

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.

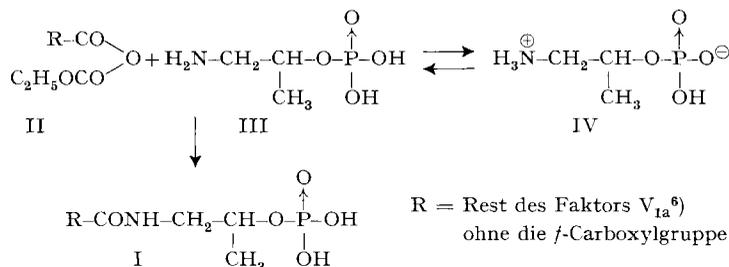
²⁾ Biochemisches Forschungslaboratorium der ASCHAFFENBURGER ZELLSTOFFWERKE AG. Stockstadt a. M.

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

fachste Vertreter dieser Gruppe ist der Phosphorsäureester I des Faktors B, der als Naturprodukt erstmals in *Nocardia rugosa*⁴⁾, dann auch in *Propionibacterium shermanii* aufgefunden wurde⁵⁾.

Die Isolierung und Strukturermittlung des Faktors V_{1a}⁶⁾ gab uns die Möglichkeit, Phosphorsäureester des Faktors B synthetisch herzustellen. In der vorliegenden Mitteilung wird über die Darstellung und Charakterisierung des Dicyanocobyrinsäure-*abcdefg*-hexamid-*f*-(DL-2-Hydroxypropyl)-amid-dihydrogenphosphorsäureesters berichtet.

Auf Grund der bei der Amidierung von Faktor V_{1a} gemachten Erfahrungen schien die Umsetzung des gemischten Anhydrids des Faktors V_{1a} (II) mit dem Phosphorsäureester III⁷⁾ des 1-Amino-2-Propanols aussichtsreich. Um den nucleophilen Angriff der Aminogruppe an der Carboxylgruppe des Faktors V_{1a} im gemischten Anhydrid zu ermöglichen, musste die Zwitterionenstruktur IV des Phosphorsäureesters durch Salzbildung aufgehoben werden. Die sekundären Salze erwiesen sich infolge ihrer völligen Unlöslichkeit in organischen Lösungsmitteln, ein-



schliesslich Pyridin und Dimethylformamid, als ungeeignet. Nach mannigfacher Abwandlung der Reaktionsbedingungen führte die Verwendung des Mononatriumsalzes in wässrigem Pyridin oder Triäthylamin zum Ziel. Bei Anwendung von ca. 2 Mol 2-Amino-1-methyl-ätyl-natriumhydrogenphosphat auf 1 Mol Faktor V_{1a} und eines Überschusses an Chlorameisensäure-äthylester (bis zu 3 Mol) verläuft die Kondensation mit guter Ausbeute (85%). Ein grösserer Überschuss an Aminkomponente erhöht die Ausbeute nicht mehr.

Die Analyse des Kondensationsproduktes ergibt für das Verhältnis Kobalt/Aminopropanol/Phosphorsäure die Werte 0,99:1,045:1,06. Die Absorptionsspektren des Dicyanocobyrinsäure-*abcdefg*-hexamid-*f*-(DL-2-Hydroxypropyl)-amid-dihydrogenphosphorsäureesters bei pH 2,7 und im Bereich 6,2–8,0 (Phosphatpuffer nach SÖRENSEN + 0,01% HCN) sind mit den entsprechenden der Faktoren V_{1a} und B identisch.

Das papierchromatographische Verhalten des synthetischen Faktors in verschiedenen Entwicklersystemen ist aus der Tabelle ersichtlich. Mit den üblichen

⁴⁾ A. DI MARCO, G. BORETTI, A. MIGLIACCI, P. JULITA & A. MINGHETI, *Boll. Soc. ital. Biol. sper.* **33**, 1513 (1957).

⁵⁾ H. BEISBARTH, Diplomarbeit, Technische Hochschule, Stuttgart 1959.

⁶⁾ Vorangehende 2. Mitteilung.

⁷⁾ G. COOLEY, M. T. DAVIES, B. ELLIS, V. PETROW & B. STURGEON, *J. Pharmacy Pharmacol.* **5**, 257 (1953); E. CHERBULIEZ & J. RABINOWITZ, *Helv.* **39**, 1455 (1956); E. CHERBULIEZ & H. WENIGER, *ibid.* **29**, 2006 (1946).

Entwicklern sind die Rf-Werte schlecht reproduzierbar, offenbar deshalb, weil in diesen Lösungsmittelgemischen keine definierte Dissoziationsstufe des Phosphatrestes vorliegt. Mit den Entwicklern F und G dagegen, in denen das Dinatriumsalz des Faktors vorliegt, ist die Reproduzierbarkeit gut.

Papierchromatographisches Verhalten von Dicyanocobyrinsäure-abcdeg-hexamid-f-(DL-2-hydroxypropyl)-amid-dihydrogenphosphorsäureester

Relative Rf-Werte (Faktor B = 1)						
A	B	C	D	E	F	G
0,345	0,185–0,22	0,43–0,53	0,29–0,31	0,135–0,15	1,22	1,10

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 KClO₄.

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

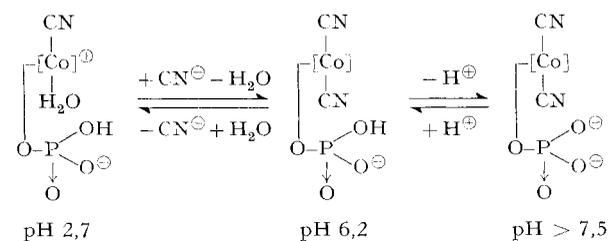
D = 100 Tle. sec.-Butanol, 36 Tle. Wasser, 14 Tle. 25-proz. NH₃-Lösung, 0,05 Tle. 10-proz. HCN-Lösung.

E = Wassergesättigtes sec.-Butanol, 0,01% HCN, 0,5% Natrium-tetraphenylborat (Kalignost).
F = 100 Tle. n-Butanol, 100 Tle. 10-proz. Natriumcarbonatlösung, 0,1 Tl. 10-proz. HCN-Lösung.

G = 100 Tle. Isoamylalkohol, 100 Tle. 5-proz. Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung, 0,005% Kaliumcyanid.

Bei den letzten beiden Entwicklern wurden beide Phasen verwendet.

Elektrophoretisch verhält sich der synthetische Faktor in Gegenwart von 0,01% HCN bei pH 2,7 neutral, bei pH 6,2 einbasisch sauer und ab pH 7,5 zweibasisch sauer. Gibt man einen Tropfen der Lösung des Faktors auf ein Filterpapier, so geht die Farbe nach einiger Zeit, offenbar infolge Verlustes der Cyanogruppe, von Rot in Gelb über. Aus dem elektrophoretischen Verhalten kann auf das Vorliegen folgender Formen geschlossen werden:

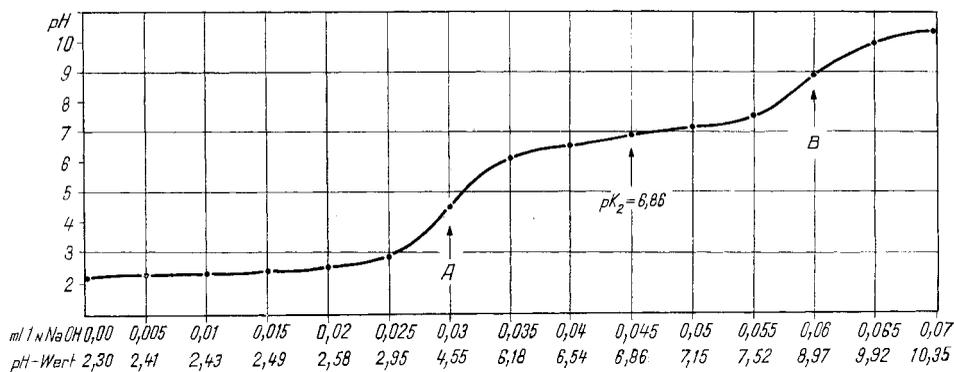


In diesen Formeln steht [Co] für die Struktur des Faktors B.

Diese Verhältnisse werden bestätigt durch die Ergebnisse der potentiometrischen Titration (siehe Fig.). Der Punkt A im Kurvenbild stellt das Mononatriumsalz, der Punkt B das Dinatriumsalz dar. Der Halbtitrationswert zwischen A und B entspricht dem pK₂-Wert = 6,86 der Substanz. Aus der Titration ergibt sich für das eingesetzte Produkt eine Reinheit von 90,5%.

Die potentiometrische Titration wurde mit dem BECKMAN-pH-Meter, Modell G, ausgeführt. Die Messkette bestand aus einer Glaselektrode (Indikatorelektrode), KCl (Elektrolytbrücke) und einer Kalomelektrode. Die Elektrode wurde in dem Bereich von pH 2,7 bis 9,18 geeicht. Einwaage: 40,4 mg = $3,6 \times 10^{-5}$ Mol, gelöst in 20 ml bidest. Wasser, entsprechend einer $2,02 \times 10^{-3}$ M Lösung. Zur Titration wurde 1 N Natronlauge verwendet. Die Zugabe der Natronlauge erfolgte mit einer Agla-Mikrometerspritze.

In einer Säule mit Phosphatzellulose-Ionenaustauscher trennt sich der synthetische Faktor bei der Elution mit Wasser in zwei etwa gleich starke, dicht aufeinanderfolgende, orangerote Zonen. Fängt man diese getrennt auf und chromatographiert erneut an einer Phosphatzellulose-Säule, so erhält man mit beiden Fraktionen wieder je zwei Zonen in annähernd gleicher Menge. Offenbar handelt es sich dabei um die Einstellung eines Dissoziationsgleichgewichtes des Faktors mit dem Austauscher, denn elektro-phoretisch verhalten sich beide Zonen völlig identisch.



Potentiometrische Titration von Dicyanocobyrinsäure-abcdeg-hexamid-f-(DL-2-hydroxypropyl)-amid-dihydrogenphosphorsäureester

Im mikrobiologischen Test (Röhrchentest)⁸⁾ mit *E. coli* 113-3 erwies sich Dicyanocobyrinsäure-abcdeg-hexamid-f-(DL-2-hydroxypropyl)-amid-dihydrogenphosphorsäureester als ebenso aktiv wie der Grundkörper ohne die Phosphorsäuregruppe.

Experimentelles. – Dicyanocobyrinsäure-abcdeg-hexamid-f-(DL-2-hydroxypropyl)-amid-dihydrogenphosphorsäureester. Aus 10^{-5} Mol Faktor V_{1a} und 3×10^{-5} Mol Chlorameisensäure-äthylester wird das gemischte Anhydrid hergestellt⁶⁾. Zum Reaktionsgemisch gibt man 2×10^{-5} Mol einer 1 M wässrigen Lösung von DL-2-Amino-1-methyl-äthyl-natriumhydrogenphosphat und anschliessend soviel Wasser zu, dass die gesamte Wassermenge 6% des Gesamtvolumens ausmacht. Unter Rühren lässt man die Reaktionslösung auf Raumtemperatur kommen und erwärmt schliesslich noch 2 Std. auf 30°. Der durch Zusatz von Aceton/Diisopropyläther in üblicher Weise erhaltene rote Niederschlag wird in abs. Methanol gelöst, die Lösung mit 1 N Essigsäure auf pH 5 gebracht und im Vakuum bei Raumtemperatur eingengt. Der in 5 ml Wasser aufgenommene Rückstand wird an einer Säule aus Phosphatzellulose chromatographiert. Dabei läuft das Reaktionsprodukt bei der Elution mit Wasser in Form einer orangerot gefärbten Doppelzone rasch durch, während ein kleiner Rest im oberen Teil der Säule zurückbleibt. Nach Verdampfen des Eluates im Vakuum wird der Rückstand über KOH und Magnesiumperchlorat zur Trockne gebracht oder nach Aufnehmen in Methanol durch Zusatz von Aceton und Blausäure ausgeflockt; Ausbeute 85% d. Th.

C ₅₀ H ₇₃ O ₁₁ N ₁₃ PCo	Ber. Co 5,25	1-Amino-2-propanol 6,69	Phosphorsäure 8,73%
(1122,15)	Gef. „ 5,20	„ „ 6,99	„ „ 9,26%

⁸⁾ Für die mikrobiologische Testung danken wir Frau Dipl. Chem. E. BECHER.

SUMMARY

The mixed anhydride from factor V_{1a} and ethyl hydrogen carbonate reacts with DL-2-amino-1-methylethyl sodium hydrogen phosphate to give the phosphoric acid monoester of factor B (containing racemic 1-amino-2-propanol). Compounds of this type are believed to be intermediates in the biosynthesis of cobalamines.

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

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

4. Mitteilung

Partialsynthese von Vitamin B_{12}

von W. Friedrich¹⁾, G. Gross¹⁾, K. Bernhauer¹⁾ und P. Zeller²⁾

(3. III. 60)

Vitamin B_{12} kann synthetisch aus Faktor V_{1a} , dessen Struktur als die des Cobyrynsäure-*abcdefg*-hexamids³⁾ bewiesen wurde⁴⁾, gewonnen werden. Das verwendete Syntheschema erlaubt auch den Aufbau neuartiger, unnatürlicher Analoga des Vitamins B_{12} , in denen D-1-Amino-2-propanol durch andere Aminoalkohole ersetzt ist. Die Schlußstufe besteht in der Kondensation von I mit IIa oder Analoga desselben.

Die Herstellung des als Ausgangsmaterial benötigten gemischten Anhydrids I aus Faktor V_{1a} und Kohlensäure-monoäthylester ist in einer vorangehenden Mitteilung beschrieben worden⁴⁾. (1- α -D-Ribofuranosyl-5,6-dimethyl-benzimidazol)-3'-dihydrogenphosphorsäureester (III), der im folgenden als α -Ribazolphosphat bezeichnet wird, kann sowohl synthetisch als auch durch Abbau von Vitamin B_{12} hergestellt werden⁵⁾⁶⁾⁷⁾. Beim Behandeln des α -Ribazolphosphats in einem Gemisch von Formamid, tert.-Butanol und Ammoniak mit Dicyclohexyl-carbodiimid entsteht in praktisch quantitativer Ausbeute das cyclische Phosphat IV [(1- α -D-Ribofuranosyl-5,6-dime-

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

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

³⁾ IUPAC, Nomenclature of Organic Chemistry 1957, S. 85-87, Butterworth, London 1958.

⁴⁾ 2. Mitteilung, Helv. 43, 696 (1960).

⁵⁾ E. A. KACZKA, D. HEYL, W. H. JONES & K. FOLKERS, J. Amer. chem. Soc. 74, 5549 (1952); J. B. ARMITAGE, J. R. CANNON, A. W. JOHNSON, L. F. J. PARKER, E. L. SMITH, W. H. STAFFORD & A. R. TODD, J. chem. Soc. 1953, 3849.

⁶⁾ R. BONNETT, J. G. BUCHANAN, A. W. JOHNSON & A. R. TODD, J. chem. Soc. 1957, 1168.

⁷⁾ W. FRIEDRICH & K. BERNHAUER, Z. Naturforsch. 9b, 685 (1954).