

DIE TRENNUNG NEUTRALER UND BASISCHER COBALAMINE AN IONENAUSTAUSCHERPAPIEREN

R. HÜTTENRAUCH UND L. KLOTZ

Wissenschaftliche Laboratorien des VEB Jenapharm, Jena (DDR)

(Eingegangen den 19. Februar 1963)

Für die Trennung von wasserlöslichen Vitaminen sind mit gutem Erfolg Ionenaustauscherpapiere eingesetzt worden¹. Analog zu den an Säulen gefundenen Bedingungen² waren auch für die Papierchromatographie schwach saure Ionenaustauscherharze am besten geeignet. Anschliessend verwerteten wir unsere Ergebnisse zur Analyse kompletter Vitamin-B₁₂-Arten. Die Ladungsunterschiede zwischen neutralen und basischen Cobalaminen liessen dabei ausgeprägte Trenneffekte erwarten.

Neben Cyanocobalamin hat in der letzten Zeit das positiv geladene Aquocobalamin (= Vitamin B_{12b}) medizinische und pharmazeutische Bedeutung erlangt^{3,4}. Eine rasche und sichere Identifizierung und Differenzierung beider Cobalamine sollte erreicht werden, die auch den Nachweis gegenseitiger Verunreinigung ermöglichte. Wir verwendeten dafür Amberlite-Ionenaustauscherpapiere*.

METHODIK

Die Papiere wurden vor ihrem Einsatz besonders präpariert, die Austauschharze wurden mit bestimmten Gegenionen beladen bzw. auf bestimmte pH-Werte eingestellt. Bei Kationenaustauscherpapieren (SA und WA) erfolgte die Behandlung mit *N* Salzsäure oder *N* Natriumchloridlösung, bei Anionenaustauscherpapieren (SB und WB) mit *N* Natronlauge bzw. *M* Lösungen verschiedener Säuren. Als Puffer dienten Acetat-Pufferlösungen von pH 3,5–6,0.

Zum Beladen bzw. Puffern wurden die Papierstreifen 60 Min. in die Lösungen eingelegt; bei längerer Behandlungszeit beobachteten wir eine Beeinträchtigung der Cobalamintrennung und sogenannte Schwanzbildung. Die feuchten Papiere wurden über Nacht (an der Luft bei Zimmertemperatur) getrocknet und am nächsten Tag verwendet. Am Startpunkt wurden 1–3 µg Cyanocobalamin und/oder Aquocobalamin aufgetragen (Lösungen mit 50 µg/ml). Die Chromatographie erfolgte absteigend, in abgedeckten Glasgefässen unter Lichtschutz. Als Laufmittel verwendeten wir Wasser oder ein Gemisch aus Dioxan–*N* Salzsäure–Wasser. Die Laufstrecke der Lösungsmittelfront betrug 20–25 cm.

Eine Entwicklung der Papiere konnte durch die Eigenfärbung der Verbindungen gut verfolgt werden. Nach dem Trocknen an der Luft eignete sich auch die Auswertung im U.V.-Licht. Dabei konnten selbst die im sichtbaren Licht nicht mehr wahrnehmbaren Flecke noch gut erkannt werden. Häufig wurden ausserdem, besonders beim

* Dem Serva-Entwicklungslabor, Heidelberg danken wir für die freundliche Überlassung einiger Muster.

Vorliegen von Aquocobalamin, am Startpunkt stark fluoreszierende Flecke festgestellt. Die Natur und Herkunft dieser Begleitsubstanzen blieb uns unbekannt. Ein anderer bemerkenswerter Befund bestand darin, dass Cyanocobalamin bei der Chromatographie häufig in zwei parallellaufende Flecke aufspaltete. Auch für dieses Ergebnis haben wir noch keine befriedigende Erklärung gefunden. Bekanntlich wird diese Erscheinung in der allgemeinen Papierchromatographie nicht beobachtet.

Die quantitative Auswertung der Trennungen haben wir wie folgt vorgenommen: Die Papiere wurden auf pH 4.6 oder 6.0 gepuffert. Von einer wässrigen Lösung wurde ein genau gemessenes Volumen, das etwa je 100 μg Cyano- und Aquocobalamin enthielt, aufgetragen. Die Chromatographie erfolgte mit Wasser oder Dioxan-Salzsäure-Wasser als Laufmittel. Nach der Trennung wurden die Flecke ausgeschnitten und dreimal mit einer Lösung von 7.5 g Natriumchlorid in 100 ml Aceton-Wasser-Gemisch 1:1 eluiert; Aquocobalamin wurde zuvor durch Besprühen mit einer *M* Kaliumcyanid-Lösung in Cyanocobalamin übergeführt. Die vereinigten Eluate versetzten wir mit 1 ml *N* Essigsäure, um den für die Existenz des neutralen Cobalamins optimalen pH-Wert einzustellen, und ergänzten das Gesamtvolumen auf 10 ml.

Die Gehaltsbestimmung erfolgte spektrophotometrisch bei 361 $m\mu$ gegen das entsprechende Elutionsmittel. Für die Messungen wurde ein Universal-Spektrophotometer VSU 1 des VEB Carl Zeiss Jena verwendet.

ERGEBNISSE

Nach der angegebenen Methode wurden die Trenneffekte an verschiedenen Ionenaustauscherpapieren ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle I, II und III dargestellt.

DISKUSSION

Unsere Ergebnisse stimmen in den wesentlichen Punkten mit den an Ionenaustauschersäulen gewonnenen Aussagen⁵⁻⁸ überein.

Die eingesetzten Cobalamine werden durch Anionenaustauscherharze erwartungsgemäss nicht gebunden (Tabelle I). An stark sauren Kationenaustauscherpapieren treten andererseits Elutionsschwierigkeiten auf. Für die angestrebte Trennung eignen sich nur schwach saure Austauscherharze (Tabelle II, Fig. 2). Während aber bei der Säulenchromatographie die Harze vorwiegend in der H^+ -Form eingesetzt werden, erweist sich bei der Papierchromatographie eine Pufferung erforderlich. Die Trennwirkung des Papiers steigt mit dem pH-Wert des Puffers, wenn die bewegliche Phase lediglich aus Wasser besteht. Sie erreicht am Neutralpunkt ihr Optimum. Eine graphische Darstellung der Abhängigkeit zwischen R_F - und pH-Wert demonstriert (Fig. 1), dass sich die Kurve an den Grenzen des Stabilitätsgebietes von Cyanocobalamin⁹ dem R_F -Wert 0 bzw. 1 nähert. Sie erreicht den Wert 0 beim Übergang des neutralen in ein basisches Cobalamin, und sie steigt auf den Wert 1 bei der Ausbildung eines sauren Cobalamins.

In der Chromatographie an Ionenaustauscherpapieren kann reines Wasser als Laufmittel Verwendung finden. Diese Vereinfachung ermöglicht eine wesentlich günstigere Arbeitstechnik als sie an normalen Papieren mit zusammengesetzten organischen Lösungsmitteln üblich ist. Bei Benutzung von Laufmitteln aus mehreren Komponenten erhält man sehr unterschiedliche Ergebnisse. Erfolgt die Trennung mit

TABELLE I

TRENNUNGEN AN ANIONENAUSTAUSCHERPAPIEREN

Papier: Amberlite SB-2 (strong basic, Typ Amberlite IRA-400) bzw. Amberlite WB-2 (weak basic, Typ Amberlite IR-45). Laufmittel: Wasser.

Beladungsform	R_F	
	SB-2	WB-2
	CN-B ₁₂ und H ₂ O-B ₁₂	CN-B ₁₂ und H ₂ O-B ₁₂
OH ⁻	0.96	0.80
CH ₃ COO ⁻	0.96	0.94
BO ₃ ³⁻	0.92	0.83
Cl ⁻	0.96	0.92

TABELLE II

TRENNUNGEN AN KATIONENAUSTAUSCHERPAPIEREN

Papier: Amberlite WA-2 (weak acid, Typ Amberlite IRC-50).
Laufmittel: Dioxan-N Salzsäure-Wasser.

Mischungsverhältnis Dioxan-Salzsäure-Wasser	R_F			
	pH 4.6		pH 6.0	
	CN-B ₁₂	H ₂ O-B ₁₂	CN-B ₁₂	H ₂ O-B ₁₂
30: 5:65	0.68	0.27	0.91	0
30: 10:60	0.45	0.18	0.90	0.04
60: 10:30	0.78	0.39	0.93	0.20
80: 10:10	0.66	0.59	0.96	0.82

TABELLE III

QUANTITATIVE TRENNUNGEN

Papier: Amberlite WA-2.
Laufmittel: Wasser oder Dioxan-N Salzsäure-Wasser.

Pufferung pH	Laufmittel	μg eingesetzt		% gefunden	
		CN-B ₁₂	H ₂ O-B ₁₂	CN-B ₁₂	H ₂ O-B ₁₂
6.0	Wasser	100	100*	79.0	96.5
6.0	Wasser	156	123	83.1	79.5
6.0	Dioxan-Salzsäure-Wasser (3:1:6)	100	123	81.8	74.8
4.6	Wasser	156	123	86.2	70.4

* Aquo-cytobion.

einem Aceton-Wasser-Gemisch, so wird die Wanderungsgeschwindigkeit des Cyanocobalamins im Vergleich zu reinem Wasser auf ein Drittel herabgesetzt und Aquocobalamin verbleibt am Startpunkt. Der Zusatz von Neutralsalzen, Natriumacetat oder -cyanid, hat auf die Trennung keinen signifikanten Einfluss. In dem System Dioxan-Salzsäure-Wasser wandert jedoch auch das Aquocobalamin. Dabei kommt es

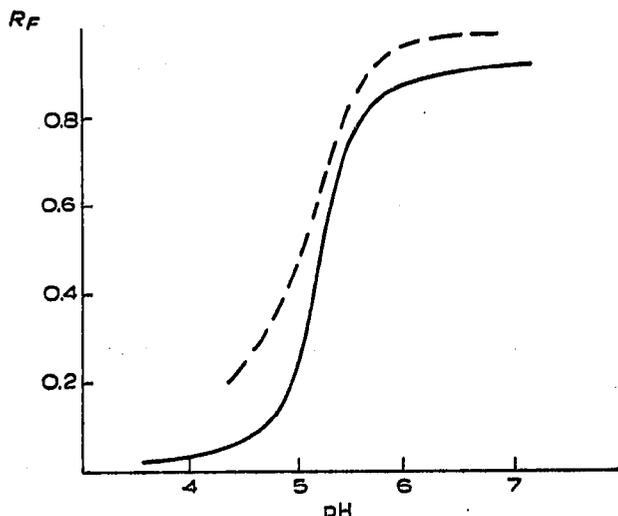


Fig. 1. Der Einfluss der Pufferung auf den R_F -Wert des Cyanocobalamins und Cobinamids bei der Chromatographie an Amberlite WA-2. — Cyanocobalamin (Wasser); - - - Cobinamid (Dioxan-N Salzsäure-Wasser, 3:1:6).

zu einer Auftrennung des Lösungsmittelgemisches während der Wanderung. Das Cyanocobalamin bewegt sich in der schwach sauren Komponente (pH 4.3), das Aquocobalamin dagegen an der scharf abgegrenzten Front einer sauren Phase (pH 2.0) (Fig. 2). Bei optimaler Pufferung des Papiers auf pH 6.0 stimmen daher die mit Wasser und die mit Dioxan-Salzsäure-Wasser erhaltenen R_F -Werte des Cyanocobalamins

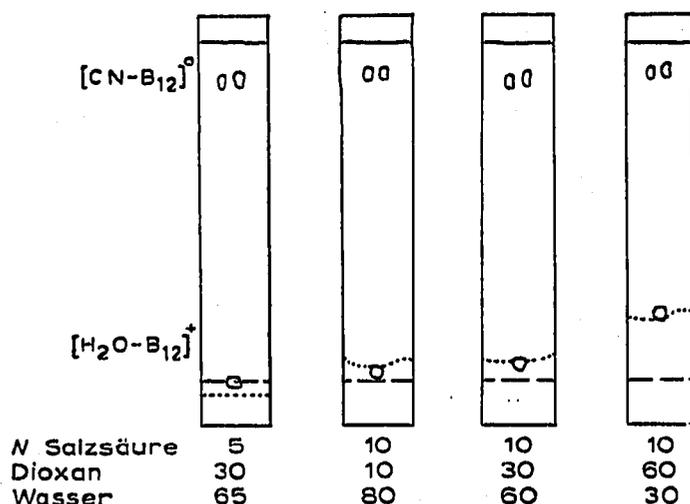


Fig. 2. Die Trennung von Aquo- und Cyanocobalamin an Amberlite WA-2 (Pufferung pH 6.0) unter Verwendung verschiedener Salzsäure-Dioxan-Wasser-Gemische als Laufmittel. - - - Startlinie; — Front der Lösungsmittelkomponente pH 4.3; - - - - Front der Lösungsmittelkomponente pH 2.0.

überein. Den schärfsten Trenneffekt erzielt man mit Papier vom pH 4.6 unter Verwendung eines Dioxan-Salzsäure-Wasser-Gemisches (3:1:6).

Grundsätzlich gleiches Verhalten wie Cyanocobalamin zeigt die inkomplette Vitamin-B₁₂-Art Cobinamid (= Ätiocobalamin, Faktor B, Faktor I). An einem schwach sauren Ionenaustauscherpapier liegen die R_F -Werte mit einem Dioxan-Salzsäure-Wasser-Gemisch höher als mit Wasser, sie steigen korrespondierend mit dem pH-Wert (Fig. 1).

Aus den Angaben über die quantitative Erfassung der getrennten Cobalamine geht hervor (Tabelle III), dass die Bestimmung noch unbefriedigende Ergebnisse liefert. Wie die allgemeine Papierchromatographie wird auch die Chromatographie an Ionenaustauscherpapieren in erster Linie als eine qualitative Methode einzuschätzen sein.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Trennung von Cyano- und Aquo- bzw. Hydroxocobalamin wurde an verschiedenen Ionenaustauscherpapieren und unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Die Ergebnisse einer qualitativen und quantitativen Methode werden mitgeteilt und diskutiert. Ähnliche Angaben liegen über das Verhalten von Cobinamid vor.

SUMMARY

The separation of cyano- and aquocobalamin on different ion-exchange papers using different conditions was investigated. The results of a qualitative and a quantitative method are described and discussed. Similar data are given for the behaviour of cobinamide.

LITERATUR

- ¹ R. HÜTTENRAUCH UND L. KLOTZ, *Experientia*, 19 (1963) 95.
- ² W. POETHKE UND L. KLOTZ, *Pharm. Zentralhalle*, in Vorbereitung.
- ³ H. C. HEINRICH, Vitamin B₁₂ und Intrinsic Faktor, 2. *Europäisches Symposium, Hamburg 1961, Stuttgart 1962*.
- ⁴ E. L. SMITH, J. L. MARTIN, R. J. GREGORY UND W. H. C. SHAW, *Analyst*, 87 (1962) 183.
- ⁵ M. M. MARSH UND N. R. KUZEL, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 1773.
- ⁶ K. H. MENKE, *Naturwissenschaften*, 45 (1958) 263.
- ⁷ P. J. VAN MELLE, *J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed.*, 45 (1956) 26.
- ⁸ M. M. SAKOTA, M. IWAKE, M. YAMAMOTO UND H. KOSAKA, *Vitamins (Kyoto)*, 9 (1955) 302; *C.A.* 50 (1956) 16033.
- ⁹ R. HÜTTENRAUCH UND A. DÖLL, *Pharm. Zentralhalle*, 101 (1962) 549.