

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.

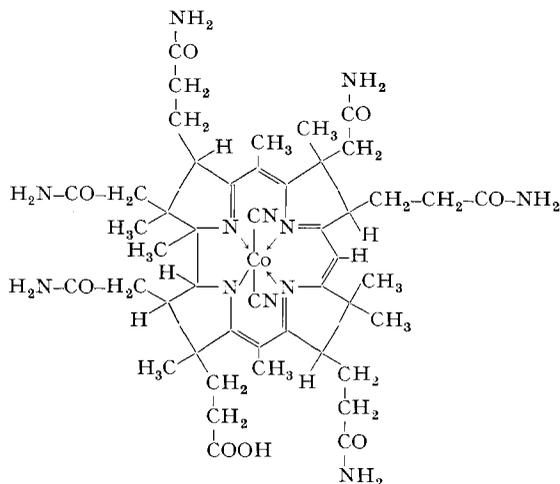
³⁾ K. BERNHAUER & W. FRIEDRICH, *Angew. Chem.* **66**, 776 (1954).

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).

koeffizient $\log \epsilon$ 4,482 (bei λ_{\max} 367 m μ ; pH 7,5 in Gegenwart von CN^\ominus) errechnet werden, also derselbe Wert wie für Vitamin B₁₂. Das UV.-Absorptionsspektrum ist bei pH 2,7 und 7,5 in Gegenwart von Cyanid-Ionen mit demjenigen des Faktors B identisch. Nach dem hydrolytischen Abbau des Faktors V_{1a} mit 20-proz. Salzsäure (6 Std. bei 100°) lassen sich im Hydrolysat weder 1-Amino-2-propanol noch Threonin nachweisen⁷⁾. Damit können die Möglichkeiten 2 und 3 ausgeschlossen werden. Demnach muss dem Faktor V_{1a} die Struktur I zukommen.



I

Dicyanocobyrinsäure-*abcdeg*-hexamid

Der Beweis für diese Struktur wurde durch Überführung des Faktors V_{1a} in Faktor B erbracht. Zu diesem Zweck wird Faktor V_{1a} in das gemischte Anhydrid mit Kohlensäure-monoäthylester⁸⁾ verwandelt und dieses mit DL-1-Amino-2-propanol umgesetzt. Das Kondensationsprodukt kann chemisch von Faktor B nicht unterschieden werden. Das Verhältnis Kobalt⁹⁾/Aminopropanol⁷⁾ in dieser Substanz beträgt 0,99:1,02. Im Test mit *E. coli* 113-3 ist die Verbindung weniger wirksam als Faktor B¹⁰⁾. Verwendet man bei der Umsetzung mit dem gemischten Anhydrid D_g-(-)-1-Amino-2-propanol¹¹⁾, so zeigt das Kondensationsprodukt dieselbe Wirkung wie Faktor B. Wenn man dagegen den Faktor V_{1a} nach der gleichen Methode mit L_g-(+)-1-Amino-2-propanol¹¹⁾ umsetzt, so entsteht ein isomerer Faktor B, der sich vom natürlichen Produkt dadurch unterscheidet, dass er eine viel geringere mikrobiologische Aktivität hat.

⁷⁾ G. COOLEY, M. T. DAVIES, B. ELLIS, V. PETROW & B. STURGEON, *J. Pharmacy Pharmacol.* **5**, 257 (1953).

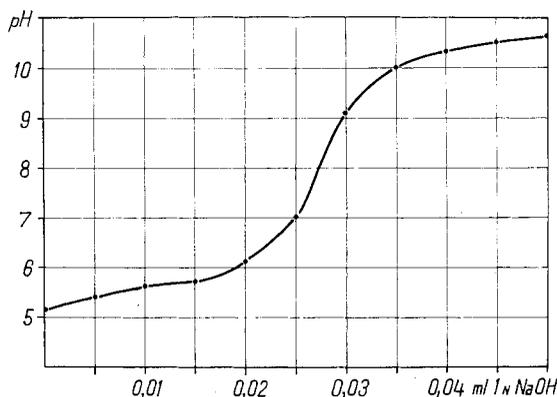
⁸⁾ T. WIELAND & H. BERNHARD, *Liebigs Ann. Chem.* **572**, 190 (1951); R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **34**, 874 (1951); J. R. VAUGHAN JR., *J. Amer. chem. Soc.* **73**, 3547 (1951).

⁹⁾ J. M. CHILTON, *Analyt. Chemistry* **25**, 1274 (1953).

¹⁰⁾ Für die mikrobiologische Prüfung der Verbindungen danken wir Frau Dipl. Chem. E. BECHER.

¹¹⁾ R. L. CLARK, W. H. JONES, W. J. RAICH & K. FOLKERS, *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 3995 (1954).

Bei diesen Umsetzungen kann eine Ausbeute von 80–90% erzielt und die Bildung von Nebenprodukten fast vollständig vermieden werden. Ausschlaggebend für das gute Gelingen der Reaktion ist dass nur ein geringer Überschuss an Chlorameisensäure-äthylester angewendet (1,1–1,2 Mol auf 1 Mol Faktor V_{1a}) und die Umsetzung des gemischten Anhydrids mit 1-Amino-2-propanol in Gegenwart von etwas Wasser vorgenommen wird. Ein manchmal in geringer Menge (3–4%) auftretendes Nebenprodukt verhielt sich elektrophoretisch wie Faktor B und erwies sich papierchromatographisch als einheitlich, aber von Faktor B eindeutig verschieden. Es dürfte sich dabei um den Äthylkohlen säureester des Faktors B handeln.



Titrationsskurve einer Lösung mit $2,94 \times 10^{-5}$ Mol des Faktors V_{1a} mit 1N Natronlauge.

Die Amidierung des Faktors V_{1a} mit 1-Amino-2-propanol gelingt auch mit N,N'-Dicyclohexyl-carbodiimid¹²). Die Ausbeute in einem Versuch betrug nur 22,5%, was vielleicht auf die geringe Acidität des Faktors V_{1a} zurückzuführen ist.

Der Methylester des Faktors V_{1a} entsteht mit Hilfe von Diazomethan in 28-proz. Ausbeute. Den gleichen Ester erhält man in wesentlich höherer Ausbeute (72%) durch Einwirkung von abs. Methanol auf das gemischte Anhydrid aus Faktor V_{1a} und Kohlensäure-monoäthylester. Der Methylester verhält sich erwartungsgemäss bei pH 2,7 und 6,5 elektrophoretisch wie Faktor B, papierchromatographisch läuft er in neutralen und sauren Entwicklern etwas rascher als dieser ($R_{\text{Fakt. B}}$ 1,07; 1,09; 1,05), im ammoniakalischen Entwickler langsamer ($R_{\text{Fakt. B}}$ 0,88). Die Umsetzung des Methylesters mit 1-Amino-2-propanol zu Faktor B verläuft infolge ungenügender Aktivierung der Carboxylgruppe nur sehr zögernd und in schlechter Ausbeute (9% d. Th.).

Diese Umsetzungen beweisen, dass Faktor V_{1a} sich vom Faktor B lediglich durch das Fehlen der $D_g(-)$ -1-Amino-2-propanol-Gruppe unterscheidet. Zugleich ist durch Synthese bestätigt, dass Faktor B die genannte Base enthält, was bisher nur auf analytischem Weg gezeigt worden war¹³).

Gemäss dem neuen Nomenklaturvorschlag auf dem Vitamin- B_{12} -Gebiet¹⁴) ist der Faktor V_{1a} als Dicyanocobyrinsäure-*abcd*eg-hexamid (I) zu bezeichnen.

¹²) J. C. SHEEHAN & G. P. HESS, J. Amer. chem. Soc. 77, 1067 (1955); 78, 1367 (1956).

¹³) D. E. WOLF, W. H. JONES, J. VALIANT & K. FOLKERS, J. Amer. chem. Soc. 72, 2820 (1950).

¹⁴) IUPAC, Nomenclature of Organic Chemistry 1957, S. 85–87, Butterworth, London 1958.

¹⁵) K. BERNHAUER, E. BECHER, G. GROSS & G. WILHARM, in Vorbereitung.

Faktor V_{1a} stellt einen dem Faktor B biogenetisch offenbar vorangehenden Grundkörper der Vitamin- B_{12} -Gruppe dar. Im Test mit *E. coli* 113-3 erwies sich Faktor V_{1a} , wie andere Carbonsäuren der B_{12} -Gruppe, als inaktiv. Dagegen wird er von *Propionibacterium shermanii* sehr leicht in Faktor B bzw. in Vitamin B_{12} umgewandelt¹⁵⁾.

Faktor V_{1a} kann als Zwischenprodukt für Synthesen von Vitamin B_{12} und Analoga verwendet werden.

Experimenteller Teil

Dicyanocobyrinsäure-abcdeg-hexamid-f-(DL-2-hydroxypropyl)-amid. – a) *Über das gemischte Anhydrid.* Eine Lösung von 9,85 mg (1×10^{-5} Mol) Faktor V_{1a} (4 Std. bei 105° und 10 Torr über P_2O_5 getrocknet) in 4,0 ml abs. Dimethylformamid¹⁶⁾ wird mit 0,015 ml ($1,5 \times 10^{-8}$ Mol) einer 1 M Lösung von Triäthylamin¹⁷⁾ in abs. Dimethylformamid versetzt. Nach Kühlen auf -10° werden 0,12 ml ($1,2 \times 10^{-5}$ Mol) einer frisch bereiteten 0,1 M Lösung von Chlorameisensäure-äthylester in abs. Dimethylformamid eingetragen. Das Reaktionsgemisch verbleibt unter Rühren 20 Min. bei dieser Temperatur und wird anschliessend in der Kälte mit 7,5 mg (1×10^{-4} Mol) DL-1-Amino-2-propanol, gelöst in 0,3 ml Wasser, versetzt. Man lässt die Reaktionslösung sodann innerhalb 30 Min. auf Raumtemperatur ansteigen und erwärmt noch 1 Std. im Wasserbad auf 30° . Die rotgefärbte, klare Lösung wird mit 30 ml Aceton und 60 ml Diisopropyläther versetzt und das ausgeflockte Produkt zentrifugiert. Nach Abdekantieren der überstehenden farblosen Flüssigkeit wird der voluminöse, rote Niederschlag zweimal mit je 30 ml Aceton gewaschen. Die Lösung des Rückstandes in 5 ml Wasser wird an einer Säule (20×300 mm) aus Carboxymethyl-Zellulose (mit 1 N HCl behandelt und mit Wasser neutral gewaschen) chromatographiert. Beim Entwickeln mit 200 ml Wasser bleibt im oberen Teil der Säule eine orangerot gefärbte Zone adsorbiert, die sich nach Zusatz von 0,05% Blausäure zum Wasser violett färbt und nun rasch die Säule verlässt. Das Eluat wird im Vakuum unter Zusatz von 1 ml 1 N Essigsäure auf 1 ml eingengt und an einer Diäthylaminoäthylzellulose-Säule (20×220 mm, mit 1 N Ammoniak behandelt und mit Wasser neutral gewaschen) chromatographiert. Das beim Entwickeln mit Wasser/Methanol (1:1) + 0,1% Blausäure erhaltene Eluat wird im Vakuum eingengt, wobei man in 87% Ausbeute Dicyanocobyrinsäure-abcdeg-hexamid-f-(DL-2-hydroxypropyl)-amid erhält.

$C_{50}H_{72}O_8N_{13}Co$	Ber. Co 5,66	1-Amino-2-propanol 7,21%
(1042,18)	Gef. „ 5,58	„ „ 7,35%

Die bei der Eluierung der Diäthylaminoäthylzellulose-Säule mit Wasser/Methanol zurückbleibende Zone wird mit Methanol/Wasser (1:1) + 0,1% Ammoniak abgelöst und erweist sich als nicht umgesetzter Faktor V_{1a} (9% des Einsatzes).

b) *Mit Dicyclohexyl-carbodiimid.* Eine Lösung von 5,0 mg ($5,1 \times 10^{-6}$ Mol) Faktor V_{1a} in 0,1 ml Wasser und 0,9 ml Pyridin¹⁷⁾ wird mit 7,5 mg (1×10^{-4} Mol) DL-1-Amino-2-propanol versetzt. Nach Hinzufügen einer Lösung von 4,12 mg (2×10^{-5} Mol) N,N'-Dicyclohexyl-carbodiimid in 2 ml Pyridin und 18-stdg. Stehen bei Raumtemperatur wird das Reaktionsgemisch mit 2 ml Wasser verdünnt und der ausgeschiedene N,N'-Dicyclohexylharnstoff abfiltriert. Das Filtrat extrahiert man 5mal mit je 1 ml Äther und stellt die wässrige Phase mit 1 N Essigsäure auf pH 4,5 ein. Nach Abzentrifugieren des entstandenen Niederschlages wird die orangerot gefärbte Lösung im Vakuum auf 1 ml eingengt und dann wie bei der Anhydridmethode beschrieben weiter aufgearbeitet. Die Ausbeute beträgt nur 22,5% d. Th.

Dicyanocobyrinsäure-abcdeg-hexamid-f-(D-2-hydroxypropyl)-amid (Faktor B) und *Dicyanocobyrinsäure-abcdeg-hexamid-f-(L-2-hydroxypropyl)-amid.* Diese beiden Faktoren erhält man in fast 90% Ausbeute, wenn bei der Anhydridmethode a) an Stelle des racemischen, die optisch aktiven 1-Amino-2-propanole eingesetzt werden.

Dicyanocobyrinsäure-abcdeg-hexamid-f-methylester (Faktor- V_{1a} -Methylester. Eine Lösung von 1,97 mg (2×10^{-6} Mol) Faktor V_{1a} in 0,2 ml Wasser und 0,3 ml Methanol wird bei Raumtempera-

¹⁶⁾ Durch azeotrope Destillation mit Benzol und anschliessend mit dem Molekularsieb 4 A der Firma BRENNTAG, Mülheim/Ruhr, völlig entwässert.

¹⁷⁾ Über KOH destilliert und dann nach Zusatz von p-Toluolsulfochlorid bei Normaldruck in einer 60 cm langen Füllkörperkolonne fraktioniert.

tur mit 1 ml (6×10^{-4} Mol) ätherischem Diazomethan versetzt. Die Zugabe des Diazomethans erfolgt in Portionen zu je 0,1 ml, jeweils nach Entfärben der Ätherschicht. Die Gasentwicklung ist nach 1 Std. beendet. Nach Stehen über Nacht wird 3mal mit Äther ausgeschüttelt und die wässrige Phase über Phosphat-Zellulose gereinigt. Die cyanidhaltige Fraktion unterwirft man nach Einengen im Vakuum auf 0,5 ml der Elektrophorese bei pH 6,5. Die Ausbeute an Faktor- V_{1a} -Methylester beträgt 28% d. Th.

Die Umsetzung des gemischten Anhydrids aus Faktor V_{1a} und Kohlensäure-monoäthylester mit Methanol führt zum gleichen Produkt in 72% Ausbeute.

Dicyanocobyrinsäure-abcdeg-hexamid-f-(DL-2-hydroxypropyl)-amid aus dem Methylester von Faktor V_{1a} . Eine Lösung von 0,4 mg Faktor- V_{1a} -Methylester (bei $50^\circ/0,1$ Torr über P_2O_5 getrocknet) in 1 ml abs. Dimethylformamid wird mit 1,5 mg DL-1-Amino-2-propanol versetzt und 4 Tage bei 25° stehengelassen. Nach Fällern mit Aceton/Diisopropyläther, Zentrifugieren und gründlichem Waschen mit Aceton löst man den Niederschlag in Wasser und stellt daraus ein Kieselgurprodukt¹⁸⁾ mittels Aceton/Äther her. Durch chromatographische Trennung an einer Zellosepulver-Säule unter Verwendung von wassergesättigtem sec.-Butanol mit 1% Eisessig und 0,01% Blausäure als Entwickler erhält man das entstandene Amid in 9% Ausbeute. Die Hauptmenge des Reaktionsproduktes besteht aus unverändertem Ausgangsester.

SUMMARY

The structure of factor V_{1a} has been elucidated as cobyrinic acid *abcdeg*-hexamide. The main proof consists in its conversion into factor B, effected by treating the mixed anhydride from factor V_{1a} and ethyl hydrogen carbonate with racemic and with optically active 1-amino-2-propanol.

Lehrstuhl für Biochemie an der Technischen Hochschule, Stuttgart,
und Chemische Forschungsabteilung der
F. HOFFMANN-LA-ROCHE & Co. AG., Basel.

¹⁸⁾ W. FRIEDRICH & K. BERNHAUER, Z. Naturforsch. 9b, 755 (1954).

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

3. Mitteilung

Synthese von Dicyanocobyrinsäure-*abcdeg*-hexamid-*f*- (DL-2-hydroxypropyl)-amid-dihydrogenphosphorsäureester

von K. Bernhauer¹⁾, F. Wagner¹⁾, Hw. Dellweg²⁾ und P. Zeller³⁾

(3. III. 60)

Unter den inkompletten Vitamin- B_{12} -Faktoren beanspruchen jene, die noch einen Teil der Nucleotid-Molekel besitzen, besonderes Interesse, weil sie offenbar Zwischenprodukte der Biosynthese des Vitamins B_{12} sind. Es handelt sich um die sogenannten Faktoren C, die auf Grund ihres elektrophoretischen Verhaltens (neutral bzw. sauer bei pH 2,7) sowie analytischer Untersuchungen Phosphorsäure enthalten. Der ein-

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

²⁾ Biochemisches Forschungslaboratorium der ASCHAFFENBURGER ZELLSTOFFWERKE AG. Stockstadt a. M.

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