

## KOBALT- UND VITAMIN B<sub>12</sub>-STOFFWECHSEL BEIM HUHN

### II. DIE TRENnung DER COBALAMINE AN IONENAUSTAUSCHERN

K. H. MENKE

unter technischer Mitarbeit von U. UMBERG

*Institut für Tierzucht und Tierfütterung der Universität,  
Bonn (Deutschland)*

(Eingegangen den 2. Mai 1961)

Die chromatographische Trennung an Ionenaustausch- oder Zello-säulen ist der Papierchromatographie und -elektrophorese nicht nur bei präparativen Arbeiten überlegen, sondern auch bei der Analyse, wenn es gilt, Vorreinigung- und Anreicherungs-schritte zu sparen. An der Säule können immerhin 10–100-fach grössere Mengen aufgetrennt werden als auf dem Papier. In physiologischen Untersuchungen über den Stoffwechsel von Vitaminen und Spurenelementen empfiehlt sich die Säulen-chromatographie um so mehr, als die hier zu analysierenden verschwindend geringen Substanzmengen bei jedem Vorreinigungsschritt in ihrer Zusammensetzung verändert werden können, zumal, wenn bisher unbekannte Verwandte der gesuchten Verbindung miterfasst werden sollen.

Eine brauchbare Methode zur Trennung der Cobalamine an Zello-säulen haben FRIEDRICH UND BERNHAUER<sup>1</sup> entwickelt. Unter Verwendung von wässrigem sekundärem Butanol und chromatotropen Salzen trennten sie die Faktoren A, B und III, sowie das Pseudovitamin B<sub>12</sub> vom Cyanocobalamin. Das Verfahren ist für Serien-analysen allerdings recht aufwendig. Überdies ist eine Anpassung an die Trennung weiterer Analoge schwierig. In einer späteren Arbeit<sup>2</sup> gehen diese Autoren zur Chromatographie an Zello-säulen-Ionenaustauschern und Alginsäure über. Dabei enthalten die Gipfel des Cyanocobalamins immer noch die Vitamin B<sub>12</sub>-Carbonsäuren und die des Faktors B den Faktor V<sub>1a</sub> (Faktor B-Monocarbonsäure).

Kationenaustauscher erschienen uns demgegenüber anpassungsfähiger, da diese durch die Möglichkeit der kontinuierlichen Veränderung des Puffer-pH sowie der Salzkonzentration den Eigenschaften der verschiedensten Verbindungen angepasst werden können. Erste Versuche mit dem stark sauren Ionenaustauscher Dowex-50X4 ergaben jedoch, dass die Variationsbreite der Puffer nicht hinreicht, um das Cyanocobalamin in einen "Schwebezustand" an der Säule zu bringen. Das Cyanocobalamin läuft auch bei noch so saurer Einstellung der Puffer sofort mit der Front aus, während es am Ionenaustauscher in der H<sup>+</sup>-Form festgehalten, aber nicht chromatographiert wird. Wir konnten diese Schwierigkeit überwinden, indem wir den Ionenaustauscher zuvor mit einem sauren Ammoniumchlorid-Puffer einstellten und die Cl<sup>-</sup>-Ionen mit Wasser schnell ausspülten, sodass das Harz in einer bestimmten (wählbaren) Dichte

mit NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Ionen belegt wird (MENKE<sup>3</sup>). Bei der Einstellung auf eine bestimmte NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Ionenkonzentration wandert das Cyanocobalamin mit Wasser als Eluens mit einem *R*-Wert < 1.00 und wird von den übrigen Cobalaminen gut getrennt. Wie im Folgenden gezeigt werden soll, können mit Hilfe dieses Verfahrens und anschließender Elution mit Puffern 7 der bekannten Vitamin B<sub>12</sub>-Arten und mindestens 5 weitere, bisher nicht identifizierte, Co-haltige Verbindungen getrennt werden.

Über Erfahrungen mit dem schwach sauren Carboxyl-Ionenaustauscher Amberlite XE 97, der als einziger Kationenaustauscher bei direkter Elution mit Puffern das Cyanocobalamin verzögert laufen lässt, wurde an anderer Stelle schon berichtet (MENKE<sup>4</sup>).

#### VERSUCHSANORDNUNG

Legehennen bzw. Küken erhielten per os je 16.66  $\mu$ C <sup>60</sup>Co in 7.22  $\mu$ g CoCl<sub>2</sub> durch Eintröpfeln von 0.5 ml einer wässrigen Lösung in den Schnabel. Die Tiere wurden nach 5 bzw. 12 h getötet, die Caeca entnommen und der Inhalt der Caeca mit 0.2 *M* Na-Citrat-puffer vom pH 4.25, enthaltend 0.02 % KCN, in Dialysierschläuche von 40 ml Fassungsvermögen überführt. Die Dialyse geschah in Reagensgläsern der Grösse 33 × 200 mm gegen ein äusseres Flüssigkeitsvolumen von 80 ml. Die Gläser wurden in eine langsam rotierende Apparatur gespannt, die in einem auf 40° eingeregelter Brutschrank Platz fand.

Als Dialysemedium diente 0.05 *M* Na-Citrat- bzw. Na-Phosphat-puffer, enthaltend 0.02 % KCN. Während der ersten 4 Dialyseschritte wurde der pH auf 4.25 gehalten, in den folgenden 3 Schritten ansteigend auf 5.0, 6.5 und 8.0 (s. Tabelle Ia). Die Dialyse bei steigenden pH-Werten ist insofern empfehlenswert, als getrennte Analysen der einzelnen Dialysate eine unterschiedliche Zusammensetzung hinsichtlich der extrahierten Cobalamine aufwiesen (MENKE<sup>5</sup>). Der erste Wechsel des Dialysemediums fand nach 4 h, der zweite nach 16 h und die folgenden nach je 24 h statt. Insgesamt wurden auf diese Weise 98–99 % der Radioaktivität also der Co-haltigen Verbindungen aus dem Caecum-Inhalt extrahiert.

Zur Radioaktivitätsmessung bedienten wir uns eines Szintillationszählers mit flachem Kristall und bis zu 100 ml fassenden V<sub>4</sub>A-Stahlbechern.

Die vereinigten Dialysate (etwa 400–500 ml) werden mit 70 ml einer 20 % *p*-Chlorphenol enthaltenden Trichloräthylenlösung (20 g *p*-Chlorphenol auf 55 ml Trichloräthylen, im Folgenden kurz "TP" genannt) über 6 h geschüttelt, anschliessend in 200 ml fassenden Gläsern zentrifugiert, wobei jeweils die das anorganisch gebundene Kobalt enthaltende wässrige Phase nach 2–3 weiteren Extraktionen verworfen wird. Aus der TP-Phase werden die Cobalamine durch Zusatz von 40 ml Äthylazetat und 50–60 ml Wasser sowie 4-stündiges Schütteln in die wässrige Phase verdrängt (FRIEDRICH UND BERNHAUER<sup>6</sup>), diese dann in der Zentrifuge abgeschieden und durch Auspipettieren der TP-Phase getrennt. Zur Entfernung der restlichen Phenoltröpfchen wird mit 10 ml Butanol geschüttelt und nach dem Abscheiden des Butanols im Rotationsevaporator bei 25° auf 1–2 ml eingengt.

Die Proben werden in kleinen Reagensgläsern bei  $-20^{\circ}$  aufbewahrt oder direkt zur Chromatographie auf die Säule gegeben.

Zur *Einstellung des Ionenaustauschers* werden 100 ml feuchten Harzes vom Typ Dowex-50X<sub>4</sub>, Korngrösse kleiner 400 mesh (Kernsulfoniertes Polystyrolharz vom Vernetzungsgrad 4 %) in eine mindestens 150 ml fassende Glasfritte (G<sub>2</sub>) mit Hahn gefüllt und zunächst mit 1 M NH<sub>3</sub>-Lsg. und 1 N HCl gewaschen. Dann wird das Harz auf einen pH von 2.0–2.5 (gemessen in der überstehenden Flüssigkeit) eingestellt und nach Verdünnen mit destilliertem Wasser mit einem 0.2 M NH<sub>4</sub>Cl-Puffer vom pH 2.3 (Zusammensetzung: 200 ml 0.2 M NH<sub>4</sub>Cl + 6 ml 0.2 N HCl) solange gespült, bis der pH des Ausflusses dem der Ausgangslösung gleich ist. Das abgesetzte, feuchte Harz wird dann mit einem an den Seiten eingeschlitzten Filtrierpapier überdeckt und bei abgeschlossenem Hahn mit destilliertem Wasser überschichtet. An den Ausfluss wird eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen und die Cl<sup>-</sup>-Ionen unter ständigem Nachgiessen von etwa 500–800 ml H<sub>2</sub>O schnell eluiert. Lässt man das Wasser nur langsam durchziehen, so wird nur die obere Schicht des Harzes NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Ionen in der gewünschten Konzentration besitzen, während in den darunter liegenden Zonen sich entsprechend der angestiegenen Cl<sup>-</sup>-Ionenkonzentration ein neues Gleichgewicht einstellt. Das Spülen unter Atmosphärendruck reicht jedoch aus, um einen gleichmässigen Besatz an NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Ionen im Harz zu erreichen.

Das Harz wird dann mit 20–30 ml Wasser in ein vakuumfestes Gefäss überführt und auf einem Magnetrührer mit der Wasserstrahlpumpe entlüftet, wobei auch eventuell vorhandene Spuren CN<sup>-</sup> entweichen. Anschliessend wird das Harz in eine Säule von 10 mm innerem Durchmesser und mindestens 130 cm Höhe gefüllt und unter Druck von 2 m Wassersäule zusammengepresst, sodass die Säulenlänge des abgesetzten Harzes etwa 120 cm beträgt. Nach Entfernen des überstehenden Wassers wird die Probe—maximal 5 ml—aufgegeben.

Aus der mit einer G 2-Fritte unten abgeschlossenen Säule wird das Eluat durch einen dünnen Schlauch in eine Spirale geführt, die im Bohrloch eines Szintillationszählers Platz hat und 2 ml Flüssigkeit fasst. Von hier gelangt das Eluat in einen volumengesteuerten Fraktionensammler\*, der beim Abfüllen der 3.8 ml grossen Fraktionen gleichzeitig eine Markierung an dem die durchfliessende Radioaktivität registrierenden Schreiber betätigt, sodass die Fraktionen nachher den Kurventeilen zugeordnet werden können.

Es wird zunächst mit reinem, CN<sup>-</sup>-freien Wasser eluiert, dann—nach etwa 60–70 Fraktionen—mit einem der in Tabelle Ib angegebenen Puffer, wobei zur Beschleunigung des Durchlaufs ein Druck von 2 m Wassersäule angelegt werden kann. Hiermit werden schon die wichtigsten Cobalamine eluiert. Sollen auch die bei höheren pH-Werten wandernden Analoge abgetrennt werden, so setzt man anschliessend die Puffer oberhalb pH 5.0 ein, ehe mit der 1 M NH<sub>3</sub>-Lsg. der Rest eluiert wird. Zur besseren Orientierung im Chromatogramm wird Vitamin B<sub>12</sub> und daraus hergestellter Faktor B (FRIEDRICH UND BERNHAUER<sup>7</sup>) mit aufgegeben, sodass die gesammelten

\* Fa. N. Vogel, Bad Godesberg.

Fraktionen nach Beendigung der Chromatographie sowohl an Hand der Radioaktivitätskurve als auch mit Hilfe der Rotfärbung durch die Kontrollsubstanzen den einzelnen Gipfeln zugeordnet und zusammengewaschen werden können.

Die so gewonnenen Gipfel werden, soweit erforderlich, durch Ausschütteln mit  $p$ -

TABELLE I

ZUSAMMENSETZUNG DER PUFFER FÜR DIALYSE, SÄULENCHROMATOGRAPHIE UND ELEKTROPHORESE, SOWIE DER LÖSUNGSMITTELSYSTEME (LMS) FÜR DIE PAPIERCHROMATOGRAPHIE

Kurzbezeichnung	Zusammensetzung				
(a) Puffer für die <i>Dialyse</i> : 0.05 M, jeweils 0.02 % KCN enthaltend, ad 2000 ml H <sub>2</sub> O					
pH 4.25	10.5 g Citr. sre.,	4.125 g NaOH,	25 ml 1 N HCl,	4 g Phenol	
pH 5.0	10.5 g Citr. sre.,	4.125 g NaOH,	4 g Phenol		
pH 6.5	10.5 g Citr. sre.,	5.8 g NaOH,	4 g Phenol		
pH 8.0	33.12 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 12 H <sub>2</sub> O,	1.14 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 2 H <sub>2</sub> O,		4 g Phenol	
(b) Puffer für die <i>Säulenchromatographie</i> : 0.2 M, KCN-Gehalt s. Fig. 1-2, ad 5000 ml H <sub>2</sub> O					
pH 3.70	105 g Citr. sre.,	41.25 g NaOH,	445 ml 1 N HCl,	10 g Phenol	
pH 4.00	105 g Citr. sre.,	41.25 g NaOH,	346 ml 1 N HCl,	10 g Phenol	
pH 4.05	105 g Citr. sre.,	41.25 g NaOH,	333 ml 1 N HCl,	10 g Phenol	
pH 4.06	105 g Citr. sre.,	41.25 g NaOH,	330 ml 1 N HCl,	10 g Phenol	
pH 4.10	105 g Citr. sre.,	41.25 g NaOH,	314 ml 1 N HCl,	10 g Phenol	
pH 4.25	105 g Citr. sre.,	41.25 g NaOH,	250 ml 1 N HCl,	10 g Phenol	
pH 4.50	105 g Citr. sre.,	41.25 g NaOH,	154 ml 1 N HCl,	10 g Phenol	
pH 5.00	105 g Citr. sre.,	41.25 g NaOH,		10 g Phenol	
pH 6.00	105 g Citr. sre.,	58.0 g NaOH,	94 ml 1 N HCl,	10 g Phenol	
pH 6.50	105 g Citr. sre.,	58.0 g NaOH,		10 g Phenol	
pH 7.00	105 g Citr. sre.,	58.0 g NaOH,	39 ml 1 N NaOH,	10 g Phenol	
NH <sub>4</sub> OH	1 N Ammoniaklösung + 0.02 % KCN, (375 ml 25 %ige NH <sub>3</sub> ad 5 l)				
	Bei Zugabe von 0.02 % KCN kann der pH-Wert mit 5-7 ml 1 N HCl je 5000 ml wieder eingestellt werden.				
(c) Lösungen für die <i>Papierelektrophorese</i> : 0.02 % KCN, ad 1000 ml H <sub>2</sub> O					
pH 2.7	1 N Essigsäure				
pH 6.5	0.1 M Na Phosphatpuffer: 13.075 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 12 H <sub>2</sub> O, 10.688 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 2 H <sub>2</sub> O, 2 g Phenol				
pH 8.0	33.195 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 12 H <sub>2</sub> O, 1.141 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 2 H <sub>2</sub> O, 2 g Phenol				
pH 10.4	0.1 M Na-Carbonatpuffer: 10.6 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 2 g Phenol				
(d) Lösungsmittelsysteme für die <i>Papierchromatographie</i> : wässr. sek.-Butanol: 350 ml sek.-Butanol; 150 ml H <sub>2</sub> O; 0.001 % HCN					
LMS-I	25 ml wässr. sek.-Butanol + 0.15 ml Eisessig				
LMS-II	25 ml wässr. sek.-Butanol + 0.25 ml 25 %iger NH <sub>3</sub> -Lsg.				

Chlorphenol (TP) und Verdrängen mit Äthylazetat (s. oben) entsalzt. Da sämtliche Cobalamine sich so entsalzen lassen, anorganisch gebundenes Kobalt aber nicht, kann auf diesem Wege der Kobaltgipfel im Chromatogramm erkannt werden\*. Dieses Kobalt entstammt der nicht völlig entfernten wässrigen Phase bei der ersten Extraktion der Cobalamine aus dem Dialysat.

Die abgetrennten und entsalzten Cobalamine in wässriger Lösung werden mit 4–6 ml Butanol ausgeschüttelt, bei 25° im Rotationsevaporator bis auf 1–2 ml eingengt und an einer mit normalem Eis von 0° betriebenen "Gefriertrocknungs-Apparatur" bei 5–10 mm Druck Hg-Säule zur Trockene eingedampft. Die in einem Fleck von 1–2 cm<sup>2</sup> eingetrocknete Substanz wird mit 0.1 ml Wasser aufgenommen, in eine Mikropipette gesogen und in 6 gleichen Portionen auf 2 Papierchromatogrammpfeifen und 4 Elektrophoresestreifen aufgetragen.

Zur Papierelektrophorese werden die Streifen in die mit einem der in Tabelle Ic angegebenen Puffer gefüllte Elphor-Kammer\*\* gelegt, sodass die von beiden Seiten aufsteigenden Pufferfronten sich gleichzeitig an der Auftragsstelle treffen und damit die Substanz zu einem schmalen Streifen zusammenschieben. Die Elektrophorese wird mit 110 V über 16 Stunden betrieben.

Die Papierchromatogramme werden mit einem der in Tabelle Id angegebenen Lösungsmittelsysteme in einer gläsernen Kammer absteigend entwickelt. Die Kammer steht in einem thermostatisierten, abgedunkelten Raum, sodass Störungen durch Temperaturschwankungen oder Belichtung (Abspaltung von CN<sup>-</sup>) vermieden werden. Zur Kontrolle werden sowohl bei der Elektrophorese als auch bei der Papierchromatographie zwischen den Auftragsstellen der Proben Cyanocobalamin und Faktor B in sichtbaren Mengen aufgetragen und mit chromatographiert. Nach dem Trocknen der Chromatogramme werden an Hand dieser Kontrollen zunächst die Fronten für Cyanocobalamin und Faktor B bestimmt und nachgezeichnet. Dann werden die Papierchromatogramme bzw. Elektropherogramme mit Tesa-Film auf Holztafeln der Grösse 30 × 30 cm gespannt und bei völliger Dunkelheit mit Röntgenfilm (Adox-Dono) und mit einer zweiten, schaumgummibezogenen Holztafel bedeckt und in lichtdichten Kassetten 14 Tage exponiert. Zur Markierung der Lage des Films auf dem Papier enthalten die Holztafeln je zwei Stahlstifte, die gerade 1 mm aus der Holzoberfläche herausragen und Papier und Film durchstechen. Nach dem Exponieren über 14 Tage ergeben Flecke mit 200 c.p.m. Radioaktivität noch deutlich sichtbare Schwärzungen auf dem Film. Um sicher zu gehen, dass keine Schwärzungen durch chemische Einwirkungen hervorgerufen werden, haben wir anfangs eine Reihe von Chromatogrammen zusätzlich mit einem GM-Zähler ausgemessen und in keinem Fall eine solche Artefakt-Bildung beobachtet.

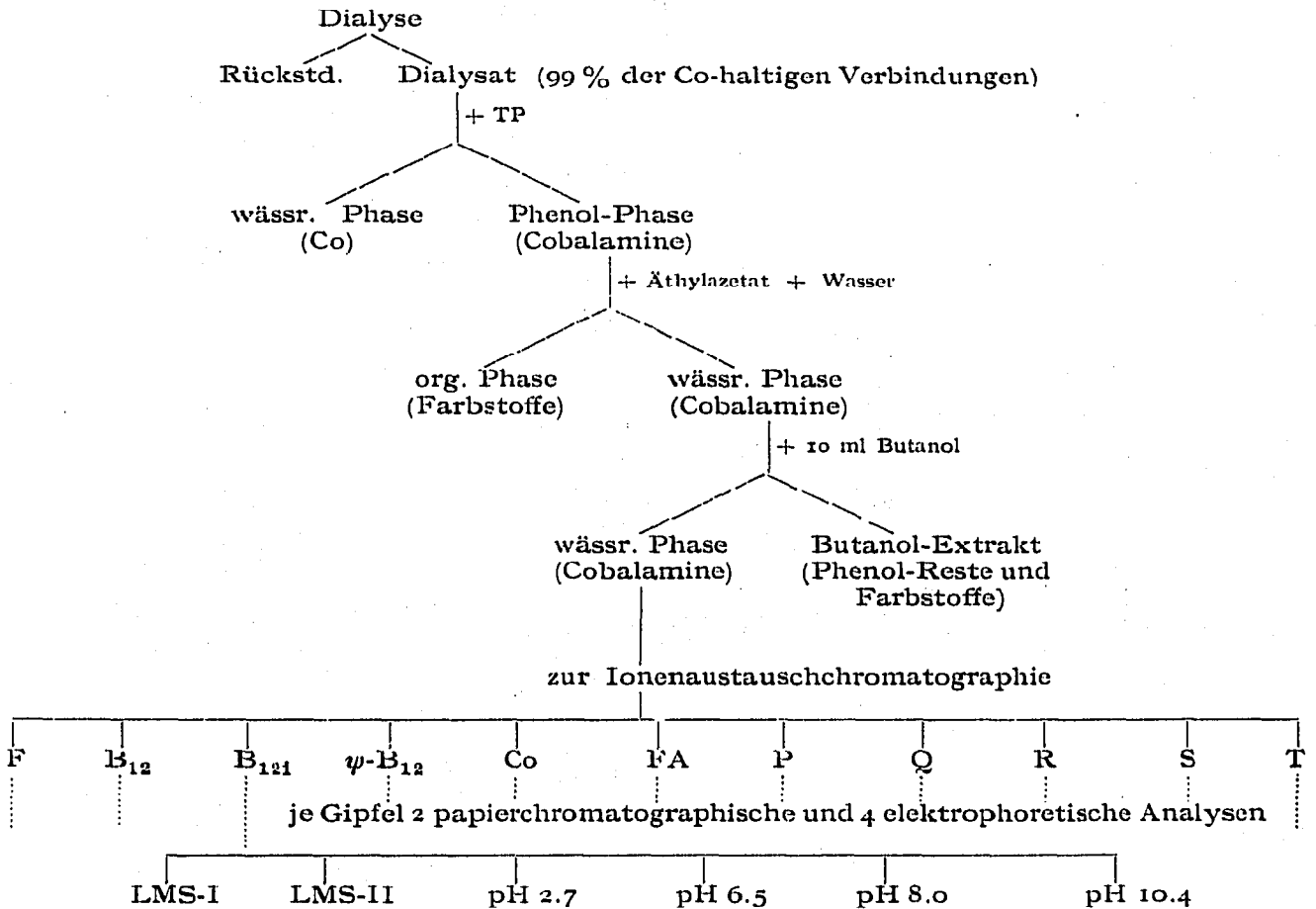
In die entwickelten Röntgenfilme zeichneten wir die Startflecke und die Fronten für Cyanocobalamin und Faktor B ein und fotografierten diese ab. Da aus arbeits-technischen Gründen die zu einem Gipfel gehörenden Chromatogramme nicht zu-

\* Überdies erscheint nach alleiniger Aufgabe von <sup>60</sup>CoCl<sub>2</sub> der Radioaktivitätsgipfel an der gleichen Stelle.

\*\* Fa. Bender & Hobein, München.

sammen chromatographiert werden konnten, mussten die positiven Abzüge der Filme erneut zerschnitten und in der richtigen Reihenfolge geordnet ein zweites mal fotografiert werden (s. Fig. 3 und 4).

TABELLE II  
ÜBERSICHT ZUM ANALYSENGANG



#### ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Chromatogramme a–g (Fig. 1) wurden aus einem Gemisch von Caecum-Inhalt mehrerer, 5 Wochen alter Küken, die 5 Stunden nach Verabreichung von <sup>60</sup>CoCl<sub>2</sub> getötet worden waren, erstellt. Die Chromatogramme a und b in Fig. 2 entstammen dem Caecum-Inhalt einer Legehennen, und zwar 12 Stunden nach der Applikation.

Mit Wasser wird in der Lösungsmittelfront zunächst der Gipfel A eluiert. Kurz dahinter erscheint ein zweiter, sehr schwacher Gipfel (Fig. 1a–g) und nach 17–20 Fraktionen ein dritter. Diese Substanzen treten jedoch in so geringen Mengen auf, dass sie bisher noch nicht näher charakterisiert werden konnten. Als nächster Gipfel erscheint bei Fraktion 30–32 (Fig. 2a, b) ein Cobalamin, das auf Grund der Trennungen auf Papier (Fig. 3a) als Faktor III (5-Oxybenzimidazol-Cobalamin-Analogon, FRIEDRICH UND BERNHAUER<sup>8</sup>) oder Guanin-Cobalamin angesprochen werden kann.

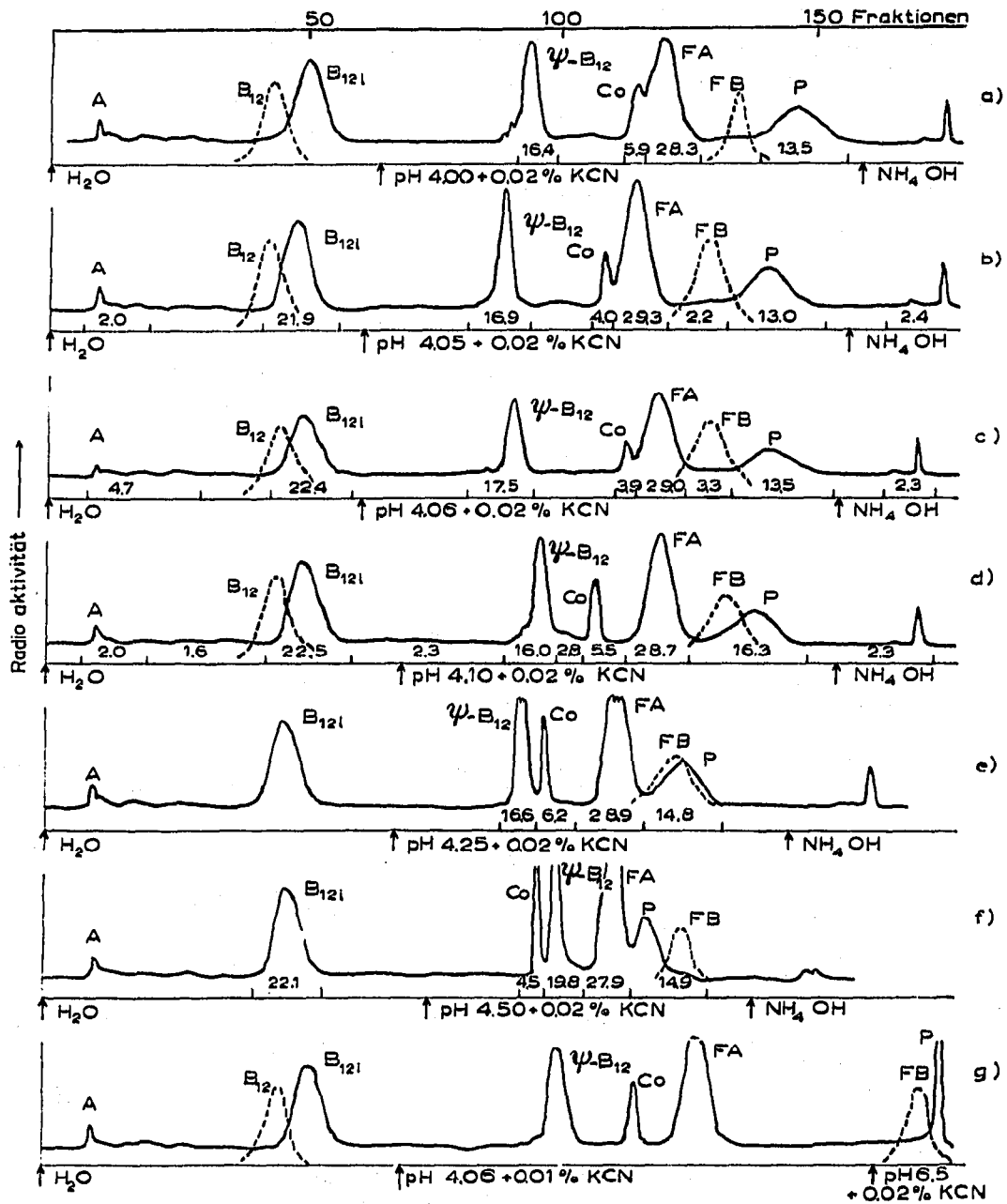


Fig. 1. Trennung der Cobalamine an Dowex-50X<sub>4</sub>. — = Radioaktivität; - - - = Färbung der Kontrollsubstanz. Erläuterung siehe Text.

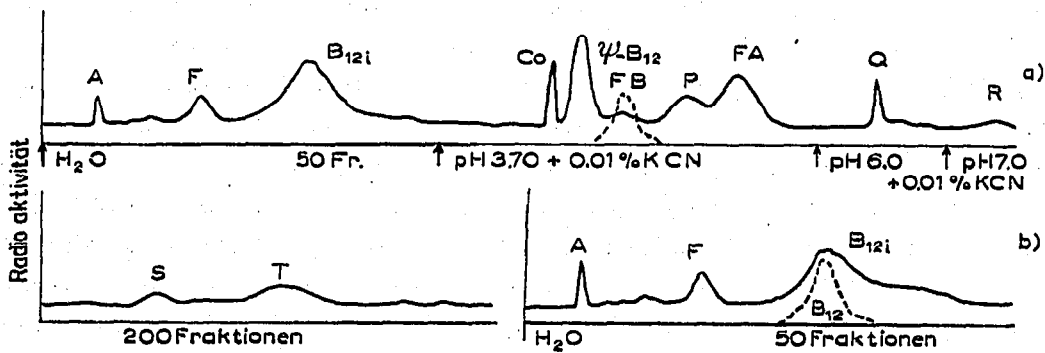


Fig. 2. Trennung der Cobalamine an Dowex-50X<sub>4</sub> (s. Fig. 1).

Im Röntgenfilm (Fig. 3a) findet sich daneben ein zweiter, schwächerer Fleck, der entweder einer Substanz zugeordnet werden müsste, die in LMS-I und bei pH 2,7 mit dem Faktor III läuft, oder aber ein bei der Aufarbeitung und Trennung auf

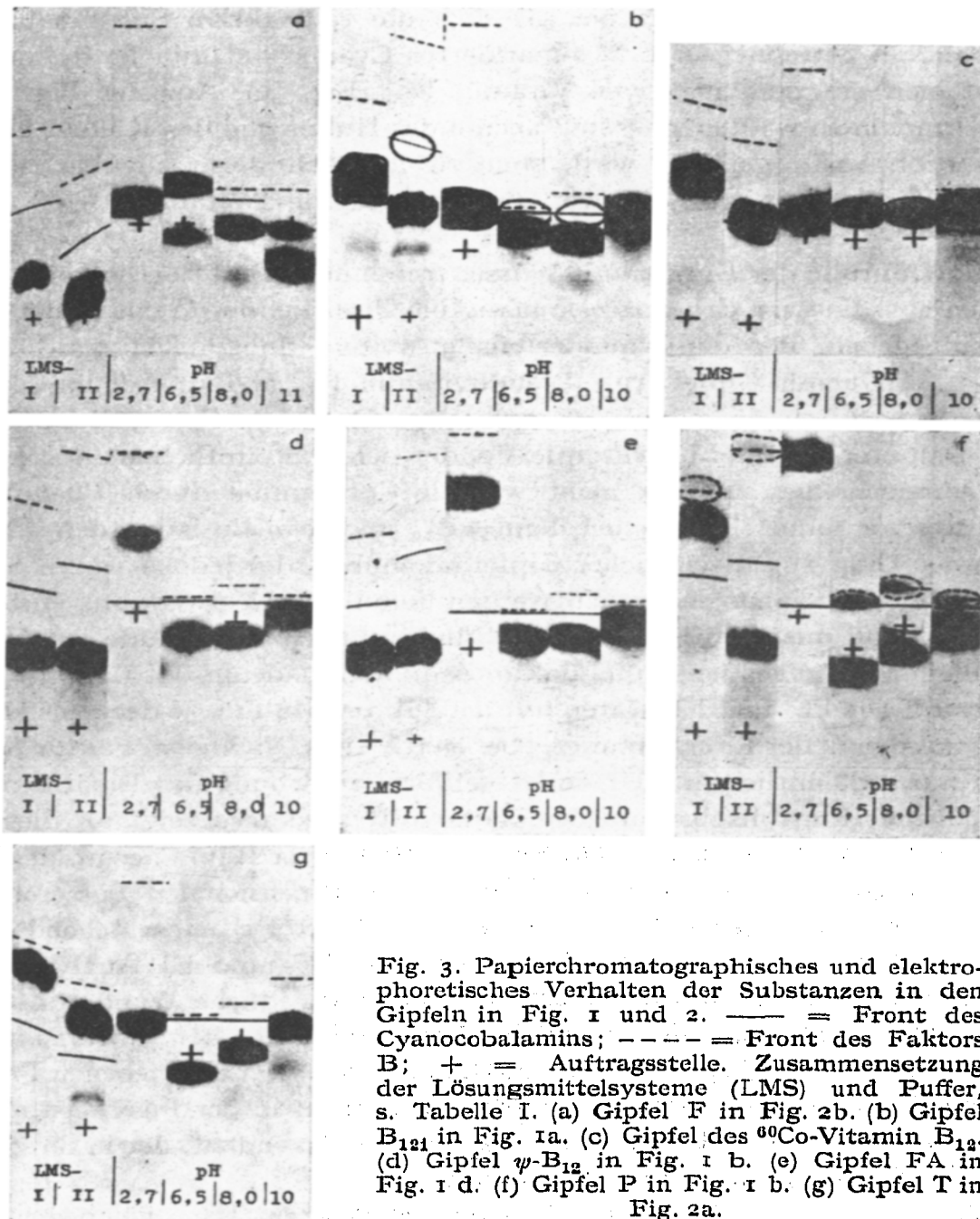


Fig. 3. Papierchromatographisches und elektrophoretisches Verhalten der Substanzen in den Gipfeln in Fig. 1 und 2. — = Front des Cyanocobalamins; - - - = Front des Faktors B; + = Auftragsstelle. Zusammensetzung der Lösungsmittelsysteme (LMS) und Puffer, s. Tabelle I. (a) Gipfel F in Fig. 2b. (b) Gipfel B<sub>121</sub> in Fig. 1a. (c) Gipfel des <sup>60</sup>Co-Vitamin B<sub>12</sub>. (d) Gipfel  $\psi$ -B<sub>12</sub> in Fig. 1b. (e) Gipfel FA in Fig. 1d. (f) Gipfel P in Fig. 1b. (g) Gipfel T in Fig. 2a.

dem Papier entstandenes Artefakt darstellt. Angesichts der sehr gleichmässigen Form des Gipfels F ist es jedoch unwahrscheinlich, dass es sich dabei um eine zweite Substanz in diesem Gipfel handelt.

Bei Fraktion 45 liegt der Gipfel des als Kontrolle mit aufgetragenen Cyanoco-



balamins, während der Radioaktivitätsgipfel erst bei Fraktion 50 erscheint (Fig. 1a-g, 2a-b). Wir haben diese Differenz zunächst als einen Isotopeneffekt gedeutet, zumal die ersten PC\*- und EP\*-Analysen ein identisches Verhalten der beiden Gipfel ergaben (Fig. 3b) (MENKE<sup>3,4,9</sup>). Dann zeigte sich jedoch, dass im LMS-II und bei pH 8.0—weniger deutlich auch bei pH 6.5—die radioaktive Substanz von dem Cyanocobalamin getrennt wird. <sup>60</sup>Co-markiertes Cyanocobalamin läuft hingegen in allen Systemen mit dem inaktiven Vitamin B<sub>12</sub> (Fig. 3c). Aus der Fig. 3b kann überdies entnommen werden, dass im Caecum des Huhns und des Kükens überhaupt kein Cyanocobalamin gebildet wird, sondern lediglich diese offenbar sehr nahe verwandte Verbindung, für die wir die Bezeichnung "Vitamin B<sub>121</sub>" verwandt haben.

Bei Fortführung der Elution mit Wasser treten nach Fraktion 80 keine weiteren Substanzen aus. Es wird daher zweckmässig bei Fraktion 60–70 ein Puffer vom pH 4.0–4.1 aufgegeben, der dann mindestens 5 weitere Substanzen deutlich trennt (Fig. 1a-d). Als erster Gipfel tritt Pseudovitamin B<sub>12</sub> ( $\psi$ -B<sub>12</sub>, Adenin-Cobalamin-Analogon) aus, durch die chromatographischen Daten in Fig. 3d charakterisiert (GRAB<sup>10</sup>). Dahinter folgt der Kobaltgipfel Co, der sich von sämtlichen anderen Gipfeln dadurch unterscheidet, dass er nicht wie die Cobalamin durch Phenole ausgeschüttelt werden kann\*\*. Zwischen dem  $\psi$ -B<sub>12</sub> und dem Co ist in den Chromatogrammen a–c (Fig. 1) ein schwacher Gipfel erkennbar, der jedoch wegen Substanzmangel bisher nicht näher untersucht werden konnte. Bei Verwendung eines Puffers vom pH 4.10 und mehr wird dieser Gipfel durch das Kobalt überdeckt, das seinerseits dann gut vom folgenden Gipfel Faktor A (2-Methyladenin-Cobalamin-Analogon) getrennt wird. Die PC- und EP-Daten für den Faktor A in Fig. 3e decken sich wiederum völlig mit den in der Literatur angegebenen (GRAB<sup>10</sup>). Nach dem Faktor A tritt der Faktor B aus, erkenntlich an der violett-gelblichen Färbung des Eluates durch die mitaufgegebene Kontrollsubstanz. Die Radioaktivitätskurve zeigt an dieser Stelle nur einen sehr schwachen Anstieg. Offenbar ist der Faktor B im Caecum des Huhnes nicht stark vertreten, was wir auch in einem zweidimensionalen Papierchromatogramm bestätigt fanden (Fig. 4). Dafür ist ein dem Faktor B nahe stehendes Cobalamin im Gipfel P stärker vertreten. Die zusätzliche PC- und EP-Analyse (Fig. 3f) ergibt identisches Verhalten bei pH 2.7, aber unterschiedliche Wanderung in allen anderen Systemen. Die  $R_{B_{12}}$ -Werte und EP-Beweglichkeiten der Substanz im Gipfel P sprechen für eine Identität mit dem von DELLWEG *et al.*<sup>11</sup> beschriebenen Faktor V<sub>1</sub>, der als eine Faktor B-Monocarbonsäure erkannt wurde. In der Fig. 3f ist auch eine geringe Schwärzung in den Positionen des Faktors B erkennbar, der in diesem Chromatogramm offenbar in den Gipfel P hineinragt.

Bei Verwendung von Puffern mit höheren pH-Werten als 4.1 fließt der Gipfel P eher aus, sodass er bei pH 4.5 zwischen dem Faktor A und dem Faktor B erscheint (Fig. 1f). Das Kobalt läuft bei dieser Einstellung vor dem Pseudovitamin aus. Die Lage der Gipfel wird ausser durch den pH von der CN<sup>-</sup>-Konzentration beeinflusst:

\* PC = Papierchromatographie, EP = Elektrophorese.

\*\* Siehe Fussnote\*, S. 90.

Wie das Chromatogramm in Fig. 1g zeigt, laufen die Gipfel nach Herabsetzen des CN<sup>-</sup>-Gehaltes von 0.02 auf 0.01 % deutlich langsamer und die Gipfel FB und P treten erst nach Aufgabe von Puffern mit höherem pH aus. In einigen Darminhalts-

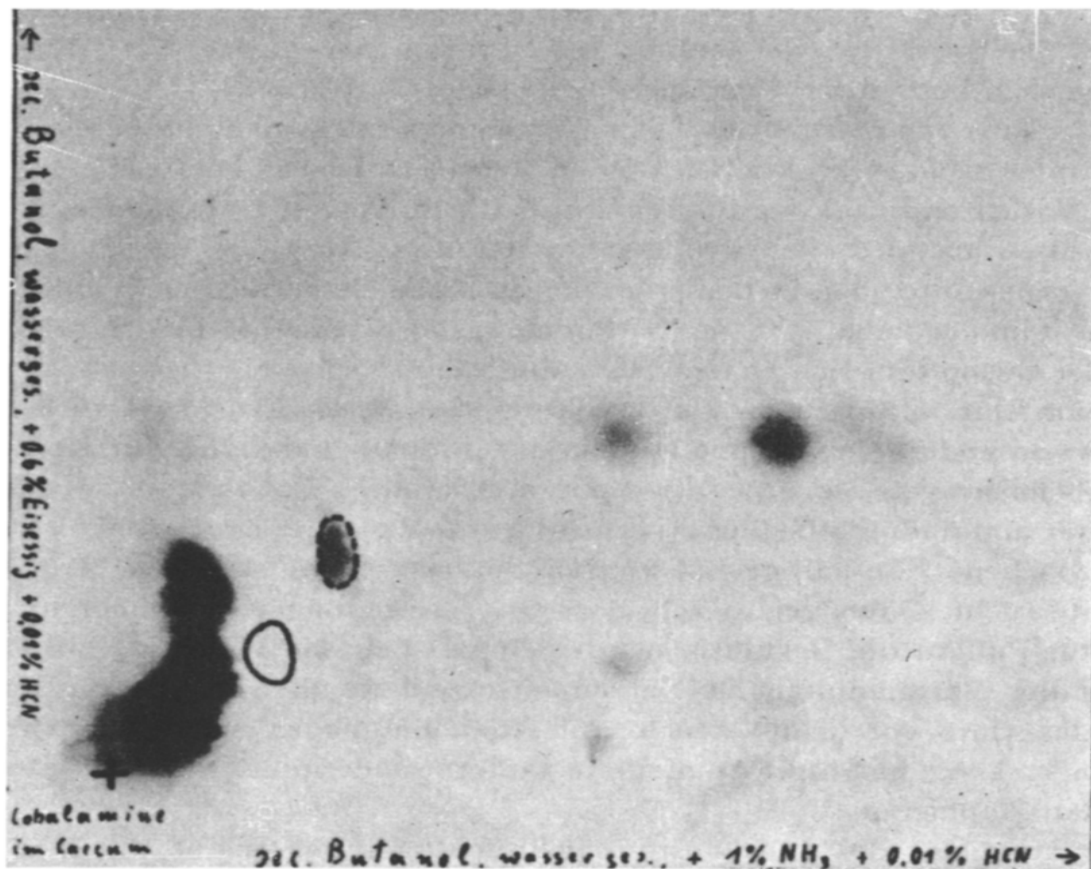


Fig. 4. Zweidimensionales Papierchromatogramm und Autoradiogramm eines Cobalaminextraktes aus dem Caecum. ——— = Position des Cyanocobalamins; - - - - = Position des Faktors B.

Proben, insbesondere bei erwachsenen Hühnern, erscheinen auch nach dem Gipfel P mit Puffern vom pH 5.0, 6.0 oder 7.0 noch weitere Substanzen. Der Gipfel Q (Fig. 2a) tritt häufig im Kot, aber auch im Inhalt des Dünndarms auf<sup>5</sup>, was daraufhin deutet, dass es sich hierbei um eine Vorstufe bei der Cobalaminsynthese handelt. Wegen der geringen Aktivität konnten jedoch bei diesem und bei den folgenden Gipfeln R und S noch keine zusätzlichen chromatographischen Daten gewonnen werden. Der mit pH 7.0 eluierte Gipfel T (Fig. 2a) lässt auf Grund der in Fig. 3g wiedergegebenen Daten eine Identität mit dem Faktor E (Faktor B-Phosphoribose, DELLWEG *et al.*<sup>12</sup>) (s.a. PORTER<sup>13</sup>) vermuten. Eine endgültige Identifizierung ist jedoch hier wie in den zuvor beschriebenen Fällen erst nach Gewinnung sichtbarer, inaktiver Substanzmengen möglich, zumal in der Literatur einige der hier angegebenen elektrophoretischen Daten (pH 8.0 und 10.4) für identifizierte Cobalamine noch fehlen.

Da die Chromatogramme in Fig. 1 a–g aus der gleichen Substanz erstellt wurden,

lässt sich die Reproduzierbarkeit der Trennung und der Ausbeuten ablesen. Die Lage des  $B_{12}$ - und  $B_{12i}$ -Gipfels ist überraschend konstant, wenn man die methodischen Schwierigkeiten bei der Einstellung des Harzes mit Ammoniumionen berücksichtigt. Die Ausbeuten an  $B_{12i}$  weisen mit einer Fehlerbreite von etwa 1%, ebenfalls eine gute Konstanz auf. Auch bei den mit Puffern eluierten Gipfeln sind grössere Schwankungen in den zwischen zwei senkrechten Strichen gemessenen Aktivitäten selten und lassen sich dann durch Überlagerung der Gipfel erklären.

Bei Aufgabe von markiertem Cyanocobalamin fanden wir immer 95% und mehr in dem Gipfel nach 45 Fraktionen wieder, wenn das Eluens kein  $CN^-$  enthielt und das Harz vorher entlüftet wurde. Bei  $CN^-$ -haltigem Wasser treten nur etwa 65% in dieser Position aus, der Rest wird später mit Puffern, bzw. 0,2  $N-NH_3$  Lsg. eluiert. Offenbar liegen unter den in der präparierten Säule herrschenden Bedingungen bei  $CN^-$ -Zusatz immer noch 65% des Vitamins in der Hydroxiform vor, während der Rest in der Cyaniform sich an der Säule abweichend verhält.

Bei der Elution mit Puffern ist wiederum ein  $CN^-$ -Zusatz unerlässlich, da sonst Faktor B und andere Cobalamine in mehreren Fronten wandern<sup>4</sup>. Zur Kontrolle auf eine mögliche irreversible Adsorption der unbekanntem Cobalamine an den Ionenaustauscher und dadurch bedingte Verluste wurde das Harz nach jedem Versuch auf darin verbliebene  $^{60}Co$ -haltige Substanzen durch Messung mit dem Szintillationszähler untersucht. Dabei zeigte sich, dass bei Verwendung von Ammoniumformiat- und -azetat-Puffern die Restaktivität des Harzes bei jedem Versuch um etwa 2% stieg, bei der Verwendung von Natriumcitratpuffern aber völlig konstant blieb. Obwohl das Harz vor dem Versuch mit Ammoniumionen eingestellt wird, ist es daher zweckmässig, nicht mit Ammonium-Puffern sondern mit Natrium als Gegenion zu chromatographieren.

Den Abschluss des Ionenaustauschchromatogramms bildet die Elution mit 1  $N-NH_3$ -Lösung + 0,02%  $KCN$ , die das Harz von den adsorbierten Braunstoffen befreit. Mit dieser Fraktion sollen, wenn möglich, keine Cobalamine mehr eluiert werden, da diese stark verunreinigt sein würden.

Das Ionenaustauschverfahren lässt sich auch für präparative Zwecke verwenden. An einer 1 m langen Säule von 30 mm innerem Durchmesser konnten wir das Dialysat von 1 kg Caecum-Inhalt in einem Gang auftrennen.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Es wird ein Verfahren zur Auftrennung von Cobalaminen am Kationenaustauschern vom Typ Dowex-50X<sub>4</sub> beschrieben, mit dessen Hilfe mindestens 12  $^{60}Co$ -markierte Substanzen aus dem Inhalt der Caeca des Huhns und des Kükens isoliert werden konnten. Auf Grund zusätzlicher papierchromatographischer und elektrophoretischer Analysen liessen sich 7 dieser Substanzen näher charakterisieren und z.T. bekannten Analogen zuordnen: Faktor A, Pseudovitamin  $B_{12}$ , Faktor B, Faktor  $V_{12}$ , und eine dem Cyanocobalamin sehr nahe stehende, bisher nicht identifizierte Verbindung.

## SUMMARY

A method is described for the separation of cobalamines on cation exchangers of the type Dowex-50X4. With this method it was possible to isolate at least twelve <sup>60</sup>Co-labelled compounds from the caeca of hens and chickens. By means of subsequent paper chromatographic and paper electrophoretic analyses, seven of these compounds could be further characterized and in some cases related to known analogues: factor A, pseudovitamin B<sub>12</sub>, factor B, factor V<sub>1</sub>, and a compound very similar to cyano-cobalamine that has hitherto not been identified.

## LITERATUR

- <sup>1</sup> W. FRIEDRICH UND K. BERNHAUER, *Z. Naturforsch.*, 10b (1955) 6.
- <sup>2</sup> J. PAWELKIEWICZ, W. WALERYCH, W. FRIEDRICH UND K. BERNHAUER, *J. Chromatog.*, 3 (1960) 359.
- <sup>3</sup> K. H. MENKE, *Naturwiss.*, 45 (1958) 263.
- <sup>4</sup> K. H. MENKE, *Landwirtsch. Forsch.*, 12, Sonderheft (1959) 133.
- <sup>5</sup> K. H. MENKE, *Habil.-Schrift*, Bonn, 1960.
- <sup>6</sup> W. FRIEDRICH UND K. BERNHAUER, *Z. Naturforsch.*, 9b (1954) 755.
- <sup>7</sup> W. FRIEDRICH UND K. BERNHAUER, *Chem. Ber.*, 89 (1956) 2507.
- <sup>8</sup> W. FRIEDRICH UND K. BERNHAUER, *Chem. Ber.*, 90 (1957) 154.
- <sup>9</sup> K. H. MENKE, *Arch. Geflügelkd.*, 24 (1960) 137.
- <sup>10</sup> W. GRAB, in HOPPE-SEYLER/THIERFELDER, *Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse*, Springer-Verlag, 10. Aufl., Band IV/2, 1960, S. 1511.
- <sup>11</sup> H. DELLWEG, E. BECHER UND K. BERNHAUER, *Biochem. Z.*, 328 (1956) 81.
- <sup>12</sup> H. DELLWEG UND K. BERNHAUER, *Arch. Biochem. Biophys.*, 60 (1957) 74.
- <sup>13</sup> J. W. G. PORTER, in H. C. HEINRICH, *Vitamin B<sub>12</sub> und Intrinsic Faktor*, Enke-Verlag, Stuttgart, 1957, S. 43.

*J. Chromatog.*, 7 (1962) 86-97