

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. Friedrich**¹⁾, **G. Gross**¹⁾, **K. Bernhauer**¹⁾ und **P. Zeller**²⁾

(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.

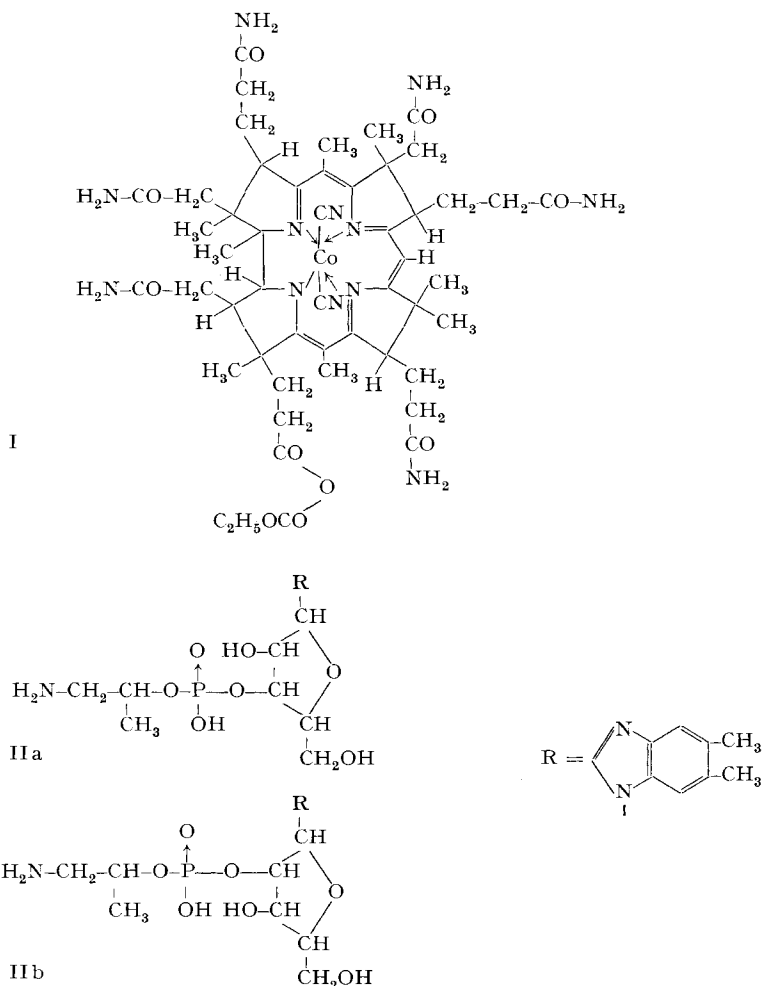
⁴⁾ 2. Mitteilung, Helv. 43, 696 (1960).

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).

thyl-benzimidazol)-2', 3'-hydrogenphosphorsäureester)]⁶⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾. Die Umsetzung von IV mit einem Derivat des 1-Amino-2-propanols (V), z. B. mit 1-(Benzyloxycarbonylamino)-2-propanol (VI) oder 1-(Benzylidenamino)-2-propanol (VII), führt nach Entfernen der Schutzgruppen zu einem Gemisch isomerer (2-Amino-1-methyl-äthyl)-ester (IIa und IIb) des α -Ribazolphosphats, die sich durch die Art der Verknüpfung des Phosphorsäurerestes mit der Ribose (am 3'- bzw. 2'-Hydroxyl) unterscheiden.



KHORANA *et al*⁸⁾⁹⁾ erhielten durch Umsetzung von Adenosin-2',3'-hydrogenphosphorsäureester mit Benzylalkohol und Natriumbenzylat als Katalysator ein Gemisch zweier Benzyl-ester. Mit Chlorwasserstoff als Katalysator und bei Verwendung eines grossen Alkohol-Überschusses wurden aus verschiedenen 2',3'-Ribotiden Benzyl-, Propyl- und Isopropylester von

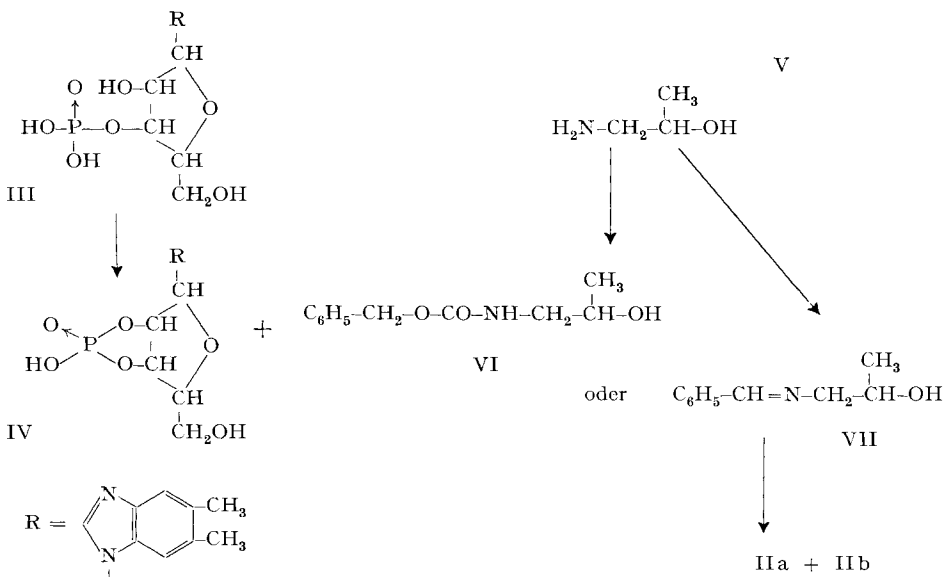
⁸⁾ C. A. DEKKER & H. G. KHORANA, J. Amer. chem. Soc. 76, 3522 (1954).

⁹⁾ G. M. TENER & H. G. KHORANA, J. Amer. chem. Soc. 77, 5349 (1955).

¹⁰⁾ H. G. KHORANA, G. M. TENER, R. S. WRIGHT & J. G. MOFFATT, J. Amer. chem. Soc. 79, 430 (1957); M. SMITH, J. G. MOFFATT & H. G. KHORANA, *ibid.* 80, 6204 (1958).

Nucleotiden hergestellt. Mit bestimmten Alkoholen, z. B. Benzyl- oder Isopropylalkohol, wurden überwiegend die Derivate der 3'-Nucleotide erhalten.

Für die Kondensation des 1-(Benzoyloxycarbonylamino)-2-propanols (VI) mit IV eignet sich die Umsetzung in Dioxan mit Chlorwasserstoff als Katalysator. Mit der Benzylidenverbindung VII gelingt die Reaktion besser, wenn Natrium-tert.-butylat



in überschüssigem tert.-Butylalkohol als Katalysator verwendet wird. Die Wahl des Reaktionsmilieus kann das Verhältnis 2'- zu 3'-Nucleotid beeinflussen. Falls die Reaktion mit der Benzoyloxycarbonyl-Verbindung VI durchgeführt wird, erfolgt die Abspaltung der Schutzgruppe durch katalytische Hydrierung mit Palladium-Katalysator. Im Falle der Verwendung von VII wird die Hydrolyse der Benzylidenverbindung mit Essigsäure vorgenommen. Die Ausbeute in dieser Stufe ist nach beiden Methoden gering (ca. 15%), so dass die Aufarbeitung nur mittels Chromatographie gelingt. Das gewünschte Produkt, IIa neben IIb, sowie eine beträchtliche Menge eines Nebenproduktes, bleiben beim Durchlauf an einer Säule aus Amberlite XE-64 haften, während α -Ribazolphosphat (III) durchläuft. Durch anschließende Chromatographie an Diäthylaminoäthyl-Zellulose¹¹⁾ kann das Nebenprodukt, welches mit Ninhydrin keine Färbung gibt, abgetrennt werden. Das Gemisch von IIa und IIb kann papierchromatographisch in zwei Ninhydrin-positive, unter der UV.-Lampe fluoreszierende Flecke getrennt werden (siehe Tab. 1).

Mit dem Entwickler D wird das Gemisch präparativ getrennt und anschließend an Diäthylaminoäthyl-Zellulose entsalzt. IIa und IIb haben dasselbe UV.-Absorptionsspektrum wie α -Ribazolphosphat (III) und verhalten sich elektrophoretisch in verdünnter Essigsäure als Basen, bei pH 11 als Säuren. Auf Grund der weiteren Umsetzungen ergibt sich, dass IIa das gesuchte 3'-Ribotid, IIb das isomere 2'-Ribotid darstellt.

¹¹⁾ E. A. PETERSON & H. A. SOBER, J. Amer. chem. Soc. 78, 751 (1956).

Für die Verknüpfung von I mit IIa oder IIb wird das gemischte Anhydrid I⁴) mit einer wässrigen Dimethylformamidlösung des Natriumsalzes von IIa bzw. IIb umgesetzt. Orientierende Versuche für die Kondensationsstufe wurden mit einem Gemisch von IIa und IIb, welches aus racemischem 1-Amino-2-propanol hergestellt worden war, durchgeführt. In diesem Fall zeigte sowohl die Papierchromatographie

Tabelle 1. *Papierchromatographisches Verhalten eines Gemisches von IIa und IIb*

| Entwickler | pH | Rf-Werte | |
|------------|--------|----------|------|
| | | IIa | IIb |
| A | ca. 11 | 0,58 | 0,70 |
| B | | 0,19 | 0,32 |
| C | 3,6 | 0,92 | |
| D | 8,0 | 0,72 | 0,80 |
| E | 4,3 | 0,85 | |
| F | 8,2 | 0,72 | 0,80 |
| G | 7,0 | 0,73 | 0,81 |

Entwicklung aufsteigend, Papier SCHLEICHER & SCHÜLL Nr. 2043a, mit folgenden Entwicklern:

- A = 27 g Na₂CO₃, 10H₂O + 100 ml Isoamylalkohol⁶).
 B = 39,5 ml ges. (NH₄)₂SO₄-Lösung + 1 ml Isopropanol + 9,5 ml H₂O¹²).
 C = 100 ml 5-proz. Ammoniumcitratlösung + 50 ml Isoamylalkohol¹³).
 D = Wie C, pH mit NH₃ auf 8,0 eingestellt.
 E = 100 ml 5-proz. KH₂PO₄-Lösung + 50 ml Isoamylalkohol¹³).
 F = 100 ml 5-proz. Na₂HPO₄-Lösung + 50 ml Isoamylalkohol¹³).
 G = 100 ml 5-proz. KH₂PO₄-Lösung + NH₃ bis pH 7 + 50 ml Isoamylalkohol¹³).

Tabelle 2. *Mikrobiologische Aktivität der synthetischen Vitamin-B₁₂-Isomeren (Vitamin B₁₂ = 100)¹⁵*

| Verknüpfung des Phosphorsäurerestes mit der Ribose | 1-Amino-2-Propanol | <i>E. coli</i> | <i>L. leichmannii</i> | <i>Ochr. malhamensis</i> |
|--|--------------------|----------------|-----------------------|--------------------------|
| am 3'-Hydroxyl | D | 96 | 100 | 98 |
| | DL | 78,5 | 80 | *) |
| | L | 57,8 | 73,4 | 66,1 |
| am 2'-Hydroxyl | D | < 2 | < 2 | ca. 0,5 |
| | DL | < 2 | < 2 | *) |

*) Nicht getestet.

als auch die Elektrophorese des Kondensationsproduktes, dass neben Faktor V_{Ia}, der durch Hydrolyse des gemischten Anhydrids entsteht, zwei Cobalamine (A und B) gebildet worden waren. Wird die Kondensation von I mit reinem IIa durchgeführt, so enthält das Reaktionsgemisch neben etwas Faktor V_{Ia} nur das Produkt A; mit IIb als Aminkomponente entsteht in gleicher Weise nur das Produkt B.

¹²) F. CRAMER, «Papierchromatographie», 4. Aufl., Verlag Chemie, 1958.

¹³) R. J. BLOCK, R. LE STRANGE & G. ZWEIG, «Paper Chromatography», S. 118, Academic Press, New York 1952.

Substanz A wird durch Umkristallisieren aus wässrigem Aceton in schönen roten Nadelchen erhalten, die elektrophoretisch und papierchromatographisch in verschiedenen Entwicklersystemen¹⁴⁾ nicht von Vitamin B₁₂ unterschieden werden können. Die mikrobiologische Aktivität von A ist abhängig davon, ob das in der Kondensation verwendete IIa aus racemischem oder optisch aktivem 1-Amino-2-propanol hergestellt wurde (Tab. 2). Substanz A mit D-1-Amino-2-propanol ist erwartungsgemäss

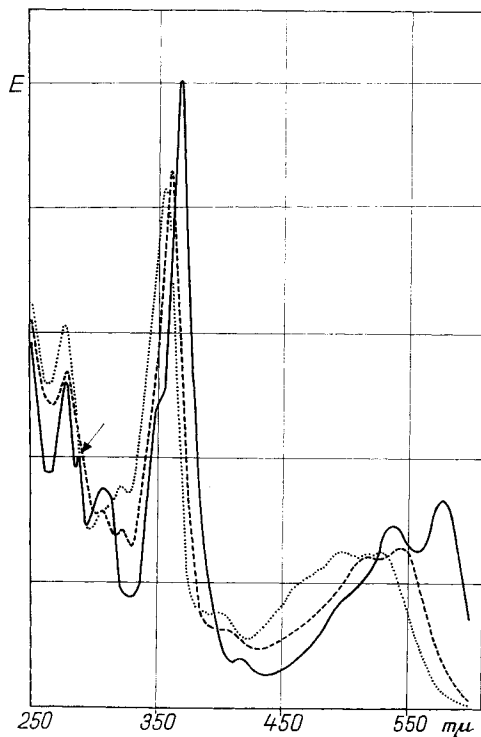


Fig. 1. Absorptionsspektrum der Substanz B in Wasser

- Form X, pH 3; Maxima bei 277, 321, 356, 500 und 528 mμ;
 - - - - - Form Y, pH 7; Maxima bei 277, 306, 323, 360,5 und 548 mμ;
 ——— Form Z, pH 10,5 und Cyanid-Überschuss; Maxima bei 277, 288, 307, 367, 540 und 580 mμ.

biologisch bei drei Testorganismen gleich wirksam wie Vitamin B₁₂. Substanz A mit L-1-Amino-2-propanol, die man als Diastereomeres des natürlichen Vitamins bezeichnen kann, hat, je nach Testorganismus, zwischen 60 und 70% der Wirkung des Naturproduktes. Eine andere als die mikrobiologische Differenzierung dieser Isomeren war bis jetzt nicht möglich.

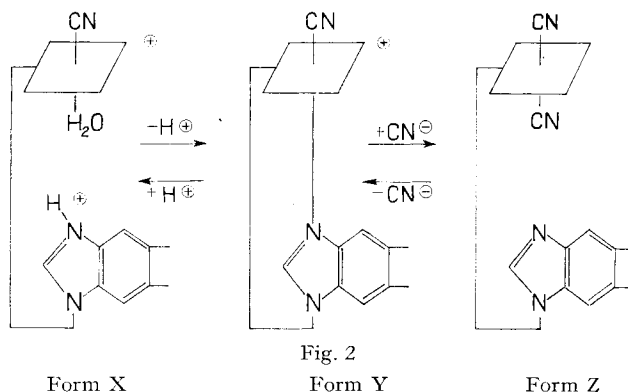
Substanz B wandert elektrophoretisch in schwach saurem Milieu als orangerote Zone gegen die Kathode, in neutralem und schwach alkalischem Milieu als violetter Zone (Dicyanofom) gegen die Anode. Die Verbindung verhält sich demnach wie

¹⁴⁾ W. FRIEDRICH & K. BERNHAUER, in K. F. BAUER «Medizinische Grundlagenforschung», Bd. II, S. 661, G. Thieme Verlag, Stuttgart 1959.

¹⁵⁾ Für die Durchführung der Teste danken wir Frau Dipl. Chem. E. BECHER sowie Fr. M. LORENZ.

die sogenannten inkompletten Faktoren¹⁴), in denen der Nucleotidteil fehlt oder durch eine Cyanidgruppe aus der Koordination mit dem Kobaltatom verdrängt ist. Durch Abbau mit Salzsäure wurde festgestellt, dass B das Nucleotid enthält, was auch aus dem Absorptionsspektrum der Dicyanoform, in der die Bande bei $288 \text{ m}\mu$ ¹⁴) (λ in Fig. 1) deutlich zu sehen ist, hervorgeht. Um eine eventuell eingetretene Acylwanderung des Phosphorsäurerestes in die 5-Stellung der Ribose bei der Herstellung ausschliessen zu können, wurde das durch Abbau der Substanz B erhaltene Gemisch von α -Ribazolphosphat (III) und seinem 2'-Isomeren⁶) nach Abtrennung aus dem Hydrolysegemisch durch Absorptionsspektrum und Rf-Werte der beiden Nucleotide⁶) und durch die Überführung in den cyclischen Phosphorsäureester IV sichergestellt. Diese Befunde bestätigen die für die Verbindung IIb vermutete Struktur des [1- α -D-Ribofuranosyl-5,6-dimethyl-benzimidazol]-2'-[(2-amino-1-methyl-äthyl)-hydrogenphosphorsäureesters].

Die Eigenschaften der Substanz B, im Vergleich mit Vitamin B₁₂, das sich nur durch die Verknüpfung des Phosphorsäurerestes mit der Ribose unterscheidet, zeigen, dass durch diese Änderung in der Molekel die koordinative Bindung zwischen dem Stickstoffatom des Dimethylbenzimidazols und dem zentralen Kobaltatom geschwächt wird. In Fig. 1 sind die Absorptionsspektren der Substanz B bei verschiedenen pH-Werten abgebildet. Bei pH 3 unterscheidet sich das Absorptionsspektrum deutlich von demjenigen des Vitamins B₁₂. Vermutlich liegt die Substanz B in diesem pH-Bereich in der Form X (Fig. 2) vor. Vitamin B₁₂ ist im physiologischen Bereich in dieser Form nicht beständig. Bei pH 7 (ohne Cyanidüberschuss) und pH 10,5 (mit Cyanidüberschuss) unterscheidet sich die Absorption von B nicht von derjenigen des Vitamins B₁₂ und entspricht den Formen Y und Z der Fig. 2.



Im Gegensatz zu den bisher biosynthetisch zugänglichen Cobalamin-Analoga, bei denen das Dimethylbenzimidazol des Vitamins B₁₂ durch andere Basen ersetzt ist, bietet die beschriebene Partialsynthese von Cobalaminen die Möglichkeit, sowohl die ganze Nucleotidkette, d. h. die Base und den Zucker, als auch den als Bindeglied dienenden Aminoalkohol zu variieren. Wir glauben, dass mit Hilfe solcher Verbindungen das Studium der physikalisch-chemischen Eigenschaften und der Biosynthese der Vitamine der B₁₂-Gruppe gefördert und weitere Einblicke in die biologische Wirkungsweise gewonnen werden können.

Experimenteller Teil

Reinigung und Trocknung der Lösungsmittel und Agenzien. – Dioxan¹⁶): Kochen mit Salzsäure, Behandeln mit KOH und Natrium sowie Destillation. – Dimethylformamid¹⁶): Azeotrope Destillation mit Benzol und Wasser und Aufbewahren im Dunkeln bei +3° über LINDE's Molekularsieb 4A¹⁷). – Triäthylamin¹⁸): Zwecks Beseitigung von primären und sekundären Aminen, mit p-Toluolsulfochlorid in wässriger Lauge behandelt. – Cyclisches α -Ribazolphosphat (Ca-Salz) und Faktor V_{1a}⁴) im Hochvakuum bei 105° über P₂O₅ während 1–2 Std. getrocknet, 1-(Benzyloxycarbonylamino)-2-propanol über dem Molekularsieb 4A¹⁷) aufbewahrt, 1-(Benzylidenamino)-2-propanol im Vakuum über Ätznatron getrocknet.

1-(Benzyloxycarbonylamino)-2-propanol (VI). – Eine Lösung von 23,6 g DL-1-Amino-2-propanol in 455 ml Wasser wird auf 0–5° gekühlt, mit 38,3 g Magnesiumoxyd und anschliessend im Laufe von 20 Min. mit 66 g Chlorameisensäure-benzylester versetzt; das Reaktionsgemisch wird noch ca. 20 Std. bei Raumtemperatur gerührt und dann über eine Schicht eines Filterhilfsmittels filtriert und der Filterkuchen mit Äther gewaschen. Das Filtrat wird mit dem zum Waschen verwendeten Äther ausgezogen, die Ätherlösung mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und mit Calciumchlorid getrocknet. Nach Verdampfen des Lösungsmittels destilliert man den Rückstand und erhält 51,6 g (78,6%) DL-1-(Benzyloxycarbonylamino)-2-propanol, Sdp. 136–137°/0,06 Torr, $n_D^{20} = 1,5240$.

C₁₁H₁₅NO₃ (209) Ber. C 63,14 H 7,23% Gef. C 62,7 H 7,11%

D-1-(Benzyloxycarbonylamino)-2-propanol, in gleicher Weise hergestellt, hatte $[\alpha]_D^{25} = -9,47^\circ$ ($c = 4,68$ in Methanol).

(1- α -D-Ribofuranosyl-5,6-dimethyl-benzimidazol)-2',3'-hydrogenphosphorsäureester (cyclisches α -Ribazolphosphat, IV). 350 mg eines Gemisches von (1- α -D-Ribofuranosyl-5,6-dimethyl-benzimidazol)-3'- und -2'-dihydrogenphosphorsäureester (III bzw. sein 2'-Isomeres) werden in 2,5 ml 2N Ammoniak gelöst und mit einer Mischung von 2,5 ml Formamid, 1031 mg Dicyclohexylcarbodiimid und 6 ml tert.-Butylalkohol versetzt. Das entstehende Gemisch wird 3 Std. unter Rückfluss erhitzt, nach Abkühlen im Vakuum von tert.-Butylalkohol befreit, mit 20 ml Wasser versetzt, dreimal mit Äther extrahiert und der Äther verworfen. Nach der Extraktion wird der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff abgesaugt, das Filtrat im Vakuum bei 35° eingeeengt und schliesslich im Exsikkator unter Verwendung einer Hochvakuumpumpe zur Trockne gebracht. Der Rückstand wird in 30 ml Aceton aufgenommen und mit einer Lösung von 294 mg Calciumjodid in 4 ml Aceton versetzt. Der entstandene Niederschlag wird durch Zentrifugieren gesammelt, viermal mit je 30 ml Aceton gewaschen und anschliessend im Vakuum bei Raumtemperatur getrocknet. Man erhält 360 mg des wasserhaltigen Calciumsalzes, welches papierchromatographisch (System Isoamylalkohol/10-proz. wässrige Sodalösung 1:1) einheitlich ist und folgende Maxima aufweist:

in 0,05N HCl: 277 und 285,5 m μ ; $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 169$ und 158;

in 0,04N KOH: 247, 278,5 und 287,5 m μ ; $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 161,5, 103$ und 101.

[1- α -D-Ribofuranosyl-5,6-dimethyl-benzimidazol]-3'-[(DL-2-amino-1-methyl-äthyl)-hydrogenphosphorsäureester] (IIa) und [1- α -D-Ribofuranosyl-5,6-dimethyl-benzimidazol]-2'-[(DL-2-amino-1-methyl-äthyl)-hydrogenphosphorsäureester] (IIb). – Methode A. 174 mg Calciumsalz des cyclischen α -Ribazolphosphates IV werden mit 1,9 ml DL-1-(Benzyloxycarbonylamino)-2-propanol (VI) und 0,45 ml Dioxan, das mit Salzsäure gesättigt ist, versetzt. Durch kräftiges Schütteln bringt man allmählich das Calciumsalz in Lösung und lässt dann das Gemisch noch 20 Min. bei Raumtemperatur stehen. Dann wird der grösste Teil der Salzsäure durch Evakuieren über Natriumhydroxyd entfernt und die verbleibende Salzsäure durch Zusatz von Ammoniak in tert.-Butanol (1 Teil konz. Ammoniak, 9 Teile tert.-Butanol) neutralisiert. Zur Entfernung des überschüssigen Ammoniaks wird evakuiert und dann der Rückstand in 30 ml Wasser aufgenommen und mit 1 ml Eisessig versetzt. Durch Extrahieren mit Äther entfernt man überschüssiges VI. Die wässrige

¹⁶) W. BUNGE, in E. MÜLLER, Methoden der Organischen Chemie, Bd. I/2, S. 765, G. Thieme Verlag, Stuttgart 1959.

¹⁷) H. KIENITZ, in E. MÜLLER¹⁶), Bd. I/2, S. 249.

¹⁸) R. SCHRÖTER, in E. MÜLLER¹⁶), Bd. XI/I, S. 1026.

Phase wird ohne weitere Reinigung zwecks Entfernung der Benzyloxycarbonyl-Gruppe mit 300 mg 10-proz. Palladiummohr-Kohle und Wasserstoff behandelt. Die hydrierte Lösung wird durch eine Säule aus Amberlite XE-64-H ($1,5 \times 70$ cm) filtriert und die Säule so lange mit Wasser gewaschen, bis alles α -Ribazolphosphat entfernt ist. Der Austauschere wird dann in Wasser suspendiert, mit Ammoniak neutralisiert und mit Wasser eluiert. Das Eluat wird im Vakuum auf etwa 2 ml eingengt und an einer Säule aus Diäthylaminoäthyl-Zellulose ($1,0 \times 9,5$ cm) unter Verwendung von Wasser chromatographiert. Die durch Elution mit Wasser gewonnene Fraktion, welche auf Grund ihrer UV.-Absorption und Ninhydrinreaktion das gesuchte Material (IIa + IIb) enthält, wird im Vakuum eingengt und getrocknet. Man erhält etwa 25 mg einer farblosen, amorphen Substanz mit demselben Absorptionsspektrum wie α -Ribazolphosphat: $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 0,91$ bei $277 \text{ m}\mu$ (in $0,02N$ Salzsäure). Elektrophoretisch ist die Substanz bei pH 6,5 neutral und bei pH 10,5 sauer. 6 mg des so erhaltenen Produktes werden in wenig Wasser gelöst, auf einen Bogen Papier (SCHLEICHER & SCHÜLL Nr. 2043a) gebracht und aufsteigend, unter Verwendung des Entwicklers D (Tab. 1), über Nacht chromatographiert. Das getrocknete Papier zeigt unter der UV.-Lampe zwei fluoreszierende Zonen mit den Rf-Werten 0,72 (IIa) bzw. 0,80 (IIb). Die beiden Zonen werden herausgeschnitten, fein zerkleinert, auf je eine Säule (1×10 cm) aus Diäthylaminoäthyl-Zellulose (Basenform) gebracht und mit Wasser eluiert. Man erhält nach Einengen und Trocknen salzfreie Eluate in etwa gleicher Menge (3 mg) Beide Substanzen haben dasselbe UV.-Absorptionsspektrum wie α -Ribazolphosphat und reagieren mit Ninhydrin positiv.

Methode B. 100 mg Calciumsalz des cyclischen Ribazolphosphates IV werden mit 1 g 1-(Benzyldenamino)-2-propanol (VII) und 1,5 ml Dimethylformamid versetzt und geschüttelt, bis alles gelöst ist. Nach Zusatz von etwa 100 mg Natrium-tert.-butylat und erneutem Schütteln bis zum Auflösen des Zusatzes wird der Ansatz 20 Min. bei Raumtemperatur stehengelassen und nacheinander mit 2 ml Eisessig und 30 ml Wasser versetzt (die wässrige Lösung soll schwach sauer reagieren). Nach Einengen auf einige ml wird die Reaktionslösung durch eine Säule (1×70 cm) von Amberlite XE-64 chromatographiert. Die weitere Verarbeitung erfolgt wie bei der Methode A, die Gesamtausbeute an IIa und IIb beträgt ca. 15% (bezogen auf das cyclische Ribazolphosphat), das Mengenverhältnis von IIa zu IIb ist jedoch ca. 1:10.

Kondensation von Faktor V_{1a} mit einem Gemisch von IIa und IIb. 2,6 mg Faktor V_{1a} werden in 0,8 ml trockenem Dimethylformamid gelöst und mit 0,016 ml einer 7-proz. Lösung von Triäthylamin in Dimethylformamid versetzt. Unter Schütteln kühlt man auf -15° und versetzt mit 0,008 ml einer 5-proz. Lösung von Chlorameisensäure-äthylester in Dimethylformamid, die unmittelbar vor dem Zusatz hergestellt wurde. Die entstandene Lösung wird bei -15° gehalten.

Andererseits löst man 4,15 mg des Gemisches von [1- α -D-Ribofuranosyl-5,6-dimethyl-benzimidazol]-3'- und -2'-[(DL-2-amino-1-methyl-äthyl)-hydrogenphosphorsäureester] (IIa und IIb) in 0,05 ml Wasser, verdünnt mit 0,4 ml Dimethylformamid und kühlt ebenfalls auf -15° . Direkt vor der Zugabe zu der Lösung des gemischten Anhydrids versetzt man die Lösung des Phosphates mit 0,005 ml 1N Natronlauge¹⁹⁾. Nach dem Vermischen der beiden Lösungen steigert man die Temperatur auf 0° und hält dann etwa 30 Min. bei 0° . Anschliessend wird im Laufe von 20 Min. die Temperatur bis auf 30° gesteigert und während weiteren 30 Min. auf dieser Höhe gehalten. Nach Zusatz einer Spur 10-proz. Blausäure werden die Kondensationsprodukte durch Zusatz von Aceton/Äther ausgeflockt und abfiltriert. Der Filtrerrückstand wird elektrophoretisch bei pH 2,7 getrennt und die mit Wasser eluierten Substanzen A und B wie folgt weiter gereinigt:

Substanz A. Die in der Elektrophorese bei pH 2,7 neutrale Zone, welche rotgefärbt ist, wird mit Wasser eluiert, mit Phenol extrahiert und der Phenolextrakt in üblicher Weise aus wässrigem Aceton umkristallisiert. Die kristalline Substanz ist auf Grund ihres Absorptionsspektrums sowie papierchromatographischen und elektrophoretischen Verhaltens mit Vitamin B_{12} identisch. Die Ausbeute beträgt etwa 40%, berechnet auf eingesetzten Faktor V_{1a} .

Substanz B. Die in der Elektrophorese bei pH 2,7 basische Zone (Rf-Wert relativ zu Faktor $V_{1a} = 0,7$), welche orangerot gefärbt ist, wird mit Wasser eluiert, das Eluat an einer Säule (1×10 cm) aus Phosphat-Zellulose²⁰⁾ adsorbiert und nach Waschen mit Wasser mit einer 0,5-proz. wässrigen Blausäurelösung rasch eluiert. Der violette Durchlauf wird im Vakuum einge-

¹⁹⁾ Für die Kondensation muss IIa bzw. IIb als Natriumsalz vorliegen, vgl. die vorangehende 3. Mitteilung.

engt und liefert in ca. 40-proz. Ausbeute ein Produkt, dessen papierchromatographisches Verhalten in Tab. 3 zusammengestellt ist.

Vitamin B₁₂ aus Faktor V_{1a} und IIa²¹). 2,6 mg (2×10^{-6} Mol) Faktor V_{1a} werden in 0,8 ml trockenem Dimethylformamid gelöst und mit 0,016 ml einer 7-proz. Lösung von Triäthylamin in Dimethylformamid versetzt. Zu dieser auf ca. -15° gekühlten Lösung werden 0,008 ml einer frisch bereiteten 5-proz. Lösung von Chlorameisensäure-äthylester in Dimethylformamid (enthaltend 4×10^{-6} Mol Ester) zugegeben.

Tabelle 3. Papierchromatographisches Verhalten der Substanz B

| Lösungsmittelgemisch, Cyanidüberschuss | Farbe der Flecke | Rf-Werte (Vitamin B ₁₂ = 1) |
|---|---------------------|--|
| sec.-Butanol Eisessig Wasser ¹⁴⁾ | orangerot | 1,13 |
| sec.-Butanol Wasser ¹⁴⁾ | orangerot | 1,2 |
| sec.-Butanol Ammoniak Wasser ¹⁴⁾ | violett | 1,0 |

Gleichzeitig werden 2 mg (ca. 5×10^{-6} Mol) IIa²¹) in 0,05 ml Wasser und 0,4 ml Dimethylformamid gelöst, mit ca. 0,003 ml 1N NaOH versetzt und nach Abkühlen auf -15° zur Lösung des gemischten Anhydrids gegeben. Man hält ca. 30 Min. bei 0° und ebensolange bei $30-35^{\circ}$. Dann wird eine Spur Blausäure zugesetzt, worauf die Cobalamine durch Zusatz von Aceton und Äther ausgeflockt werden. Nach Abtrennung der Flocken wird Vitamin B₁₂ von dem nicht umgesetzten Faktor V_{1a} elektrophoretisch bei pH 2,7 getrennt. Nach Elution mit Wasser und üblicher Verarbeitung werden 1–2 mg kristallisierte Substanz erhalten.

Diastereomeres des Vitamins B₁₂ mit L-1-Amino-2-propanol. Man arbeitet in gleicher Weise wie bei der Synthese des Vitamins B₁₂, verwendet aber die Verbindung IIa, welche aus L-1-Amino-2-propanol²²⁾ hergestellt wurde. Der Versuch verläuft völlig gleich. Das kristalline Produkt unterscheidet sich von Vitamin B₁₂ nur durch geringere mikrobiologische Aktivität.

SUMMARY

A partial synthesis of vitamin B₁₂ is described, starting from factor V_{1a}, a monocarboxylic acid. The necessary phosphoric acid diester containing the nucleotide and 1-amino-2-propanol is obtained from the 2',3'-cyclic phosphate of 1- α -D-ribofuranosyl-5,6-dimethyl-benzimidazole. Condensation of factor V_{1a} with the 'side chain' is effected *via* a mixed anhydride. Unnatural analogues of vitamin B₁₂, one with L-1-amino-2-propanol in place of the D-isomer, and one with the phosphoric acid group attached to the 2'-hydroxy group of ribose, have been obtained.

Biochemisches Forschungslaboratorium der ASCHAFFENBURGER
ZELLSTOFFWERKE AG., Stockstadt a. M., und
Chemische Forschungsabteilung der
F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO. AG., Basel

²⁰⁾ J. PAWELKIEWICZ, W. WALERYCH, W. FRIEDRICH & K. BERNHAUER, J. Chromatography, im Druck.

²¹⁾ Hergestellt aus D-1-Amino-2-propanol.

²²⁾ Für die Überlassung von L-1-Amino-2-propanol danken wir Herrn F. WAGNER.