

ÜBER DIE ANWENDUNG VON ZELLULOSE-IONENAUSTAUSCHERN UND ALGINSÄURE ZUR CHROMATOGRAPHISCHEN REINIGUNG UND TRENNUNG DER VITAMINE DER B₁₂-GRUPPE

J. PAWEŁKIEWICZ, W. WALERYCH

Biochemisches Institut der Landwirtschaftlichen Hochschule Poznań (Polen)

UND

W. FRIEDRICH UND K. BERNHAUER

*Biochemisches Forschungslaboratorium der Aschaffenburger Zellstoffwerke A.G.,
Stockstadt am Main (Deutschland)*

(Eingegangen den 11. Juli 1959)

EINLEITUNG

Die bisher zur Trennung von Vitamin B₁₂-Arten am meisten verwendeten Methoden sind Zellulosepulver-Chromatographie und Elektrophorese. Sie ergänzen einander, wobei die erste vor allem bei der Trennung neutraler bzw. nicht ionisierbarer B₁₂-Arten unersetzlich ist und die zweite zur Trennung ionisierbarer, d.h. basischer oder saurer B₁₂-Arten besonders gute Dienste leistet.

Die elektrophoretische Methode hat den Nachteil, dass sie nur in relativ kleinem Masstab anwendbar ist und stets eine Verunreinigung der zu trennenden Proben mit Elektrolyten mit sich bringt.

Unter den Ionenaustauschern hat sich unseres Wissens nur der carboxylhaltige Austauscher Amberlite IRC-50 (XE-64) bewährt, und zwar zur Beseitigung von Salzen, Proteinen und anderen Verunreinigungen. Er ermöglicht jedoch keine Trennung der einzelnen B₁₂-Arten.

Die Ursache für die beschränkte Verwendbarkeit der Harzaustauscher liegt sowohl in ihrer Beschaffenheit, als auch in der Art des B₁₂-Moleküls. Die Harzaustauscher haben im allgemeinen eine komplizierte, vernetzte Struktur, die den Zugang grosser Moleküle zu den aktiven Gruppen beeinflusst. Dadurch werden diese Moleküle in extremen Fällen entweder gar nicht oder irreversibel festgehalten.

Eine chromatographische Methode, die in der Lage wäre, ionisierbare B₁₂-Arten ähnlich wie durch Elektrophorese zu trennen, erschien daher sehr wünschenswert.

Vor kurzem wurden Zellulose-Ionenaustauscher zur Trennung von Proteinen, Peptiden und Nucleinsäuren mit gutem Erfolg eingeführt^{1,2}. Es erschien daher aussichtsreich zu prüfen, ob solche Austauscher auch auf dem Vitamin B₁₂-Gebiet anwendbar sein mögen, umsomehr, als die genannten Austauscher eine vernetzungsfreie Struktur besitzen, die auch grossen Molekülen den Zugang zu den aktiven Gruppen gestatten. Aus dem gleichen Grund erschien die Prüfung von Alginsäure

berechtigt (zu deren Struktur siehe ³). Wie in vorliegender Mitteilung gezeigt wird, bewähren sich tatsächlich verschiedene Ionenaustauscher auf Polysaccharidbasis ausgezeichnet zur chromatographischen Reinigung und Trennung von Vitamin B₁₂-Arten.

EXPERIMENTELLES

Austauscher

Die handelsüblichen, zum Teil als Natriumsalze bzw. Hydrochloride vorliegenden Zellulose-Ionenaustauscher¹, wie z.B. Carboxymethylzellulose (CM), phosphorsäurehaltige Zellulose (P), Diäthylaminoäthyl-Zellulose (DEAE), und mit Triäthanolamin und Epichlorhydrin umgesetzte Zellulose (ECTEOLA) werden vor der Herstellung der Säulen in die freien Säuren (durch Ansäuern mit verdünnter Salzsäure auf pH *ca.* 2) bzw. Basen (durch Zusatz verdünnter Ammoniaklösung bzw. Natriumhydroxyd) überführt. Die anschliessend gründlich mit Wasser geschlammten und dann mit Aceton gewaschenen Austauscher werden bei 37° getrocknet. Die handelsübliche fein gemahlene Alginsäure* wird vor Gebrauch gründlich mit Wasser gewaschen.

Zur Herstellung von Säulen suspendiert man die Austauscher in dem entsprechenden Entwickler und füllt den erhaltenen Brei ein. Auf ein Stopfen der Säulen kann zumeist verzichtet werden, um ihre Durchlässigkeit nicht zu stark herabzusetzen.

Brauchbare Austauschersäulen kann man auch durch Niederschlagen von Alginsäure an Zellulosepulver herstellen.

12.5 g Zellulosepulver werden in eine Lösung aus 2 g Natriumalginat* in 60 ml Wasser eingerührt, der Brei wird kurz abgesaugt und der Filtrückstand im Vakuum getrocknet. 5 g des Trockenpulvers werden in 50 ml 0.05 N HCl suspendiert, die gut homogenisierte Suspension in das Chromatographierrohr gefüllt und durch Waschen mit Wasser von anhaftender Salzsäure befreit.

Die Säulen sind gut durchlässig und die Alginsäure haftet fest an den Zellulosepartikeln. Linterspulver gibt durchlässigere Säulen als Holzzellulosepulver. Beim Regenerieren mit alkalischen wässrigen Lösungen wird das Alginat ausgewaschen, wonach die Zellulose frisch beladen werden muss.

Elutionstechnik

Die zu trennenden bzw. zu reinigenden Proben werden als wässrige, wässrig alkoholische oder alkoholische Lösungen aufgetragen. Es wird meist rasch (durchschnittlich während einiger Stunden) entwickelt, um ein Verwischen der Zonen durch Diffusion möglichst zu vermeiden.

Man kann zumeist mit elektrolytfreien Flüssigkeiten, also z.B. mit reinem Wasser entwickeln. Stark adsorbierte Stoffe können mit wässrigen Lösungen von wechselnder Konzentration an H⁺-Ionen bzw. Salzen eluiert werden, wobei die aus der Chromatographie von Proteinen bekannten Grundsätze gelten². Danach wird die Elution durch

* Hersteller: AS Protan, Drammen, Norwegen.

folgende Änderungen am Entwicklersystem gefördert: (a) Erhöhung der Salzkonzentration, (b) Erhöhung des pH-Wertes (bei Kationenaustauschern), (c) Senkung des pH-Wertes (bei Anionenaustauschern). Der Mechanismus der Elution beruht bei (a) auf der Schwächung elektrostatischer Bindungen zwischen dem Austauscher und der adsorbierten Substanz, bei (b) und (c) auf einer Ladungsänderung, sowohl am Austauscher als auch an den adsorbierten Molekülen. Bei der Elution gehen meist kleine Mengen von Stoffen aus den Austauschern in Lösung. Zu deren Beseitigung empfiehlt sich, den Eindampfdruckstand der Eluate in Methanol oder wässrigem Aceton aufzunehmen und über Aluminiumoxyd bzw. Kieselgur zu filtrieren.

ERGEBNISSE

P-Zellulose (Fa. Serva Entwicklungslabor, Heidelberg) eignet sich ausgezeichnet zur Trennung von Vitamin B₁₂-Arten unterschiedlicher Basizität, also z.B. von Vitamin B₁₂, Pseudovitamin B₁₂, Faktor A und Vitamin B_{12b}. Sehr charakteristisch für diesen Zellulose-Austauscher ist die Bildung äusserst scharfer Zonen, vor allem bei Verwendung rein wässriger Medien als Entwickler. Hierzu eignet sich vor allem reines Wasser sowie Pufferlösungen. Die Entwicklung mit reinem Wasser hat den Vorteil, dass salzfreie, evtl. direkt nach dem Einengen kristallisierbare Eluate erhalten werden. Puffer benützt man im allgemeinen nur zur Elution sehr langsamer Zonen (z.B. von Faktor A und Vitamin B_{12b}). Man kann aber auch Mischungen aus gleichen Teilen Wasser und Alkoholen mit gutem Erfolg verwenden (dabei sind jedoch die Zonen etwas weniger scharf), wozu Äthanol am besten geeignet ist. Nucleotidfreie Vitamin B₁₂-Analoge wie z.B. Faktor B und Faktor V₁₂ werden bei Cyanidmangel an *P-Zellulose* festgehalten und können durch Zusatz von Blausäure oder Cyanid zum Entwickler als Dicyano-Komplexe eluiert werden. Dieses Verhalten ist auch für CM und für Alginsäure-haltige Austauscher charakteristisch. Mit einer selbst hergestellten *P-Zellulose* konnten allerdings keine so guten Trennungen erzielt werden wie mit dem genannten Handelsprodukt. *P-Zellulose* eignet sich auch sehr gut zur Befreiung der Vitamin B₁₂-Arten von Proteinen, von denen ein grosser Teil in der Säule festgehalten wird. Als Lösungsmittel eignet sich hierzu sehr gut Methanol bzw. eine Mischung aus gleichen Teilen Wasser und Methanol.

Alginsäure lässt sich nur in rein wässrigem Medium anwenden, ein Zusatz von Alkoholen verursacht diffuse Zonen. Sie ähnelt in ihrem Verhalten gegenüber einer Mischung von Vitamin B₁₂, Pseudovitamin B₁₂ und Faktor A der *P-Zellulose*. Sie kann regeneriert werden, indem sie nacheinander mit verdünnter NaCl-Lösung und Wasser gewaschen wird.

Mit Alginsäure imprägniertes Zellulosepulver hat in Bezug auf die Trennfähigkeit der B₁₂-Arten weitgehend die Eigenschaften der CM-Zellulose.

CM-Zellulose (Fa. Serva Entwicklungslabor, Heidelberg), verwendet in Wasser, in wässrigen Pufferlösungen und beschränkt in wässrig-alkoholischen Lösungen, eignet sich gut zur Trennung von Faktor A und Pseudovitamin B₁₂ sowie von Faktor A und Vitamin B₁₂, schlechter zur Trennung von Vitamin B₁₂ und Pseudo-

TABELLE I
TRENUNG VON VITAMINEN DER B₁₂-GRUPPE IN SÄULEN AUS
ZELLULOSE-IONENAUSTAUSCHERN UND ALGINSÄURE

Austauscher	Entwickler	Beobachtete R-Werte*					
		Fakt. B	Fakt. V _{1a}	B ₁₂	ψ-B ₁₂	Fakt. A	Vit. B ₁₂ - carbonsäuren
P-Zellulose	Wasser	0.0	0.0	1.2	0.15	0.02	1.2
	Wasser + HCN	1.2	1.2				
	MeOH-H ₂ O (1:1)	—	—	1.1	0.3	0.08	—
	ÄtOH-H ₂ O (1:1)	—	—	1.1	0.3	0.08	—
	IsoprOH-H ₂ O (1:1)	—	—	1.0	0.23	s. klein	—
	sec.-BuOH ges. mit H ₂ O	—	—	0.8	0.08	s. klein	—
Alginsäure	Wasser	0.0	0.0	1.0	0.1	0.02	1.0
	Wasser + HCN	1.0	1.0				
Alginsäure- Zellulose	Wasser	0.0	0.0	1.2	0.63	0.27	1.2
	Wasser + HCN	1.2	1.2				
CM-Zellulose	Wasser	0.0	0.0	1.0	0.8	0.33	1.0
	Wasser + HCN	1.0	1.0				
		BuOH ges. mit H ₂ O	—	—	0.7	0.3	0.1

$$* R = \frac{\text{Verschiebung der Zone}}{\text{Verschiebung des Entwicklerniveaus}}$$

vitamin B₁₂. Wohl aber konnten mit Hilfe einer selbst hergestellten CM-Zellulose sehr scharfe Trennungen erzielt werden. Die Eigenschaft von CM-Zellulose, Proteine zu adsorbieren^{1, 2}, kann zur Reinigung von Vitamin B₁₂-Arten benützt werden. Man verwendet dabei wässrige, methanolische sowie auch wässrig-methanolische Medien, wobei ein Teil der Proteine in der Austauschersäule zurückbleibt.

DEAE-Zellulose (Fa. Schleicher & Schüll, Dassel) trennt in wässrigen, wässrig-methanolischen sowie in rein methanolischen Lösungen saure B₁₂-Arten von neutralen und basischen, indem die sauren zurückgehalten werden und die übrigen die Säule durchlaufen. In Gegenwart eines Überschusses an Blausäure kann DEAE-Zellulose auch zur Trennung von Faktor B von allen anderen B₁₂-Arten dienen, da diese unter diesen Bedingungen als saure Dicyanokomplexe vorliegen und daher festgehalten werden. Dieser Austauscher hat eine besonders hohe Kapazität gegenüber Proteinen und Peptiden und eignet sich deshalb ausgezeichnet zur Reinigung von Konzentraten der Vitamin B₁₂-Arten. Als Medium wird in diesem Falle meist Methanol oder ein Gemisch aus gleichen Teilen Wasser und Methanol verwendet.

ECTEOLA-Zellulose (Fa. Schleicher & Schüll, Dassel) unterscheidet sich in Bezug auf die Trennbarkeit von B₁₂-Arten wenig von DEAE. Da sie jedoch eine geringere Kapazität gegenüber Proteinen besitzt¹, wird meist DEAE zu bevorzugen sein.

TEAE-Zellulose (Fa. Serva, Entwicklungslabor, Heidelberg) lässt sich, ähnlich wie DEAE-Zellulose, zur Trennung von sauren Vitamin B₁₂-Faktoren verwenden. Besonders gut gelingt die Trennung von Vitamin B₁₂-Mono-, Di- und Tricarbonensäuren unter Verwendung steigender Mengen an Tris-Puffer*.

* Nach Versuchen von Frl. Dipl. chem. GISELA GROSS.

TABELLE II

TRENNUNGSGANG VON B₁₂-ARTEN DURCH ZELLULOSE-IONENAUSTAUSCHER

<i>Kationenaustauscher (P-Zellulose oder CM-Zellulose)</i>				
CN'-armer Entwickler: Durchlauf von neutralen und sauren Stoffen		CN'-reicher Entwickler: Durchlauf von Dicyanoformen		Trennung der basischen Stoffe in der Säule:
<i>Anionenaustauscher (DEAE oder TEAE)</i>				
Durchlauf neutraler Anteile: Vit. B ₁₂ , Faktor III, etc.	Trennung der sauren Stoffe in der Säule: Vit. B ₁₂ -carbon-säuren u. phosphorsäurehaltige inkomplette B ₁₂ -Faktoren	Durchlauf neutraler Stoffe: Faktor B	Trennung der sauren Stoffe in der Säule: Faktoren V ₁ -V ₆	Pseudo-Vitamin B ₁₂ , Faktor A

Tabelle II zeigt einen Trennungsgang von natürlichen Vitamin B₁₂-Arten mit Hilfe von Zellulose-Ionenaustauschern.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird über die Verwendung von einigen Zellulose-Ionenaustauschern sowie von Alginsäure und Alginsäure-Zellulose-Präparaten zur chromatographischen Trennung und Reinigung der Vitamine der B₁₂-Gruppe berichtet. Die beschriebene Methode besitzt den Vorteil, dass sie sehr rasch und auch in grossem präparativen Masstab durchführbar ist. Sie ergänzt in sehr wertvoller Weise die Zellulosepulver-Chromatographie und Elektrophorese.

SUMMARY

A study was made of the application of some cellulose ion exchangers, as well as alginic acid and alginic acid-cellulose preparations, for the chromatographic separation and purification of vitamins of the B₁₂-group. The advantages of the method described are that it is very rapid and can also be applied for the preparation of large amounts of these vitamins. The technique is a valuable complement to cellulose-powder chromatography and electrophoresis.

LITERATUR

- ¹ E. A. PETERSON UND H. A. SOBER, *J. Am. Chem. Soc.*, 78 (1956) 751.
- ² H. A. SOBER UND E. A. PETERSON, *Federation Proc.*, 17 (1958) 1116.
- ³ R. L. WHISTLER UND K. W. KIRBY, *Z. physiol. Chem.*, 314 (1959) 46.