.

¹⁹⁾ E. S. HOLDSWORTH, Nature [London] 171, 148 [1953].

*) Mikroanalysen durchgeführt von A. BERNHARDT, Mikroanalyt. Laboratorium im Max-Planck-Institut für Kohlenforschung, Mülheim (Ruhr).

mehrmals sorgfältig mit verdünnter wäßr. Ammoniaklösung (p_H ca. 8.5) gewaschen. Die Filtrate wurden vereint (200 ccm), durch Zusatz von 15 ccm 25-proz. wäßr. Ammoniaklösung auf p_H ca. 10.3 gebracht und durch eine Säule aus Dowex-2-Formiat langsam durchlaufen gelassen (Korngröße 0.1 mm, Durchmesser 3.5 cm, Höhe 85 cm; die Säule wurde vorher mit 0.15 n Ammoniak bis zu leicht alkalischem Durchlauf gewaschen). Es wurde zunächst das Ätiocobalamin (mit 0.25-proz. wäßr. Ammoniaklösung) und anschließend das Nucleosid (mit Wasser) eluiert. Die bei 276 $m\mu$ absorbierenden Fraktionen wurden i. Vak. auf ca. 20 ccm eingengt und durch eine Säule aus Amberlite IRC-50 (Säureform, Korngröße 0.1 mm, Durchmesser 1.9 cm, Höhe 36 cm) durchgelassen. Die Säule wurde langsam mit ca. 2 l Wasser gewaschen und anschließend in 7 Teile zerschnitten. Der oberste Teil (Nr. 1) war rotgefärbt (Ätiocobalamin), die Teile 3--5 waren farblos und enthielten das Nucleosid.

Der Austauscher der Teile 3--5 wurde in Wasser suspendiert, der Brei mit Ammoniak auf p_H ca. 10.3 gebracht, in ein Chromatographierrohr gefüllt und mit Ammoniakwasser (p_H 10.3) eluiert. Die Eluate wurden durch Filtration (Sinterglasfritte G4) von Austauscherresten befreit und i. Vak. auf ein sehr kleines Volumen eingengt. Der krist. Rückstand wurde aus 2.5 ccm heißem Wasser umkristallisiert. Ausb. 93 mg (ca. 80% d. Th.) an feinen haarförmigen Kristallen mit Seidenglanz. Schmp. 143--145° (Kofler-Mikroschmelzpunkt-Apparat).

$C_{11}H_{15}O_4N_5 \cdot 3H_2O$ (335.3) Ber. C 39.40 H 6.32 O 33.40 N 20.88

Gef. C 39.10 H 6.39 O 33.62 N 20.53

Die i. Hochvak. bei 100° getrocknete Substanz hatte folgende Zusammensetzung:

$C_{11}H_{15}O_4N_5$ (281.3) Ber. C 46.96 H 5.37 Gef. C 47.07 H 5.40

WILLY LAUTSCH, WINFRIED GEHRMANN, RUDOLF PASEDAG und KLAUS PRATER

ÜBER DURCH PORPHYRINCARBONSÄUREN *N*-ACYLIERTE AMINOSÄUREN UND ÜBER EINIGE FUNKTIONELLE DERIVATE VON PORPHYRINEN UND PHORBINEN DER BLUT- UND BLATT-FARBSTOFFREIHE ¹⁾

Aus dem Institut für Organische Chemie der Freien Universität, Berlin-Dahlem

(Eingegangen am 2. November 1956)

Die Darstellung von durch Porphyrincarbonsäuren der Blut- und Blattfarbstoffreihe *N*-acylierten Aminosäuren wird beschrieben. Zum Aufbau von mit Wirkungsgruppen substituierten Polypeptiden als Fermentmodelle der Atmungskette werden die funktionellen Derivate von Porphyrinen und Phorbinnen synthetisiert.

Die zum systematischen Aufbau linearer, porphyrin- und phorbinsubstituierter Polypeptide — wie sie ausgehend von bifunktionellen Anhydriden (I), bifunktionellen Säureamiden (II) bzw. monofunktionellen Säureamiden (III) erhalten werden — erforderlichen Phorbinanhydride (VII; $R = O \cdot CO_2C_2H_5$) und Porphyrinamide (V;

¹⁾ 21. Mittel.: Über Fermentmodelle, von W. LAUTSCH und Mitarbb.; 20. Mittel.: W. LAUTSCH und H.-J. KRAEGER, Chem. Ber. 89, 737 [1956].