

ZUSAMMENFASSUNG

Hexa-O-acetyl-scillaren A (II) wurde mit KMnO_4 in Aceton zu einem ungesättigten Ätiansäurederivat (V) abgebaut, das sich in 3 β -Hydroxy-5 α -ätiansäuremethylester (X) bzw. 5 α -Ätiansäuremethylester (XII) überführen liess. Die für *Scilla*-Glykoside charakteristische C-4-Doppelbindung wurde bei der Oxydation nicht angegriffen.

Pharmazeutisch-chemisches Laboratorium SANDOZ, Basel

93. Synthesen auf dem Vitamin-B₁₂-Gebiet

1. Mitteilung

Gewinnung und Reinigung des Faktors V_{1a}

von K. Bernhauer¹⁾²⁾, Hw. Dellweg¹⁾, W. Friedrich¹⁾, G. Gross¹⁾,
F. Wagner²⁾ und P. Zeller³⁾

(3. III. 60)

Unter den Vitamin-B₁₂-Faktoren des Faulschlammes finden sich ausser zahlreichen nucleotidhaltigen Cobalamin-Analoga⁴⁾ auch nucleotidfreie Stoffe, z. B. die Faktoren B, Ib⁵⁾ und die Faktoren V⁶⁾, die auf Grund ihres elektrophoretischen Verhaltens eine bis fünf freie Carboxylgruppen besitzen (Faktoren V₁–V₅). Bei der Amidierung eines Gemisches dieser Stoffe oder der bei pH 6,5 elektrophoretisch getrennten Fraktionen der Mono- bis Tetra-Carbonsäuren erhält man zwei Substanzen, von denen sich eine als Faktor B erweist. Die zweite verhält sich elektrophoretisch wie Faktor B, wandert aber papierchromatographisch langsamer als dieser und ist mikrobiologisch inaktiv⁶⁾. Das Verhalten dieser Substanz wurde so gedeutet, dass den ihr zugrundeliegenden Carbonsäuren die 1-Amino-2-propanol-Gruppe fehlt. In der vorliegenden Arbeit wird die Isolierung und Reinigung einer solchen Säure beschrieben.

B₁₂-Konzentrate aus Faulschlamm, der aus Hefeabwasser stammte, wurden in einer Pilot-Anlage in Holzzellulose-Säulen chromatographisch aufgetrennt. Dabei konnte eine einheitliche Substanz isoliert werden, die sich als nucleotidfreie Monocarbonsäure erwies und die wir – da sie sich von anderen derartigen Monocarbonsäuren chromatographisch unterscheidet⁷⁾ – als Faktor V_{1a} bezeichnen.

¹⁾ Biochemisches Forschungslaboratorium der ASCHAFFENBURGER ZELLSTOFFWERKE AG., Stockstadt a. M.

²⁾ Lehrstuhl für Biochemie an der Technischen Hochschule, Stuttgart.

³⁾ Chemische Forschungsabteilung der F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG., Basel.

⁴⁾ W. FRIEDRICH & K. BERNHAUER, Biologie und Biochemie der natürlichen Vitamin-B₁₂-Analoga, in K. F. BAUER, Medizinische Grundlagenforschung, Bd. II, S. 661, G.-Thieme-Verlag, Stuttgart 1959.

⁵⁾ Hw. DELLWEG & K. BERNHAUER, Arch. Biochem. Biophysics 69, 74 (1957).

⁶⁾ K. BERNHAUER & W. FRIEDRICH, Angew. Chem. 66, 776 (1954).

⁷⁾ K. BERNHAUER, E. BECHER, G. GROSS & G. WILHARM, in Vorbereitung.

Dieser Faktor ist in der zwischen den Fraktionen des Vitamins B₁₂ und des Faktors III liegenden Chromatogramm-Zone enthalten. Er wurde durch folgende Operationen weiter gereinigt:

1. Säulenchromatographie an Linterspulver: Faktor V_{1a} wurde als am langsamsten wandernde Zone von den rascher wandernden Zonen des Faktors Ib⁵⁾, des 2-Methylmercaptoadenin-cobalamins⁸⁾ sowie der Benzimidazol- und 5-Methylbenzimidazol-cobalamin-Analoga⁹⁾ abgetrennt.

2. Elektrophoretische Reinigung bei pH 2,7: Gewinnung des Faktors V_{1a} aus der kathodisch wandernden Zone als violettes, amorphes Pulver. Der Reinheitsgrad eines so gewonnenen Präparates betrug 72% (spektroskopisch ermittelt), bzw. 72,3% auf Grund der Kobaltbestimmung¹⁰⁾. Der hydrolytische Abbau mit 20-proz. Salzsäure bei 100°¹¹⁾ ergab zahlreiche Ninhydrin-positive Substanzen¹²⁾, die offenbar aus proteinartigen Begleitstoffen entstanden waren.

3. Reinigung mittels Kationenaustauschern des Polysaccharidtypus¹³⁾: Beim Durchlauf einer wässrigen Lösung des Faktors V_{1a} durch Säulen aus Phosphat-Zellulose, Carboxymethyl-Zellulose oder Alginsäure wird der Faktor in der Monocyano-monoaquo-Form adsorbiert, während neutrale und saure Verunreinigungen mit Wasser ausgewaschen werden. Durch anschliessende Entwicklung mit cyanidhaltigem Wasser kann Faktor V_{1a} als neutraler Dicyano-Komplex ausgewaschen werden, während basische Proteine gebunden bleiben. Der so gereinigte Faktor V_{1a} ist ein violettrottes Pulver mit einem Reinheitsgrad von 80–86% (auf Grund der Kobaltbestimmung¹⁰⁾ unter Zugrundelegung eines Molekulargewichtes von 985,1 für den Dicyano-Komplex). Er enthält keine proteinartigen Verunreinigungen mehr und ist für die in den folgenden Mitteilungen beschriebenen Umsetzungen rein genug.

Unter den genannten Kationenaustauschern besitzt Phosphat-Zellulose die höchste Austauscher-Kapazität, doch ist sie zur Reinigung grösserer Mengen Faktor V_{1a} nur bei tiefer Temperatur anwendbar, da infolge der längeren Verweilzeit schon bei Raumtemperatur eine Zersetzung des Faktors V_{1a} unter Bildung von Di- und Polycarbonsäuren stattfindet. Nach 8stündigem Verweilen an Phosphat-Zellulose bei 20° waren bereits 6% Dicarbonsäure und nach 24 Std. 17% Di- und 1,8% Polycarbonsäuren entstanden, wie die elektrophoretische Prüfung der Eluate bei pH 6,5 zeigte. Bei Anwendung von Carboxymethyl-Zellulose (SCHLEICHER & SCHÜLL) unter den gleichen Bedingungen liessen sich elektrophoretisch keinerlei Hydrolyseprodukte nachweisen.

Elektrophoretisch wandert der Faktor V_{1a} bei pH 2,7 als orangegefärbter Monocyano-monoaquo-Komplex zur Kathode (wie Faktor B), bei pH 6,5 aber als violettgefärbter Dicyano-Komplex zur Anode. Dieses Verhalten spricht dafür, dass es sich um eine nucleotidfreie Monocarbonsäure handelt.

⁸⁾ W. FRIEDRICH & K. BERNHAUER, Chem. Ber. 90, 1966 (1957).

⁹⁾ W. FRIEDRICH & K. BERNHAUER, Chem. Ber. 91, 2061 (1958).

¹⁰⁾ J. M. CHILTON, Analyt. Chemistry 25, 1274 (1953).

¹¹⁾ G. COOLEY, M. T. DAVIES, B. ELLIS, V. PETROW & B. STURGEON, J. Pharmacy Pharmacol. 5, 257 (1953).

¹²⁾ S. MOORE & W. H. STEIN, J. biol. Chemistry 211, 907 (1954).

¹³⁾ J. PAWELKIEWICZ, W. WALERYCH, W. FRIEDRICH & K. BERNHAUER, J. Chromatography, im Druck.

Die Amidierung des Faktors V_{1a} ¹⁴) liefert ein Produkt, das sich elektrophoretisch wie Faktor B verhält, papierchromatographisch von diesem aber deutlich verschieden ist (siehe Tab.). Das Amidierungsprodukt ist im Test mit *E. coli* 113-3 inaktiv und offenbar identisch mit der eingangs erwähnten Substanz, die bereits früher⁶⁾ bei der Amidierung eines Gemisches der Faktoren V neben Faktor B erhalten worden war.

Bemerkenswert ist, dass der Faktor V_{1a} bei der Verarbeitung von Faulschlamm aus Hefeabwässern als einzige inkomplette Monocarbonsäure aufgefunden wurde. Die Strukturaufklärung ist in der anschliessenden 2. Mitteilung beschrieben.

Papierchromatisches Verhalten von Faktor V_{1a} und seinem Amid

Faktor	Relative Rf-Werte (Faktor B = 1)				
	A	B	C	D	E
V_{1a}	0,53	0,45	0,97	0,65	0,34
V_{1a} -Amid	0,90	0,87	0,90	0,91	0,88

Aufsteigende Chromatographie an WHATMAN-Papier Nr. 1, 18 Std. bei 22–23°, mit folgenden Entwicklern:

A = Wassergesättigtes sec.-Butanol, 0,01% HCN.

B = Wie A, gesättigt mit $KClO_4$.

C = 100 Tle. sec.-Butanol, 50 Tle. Wasser, 1 Tl. Eisessig, 0,05 Tle. 10-proz. HCN-Lösung.

D = 100 Tle. sec.-Butanol, 36 Tle. Wasser, 14 Tle. 25-proz. NH_3 -Lösung, 0,05 Tle. 10-proz. HCN-Lösung.

E = Wassergesättigtes sec.-Butanol, 0,05% HCN, 0,5% Natrium-tetraphenylborat (Kalignost).

Experimentelles. – Aus 88 m³ Faulschlamm der mit Hefeabwasser gespeisten Kläranlagen Nuttlar und Darmstadt-Eberstadt wurden in üblicher Weise¹⁵⁾ Kieselgur-Trockenpräparate gewonnen, die ein Gemisch der B_{12} -Faktoren enthielten. Bei der halbtechnischen Chromatographie an Säulen aus Holzzellulose (40 × 120 cm) unter Verwendung von n-Butanol + 15% Wasser (enthaltend Kaliumperchlorat und etwas Blausäure) wurde zwischen den Zonen des Vitamins B_{12} und des Faktors III ein Zwischenlauf abgetrennt, aus dem wiederum ein Kieselgurpräparat der B_{12} -Faktoren gewonnen wurde. Dieses Präparat unterwarf man einer erneuten Chromatographie mit Linterspulver (SCHLEICHER & SCHÜLL Nr. 124) in 48 Säulen (7 × 30 cm) unter Verwendung von n-Butanol mit 15% Wasser und 0,005% Blausäure als Entwickler. Dabei wurden rascher wandernde Fraktionen abgetrennt. Die am langsamsten wandernde Zone enthielt den Faktor V_{1a} und wurde nach dem Konzentrieren im Vakuum der Elektrophorese auf Zellulosekartons (SCHLEICHER & SCHÜLL Nr. 2230) bei pH 2,7 (0,5M Essigsäure + 0,005% Blausäure) unterworfen. Dabei wurden geringe Mengen neutraler B_{12} -Faktoren abgetrennt. Die aus Faktor V_{1a} bestehende, zur Kathode wandernde Zone wurde durch Phenolextraktion gereinigt¹⁵⁾. Der dabei erhaltene wässrige Extrakt ergab nach dem Einengen im Vakuum und Verreiben mit Aceton 13,6 g eines violettroten, amorphen Pulvers. Eine konz. wässrige Lösung davon liess man über eine Säule aus Carboxymethyl-Zellulose (SCHLEICHER & SCHÜLL) laufen und entwickelte mit Wasser. Sobald keine Elution mehr festgestellt wurde, setzte man dem Wasser 0,05–0,1% Blausäure zu und entwickelte weiter, bis der Faktor V_{1a} als violette Zone die Säule verlassen hatte. Das Eluat wurde im Vakuum bei Raumtemperatur auf ein kleines Volumen eingengt und wie zuvor beschrieben auf ein amorphes Pulver verarbeitet.

Für die Durchführung der mikrobiologischen Teste danken wir Frau Dipl. Chem. ELISABETH BECHER.

¹⁴⁾ J. B. ARMITAGE, J. R. CANNON, A. W. JOHNSON, L. F. J. PARKER, E. LESTER SMITH, W. H. STAFFORD & A. R. TODD, *J. chem. Soc.* 1953, 3849; Hw. DELLWEG, E. BECHER & K. BERNHAUER, *Biochem. Z.* 328, 81 (1956).

¹⁵⁾ W. FRIEDRICH & K. BERNHAUER, *Z. Naturforsch.* 9b, 755 (1954).

SUMMARY

A monocarboxylic acid belonging to the group of incomplete cobalamines has been obtained from sewage sludge. It is called factor V_{1a} and some of its properties are described.

Biochemisches Forschungslaboratorium
der ASCHAFFENBURGER ZELLSTOFFWERKE AG., Stockstadt a. M.,
Lehrstuhl für Biochemie an der Technischen Hochschule, Stuttgart,
und Chemische Forschungsabteilung der
F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG., Basel

94. Synthesen auf dem Vitamin- B_{12} -Gebiet

2. Mitteilung

Strukturermittlung des Faktors V_{1a}

von K. Bernhauer¹⁾, F. Wagner¹⁾ und P. Zeller²⁾

(3. III. 60)

In der vorangehenden Mitteilung wurde gezeigt, dass bei der Amidierung des Faktors V_{1a} nicht Faktor B, sondern ein mikrobiologisch inaktives Produkt entsteht. Auf Grund dieses Befundes stehen für die Struktur des Faktors V_{1a} folgende drei Möglichkeiten zur Diskussion:

1. Es handelt sich um eine Cobalamin-Carbonsäure, welche den 1-Amino-2-propanol-Rest an der Propionsäuregruppe im Ring D nicht enthält³⁾.

2. An Stelle des 1-Amino-2-propanol-Restes ist L-Threonin vorhanden, da gezeigt wurde⁴⁾, dass biogenetisch der Aminoalkohol aus dieser Aminosäure entsteht.

3. Im Ring C ist ein Essigsäurerest an Stelle einer Methylgruppe vorhanden, da die Biosynthese der Vitamin- B_{12} -Molekel vermutlich aus einer Vorstufe des Uroporphyrins III erfolgt⁵⁾.

Im folgenden wird die Annahme 1 bewiesen.

Einwirkung von Cer(III)-hydroxyd⁶⁾ auf Faktor V_{1a} verändert diesen nicht, woraus zu schliessen ist, dass er keine Phosphorsäure-Gruppe enthält. Dass Faktor V_{1a} eine Monocarbonsäure ist, zeigt sein elektrophoretisches Verhalten und die potentiometrische Titration (s. Fig.), die das Äquiv.-Gew. $1002 \pm 2\%$ und den pK-Wert 5,7 ergibt (Mol.-Gew. ber. für den Dicyano-Komplex 985,1). Aus der Kobaltbestimmung und der potentiometrischen Titration kann für Faktor V_{1a} ein molarer Extinktions-

¹⁾ Lehrstuhl für Biochemie an der Technischen Hochschule, Stuttgart.

²⁾ Chemische Forschungsabteilung der F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG., Basel.

³⁾ K. BERNHAUER & W. FRIEDRICH, *Angew. Chem.* **66**, 776 (1954).

⁴⁾ A. I. KRASNA, C. ROSENBLUM & D. B. SPRINSON, *J. biol. Chemistry* **225**, 745 (1957).

⁵⁾ D. SHEMIN, J. W. CORCORAN, C. ROSENBLUM & I. M. MILLER, *Science* **124**, 272 (1956); J. W. CORCORAN & D. SHEMIN, *Biochim. biophysica Acta* **25**, 661 (1957).

⁶⁾ W. FRIEDRICH & K. BERNHAUER, *Z. Naturforsch.* **9b**, 685 (1954); *Angew. Chem.* **68**, 580 (1956); *Chem. Ber.* **89**, 2507 (1956).