

CHROM. 6404

## ELUTIONSCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNGEN VON CORRINOIDEN AN DEM UNPOLAREN ADSORBENZ AMBERLITE XAD-2

H. VOGELMANN UND F. WAGNER

*Gesellschaft für Molekularbiologische Forschung mbH, 3301 Stöckheim bei Braunschweig (B.R.D.)*

(Eingegangen am 25. Juli 1972; geänderte Fassung am 6. Oktober 1972)

---

### SUMMARY

*Separation of corrinoids by elution chromatography on columns of the non-polar adsorbent Amberlite XAD-2*

Corrinoids are separated by elution chromatography on columns of the non-polar adsorbent Amberlite XAD-2 (50 to 100  $\mu$ ) with high selectivity. The corrinoids are strongly adsorbed from aqueous solutions by hydrophobic intermolecular forces. After elution of inorganic substances and hydrophilic organic substances with water, the corrinoids are eluted with 3 to 20 vol% *tert.*-butanol or other solvent mixtures. The *R*-values increase with the hydrophilic properties and the concentration of the solvent and decrease with the hydrophobic properties of the corrinoids. The selectivity is nearly independent of the nature of the solvent, but is highest at low *R*-values. The chromatographic behaviour of fifty different corrinoids, including rhodibamides and hydrogenobamides, the influence of the C-8, C-10 and C-13 substituents, the axial ligands and the nucleotide are discussed in detail.

---

### EINLEITUNG

Die präparative Auftrennung neutraler Corrinoidoide wurde seither üblicherweise durch Verteilungschromatographie an Cellulose (Säulen oder Papier) durchgeführt (siehe dazu Literaturangaben in Lit. 1), deren Anwendung jedoch umständlich und begrenzt ist. Es fehlte eine einfache, möglichst universell anwendbare Methode, ähnlich der Auftrennung basischer und saurer Corrinoidoide durch Ionenaustauschchromatographie an Celluloseaustauschern, wie wir z.B. für Corrinoidcarbonsäure-Isomere in einer früheren Mitteilung<sup>2</sup> berichteten. Die Anwendung des unpolaren Adsorptionsmaterials Amberlite XAD-2 (Rohm & Haas Company, Philadelphia, Pa.) führt zu einer sehr selektiven elutionschromatographischen Methode zur präparativen Auftrennung von neutralen, sauren und basischen Corrinoiden durch Säulenchromatographie.

## METHODIK UND MATERIALIEN

Die Corrinoide wurden nach bereits beschriebenen Methoden dargestellt (siehe dazu Lit. 1 und 3 und Literaturangaben in den Tabellen). Cyanocobalamin, Aquocobalamin und Co-5'-Desoxyadenosyl-cobalamin wurden von Glaxo Laboratories Ltd., Greenford, Great Britain, bezogen. Die quantitative Bestimmung der Corrinoide erfolgte spektroskopisch in der Dicyanform. Die Bezeichnung der Corrinoide erfolgt nach Lit. 4; die Kurzbezeichnungen für Corrinoidecarbonsäure-Isomere sind in Lit. 2 näher beschrieben (siehe dazu Fig. 1).

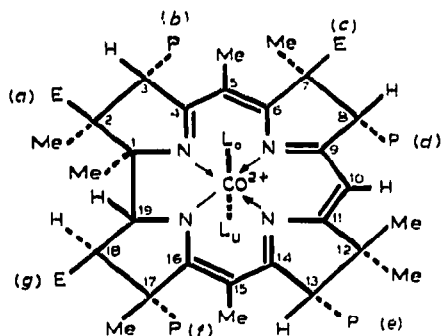


Fig. 1. Nomenklatur der Corrinoide (Beispiele). Cobyrinsäure: E = CH<sub>2</sub>-COOH, P = CH<sub>2</sub>·CH<sub>2</sub>-COOH; Aquocyanocobyrinsäure (Ligandenisomeres a) wie zuvor, aber L<sub>O</sub> = -OH<sub>2</sub>, L<sub>U</sub> = -CN; Cobinsäure: wie Cobyrinsäure, aber P in f = -CH<sub>2</sub>·CH<sub>2</sub>·NH·CH<sub>2</sub>·CH(OH)-CH<sub>3</sub>; Cobinamid: P in f wie bei Cobinsäure, P in b, d und e CH<sub>2</sub>·CH<sub>2</sub>-CONH<sub>2</sub>, E = -CH<sub>2</sub>-CONH<sub>2</sub>; Cobamid: wie Cobinamid, aber P in f = -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>·CO-NH·CH<sub>2</sub>·CH(CH<sub>3</sub>)-O-PO(OH)-O-3'-Ribofuranose; Cobamsäure: wie Cobyrinsäure, aber P in f wie bei Cobamid; Cobalamin: α-(5,6-Dimethylbenzimidazolyl)-cobamid (L<sub>U</sub> = N-3 von 5,6-Dimethylbenzimidazol. Cobalamin ist ein nucleotidhaltiges Corrinoide. Als nucleotidfreie Corrinoide werden die obengenannten Corrinoide bezeichnet); Co-5'-Desoxyadenosyl-cobalamin: wie Cobalamin, aber L<sub>O</sub> = 5'-Desoxyadenosyl.

Amberlite NAD-2, im folgenden als XAD-2 bezeichnet, wurde in den Korngrößen 0.3 bis 1.0 mm, 100 bis 200 μ, 50 bis 100 μ und 20 bis 40 μ von der Fa. Serva, Entwicklungslabor, Heidelberg, B.R.D., bezogen.

Vor Gebrauch wird XAD-2 in destilliertem Wasser aufgeschlämmt und auf einer Nutsche mit Wasser und anschließend mit Aceton gewaschen. Nach Trocknen bei 80° wird die Korngröße 50 bis 100 μ nochmals gesiebt, wobei die Korngröße 30 bis 50 μ erhalten wird (Anteil 20 bis 30%). Zum Herstellen des Säulenbettes wird eine wässrige Suspension (ca. 30% G/V) verwendet. Sämtliche Elutionsmittel (p.A.) werden entgast. Vor Gebrauch wird die Säule wie folgt gewaschen: 1 Bettvolumen entgastes Wasser, 1 Bettvolumen Wasser-*tert.*-Butanol-Essigsäure (50:50:2), 1 Bettvolumen Wasser (Durchflussrate bis 2 cm/min, entsprechend 2 ml/min·cm<sup>2</sup>). Die Corrinoide werden in wässriger Lösung aufgetragen; nach Elution mit 0.5 bis 3 Bettvolumen entgastem Wasser (Elution anorganischer Salze) werden die Corrinoide selektiv mit Wasser-*tert.*-Butanol mit Zusätzen an Phosphatpuffer, Essigsäure, Blausäure etc. eluiert (Durchflussrate 0.1 bis 0.3 cm/min). Zur Regeneration des Säulenbettes genügt es im allgemeinen, mit Wasser-*tert.*-Butanol-Essigsäure (50:50:2) zu waschen. Stark adsorbierte Substanzen biologischer Herkunft werden mit Methanol-Dichlormethan (1:1) oder 0.1 M Kaliumhydroxid in Methanol desorbiert.

Zur Bestimmung des chromatographischen Laufverhaltens der Corrinoiden wurden in der Regel mehrere verwandte Corrinoiden (je 0.1 bis 1 mg) und eine Standardsubstanz an derselben Säule (Whatman PC 1520) chromatographiert. Der Auftrag auf das mit einem Papierfilter abgedeckte Säulenbett ( $1.5 \times 10$  cm) erfolgte als Lösung in entgastem Wasser, in der Regel mit denselben Zusätzen wie im Eluent. Die longitudinale Breite der Auftragszone ist vom Auftragsvolumen (0.3 bis 3 ml) praktisch unabhängig, wenn das Säulenbett in Wasser aufgeschlämmt ist. Nach Waschen mit 8 ml entgastem Wasser (entsprechend 5 cm Säulenlänge) wird bei konstanter Durchflussrate von ca. 0.1 cm/min (entsprechend 0.1 ml/min·cm<sup>2</sup>) mit den angegebenen Eluenten bei Raumtemperatur entwickelt. Die *R*-Werte werden in der Regel durch Positionsindikation (s.u.) ermittelt. Bei *R*-Werten über 0.7 ergibt das beschriebene Verfahren ungenaue Werte, weshalb das Säulenbett vor Auftrag mit Eluent äquilibriert wird. Ausserdem wird das Auftragsvolumen auf < 0.1 ml reduziert und anschliessend sofort entwickelt.

Die Positionsindikation hat bei niedrigen *R*-Werten gegenüber der Eluatindikation den Vorteil des geringeren Zeitbedarfs und apparativen Aufwands. Die Bestimmung der *R*-Werte durch Positionsindikation erfolgte nach folgender Gleichung

$$R = \frac{\text{Wanderungsgeschwindigkeit der Substanz in cm/min}}{\text{Durchflussrate in cm/min (ml/min} \cdot \text{cm}^2\text{)}}$$

Dies entspricht dem Verhältnis der Wegstrecke der farbigen Substanzzonen (Zonenmitte) am Säulenbett und dem Absinken des Flüssigkeitsspiegels im adsorbensfreien Teil der Säule. Beide Verfahren wurden zur Bestimmung angewandt, doch sei darauf hingewiesen, dass der so definierte *R*-Wert dem Verhältnis von Säulenbettvolumen  $V_t$  und Elutionsvolumen  $V_E$  entspricht. Zur Diskussion der Selektivität ist es u.a. zweckmässig, das relative Laufverhalten einer Substanz zu einer Standardsubstanz durch  $R_r$ -Werte auszudrücken:

$$R_r = \frac{\text{Wanderungsstrecke der Substanz}}{\text{Wanderungsstrecke der Standardsubstanz}}$$

Die Bestimmung der Wanderungsstrecken konnte durch den geringen Substanzauftrag sehr genau aus der gemittelten longitudinalen Breite der symmetrischen Substanzzonen durchgeführt werden. Die kleinste Strecke, die zur Auswertung herangezogen wurde, betrug 2 cm, so dass die Ablesegenauigkeit  $\pm 5\%$  nicht überstieg.

## ERGEBNISSE

### *Adsorptionseigenschaften von Amberlite XAD-2*

Amberlite XAD-2 ist ein Styrol-divinylbenzol-Copolymer. Es adsorbiert Substanzen, wie Phenol oder Fettsäuren, durch ihre unpolaren Strukturanteile vor allem durch Van-der-Waals-Kräfte mit der unpolaren Matrix, siehe dazu Lit. 5 und Literaturangaben in Lit. 6. Die Adsorption ist desto stärker, je polarer das Lösungsmittel ist, also sehr stark aus Wasser, noch stärker aus Elektrolytlösungen (z.B. 10% G/V NaCl). Organische Lösungsmittel verdrängen durch ihren unpolaren Strukturanteil die Substanzen vom Adsorbent. Methanol desorbiert in der Regel vollständig<sup>6</sup>. Die Adsorptionseigenschaften hängen sehr stark von der Anzahl und Art der in der Sub-

stanz enthaltenen polaren und unpolaren Gruppen ab. Phenol wird aus wässriger Lösung vollständig adsorbiert, nicht hingegen Natriumphenolat. Stark unpolare Substanzen wie  $\beta$ -Carotin<sup>7</sup> oder Cholesterin und andere Steroide werden auch noch aus Methanol fest adsorbiert und erst nach Zusatz von Dichlormethan selektiv desorbiert<sup>7,8</sup>. Für die Auftrennung der Corrinoiden vor allem aus biologischem Material kommt zustatten, dass Kohlehydrate, Aminosäuren, Peptide und viele Proteine<sup>6,7,9</sup> an Amberlite XAD-2 oder XAD-1<sup>0</sup> aus wässriger Lösung nur sehr schwach oder überhaupt nicht gebunden werden.

Die neutralen Corrinoiden wie Cyanocobalamin oder Dicyanocobinamid werden an Amberlite XAD-2 (50 bis 100  $\mu$ ) aus wässrigen anorganischen Elektrolytlösungen (Säuren, Basen, Salze) unabhängig vom pH-Wert fest adsorbiert. Ebenso werden die Corrinoiden aus wässrigen Lösungen (5% G/V) folgender organischer Stoffe adsorbiert: Carbonsäuren (z.B. Essigsäure, Apfelsäure, Citronensäure und ihren Salzen), aus Lösungen von Kohlenhydraten (z.B. Glucose, Mannit, Fructose, Saccharose), aus Lösungen von Aminosäuren und Proteinen (Albumin, Saccharase), sowie auch aus komplex zusammengesetzten Lösungen, wie z.B. Hefeextrakt oder Melasse. Nach Elution der anorganischen Elektrolyte und organischen Stoffe mit Wasser lassen sich die Corrinoiden mit einem Gradienten Wasser-*tert.*-Butanol selektiv nach ihren Strukturmerkmalen eluieren. Mit Wasser-*tert.*-Butanol-Eisessig (50:50:2) werden sämtliche Corrinoiden vollständig desorbiert. Hieraus ergibt sich eine neue Methode zur Isolierung von Corrinoiden aus chemischen und biologischen Ansätzen, welche gegenüber der seither üblichen Extraktion mit Phenol-Chloroform grosse Vorteile besitzt<sup>7</sup>.

Saure und basische Corrinoiden sind in ihrem Adsorptionsverhalten den neutralen Corrinoiden analog, jedoch haben Art und Anzahl der dissoziierten Gruppen und damit der pH-Wert starken Einfluss auf die Stärke der Adsorption. So wird z.B. die nucleotidhaltige Hexacarbonsäure, die durch hydrolytische Desamidierung aus Vitamin B<sub>12</sub> gebildet wird<sup>9</sup>, bei pH-Werten unter 3 stärker als Cobalamin adsorbiert, bei pH-Werten über 6.5 (dissoziierte Carboxylgruppen) weit schwächer, was sich schon durch eine breitere Auftragszone zu erkennen gibt.

#### *Einfluss des Eluent auf das Laufverhalten*

Organische Lösungsmittel desorbieren die Corrinoiden in der Regel vollständig, sofern sie eine ausreichende Löslichkeit in ihnen besitzen. Ihre Mischungen mit Wasser führen zu Adsorptionsgleichgewichten, die eine elutionschromatographische Trennung der Corrinoiden ermöglichen. Die eluotrope Reihe einiger organischer Stoffe zeigt Tabelle I. Die Konzentration des Lösungsmittels im Eluent wurde dabei stets so gewählt, dass der *R*-Wert von Dicyanocobinamid etwa 0.05 beträgt. Die Konzentration ist desto geringer zu wählen, je grösser der hydrophobe Anteil und je kleiner das Dipolmoment ist.

Ausserdem ist in Tabelle I der *R<sub>F</sub>*-Wert von 13-Epi-cobinamid aufgeführt, welches unter diesen Bedingungen stets etwa viermal schneller als Cobinamid wandert. Hierbei und an anderen Substanzpaaren zeigt sich, dass die Selektivität (*R<sub>F</sub>*-Wert) von der Art des verwendeten Lösungsmittels im Eluent nur sehr geringfügig abhängig ist, wenn der *R*-Wert der Bezugssubstanz dieselbe Grösse besitzt. Als Eluent für präparative Trennungen eignet sich vor allem *tert.*-Butanol, da hierbei ziemlich symmetrische und die schärfsten Zonen erhalten werden.

Die Abhängigkeit der hier interessierenden *R*-Werte bis 0.5 von der Konzen-

TABELLE I

ELUOTROPE REIHE EINIGER LÖSUNGSMITTEL/WASSER-GEMISCHE

Säule: Amberlite XAD-2; Eluent mit 0.001% Blausäure  $R_f$  von Dicyano-1,3-epi-cobinamid ist auf Dicyanocobinamid bezogen.

	Vol. %	$R$ von Cobinamid	$R_f$ von 1,3-Epi-cobinamid
Glycerin	40	0.02	—
Formamid	40	0.04	—
DMSO	35	0.04	4.30
Methanol	20	0.03	3.80
Aceton	7	0.08	4.00
Äthylmethyleketon	3	0.08	4.00
Dioxan	4	0.03	4.75
<i>tert.</i> -Butanol	3.5	0.05	4.40
Hexamethylphosphorsäuretriamid	1.0	0.03	5.25
Diäthylenglykoldiäthyläther	0.4	0.01	5.00
Cyclohexanol	0.3	0.02	—

tration an *tert.*-Butanol oder Methanol im Eluent zeigt Fig. 2 für Cyanocobalamin und Dicyanocobinamid. Die  $R$ -Werte zeigen jedoch an unterschiedlichen Säulen stärkere Abweichungen, wie sich auch in den folgenden Tabellen zeigt. Die letzten Untersuchungen zeigen, dass hierbei neben Korngröße, Packungsdichte und Charge vor allem an XAD-2 stark adsorbierte Verunreinigungen und Spuren hochmolekularer Stoffe im Lösungsmittel eine Rolle spielen, die noch näherer Untersuchungen bedürfen. Aus diesem Grunde ist es sinnvoller, die  $R_f$ -Werte zur Charakterisierung des Laufverhaltens heranzuziehen. Es zeigt sich, dass diese auch an unterschiedlichen Säulen gut reproduzierbar sind, wenn durch Korrektur der Konzentration an Lösungsmittel im Eluent stets dieselben  $R$ -Werte der Bezugssubstanz erreicht werden.

Ausserdem besteht zwischen den  $R_f$ -Werten (Selektivität) und den  $R$ -Werten eine überraschend einfache Beziehung, die für die praktische Anwendung der tabellierten Werte zehr nützlich ist. Es zeigt sich in Fig. 3, dass die  $R_f$ -Werte zwischen  $R$  von 0.1 bis 0.8 linear zunehmen. Hierüber wird an anderer Stelle ausführlicher berich-

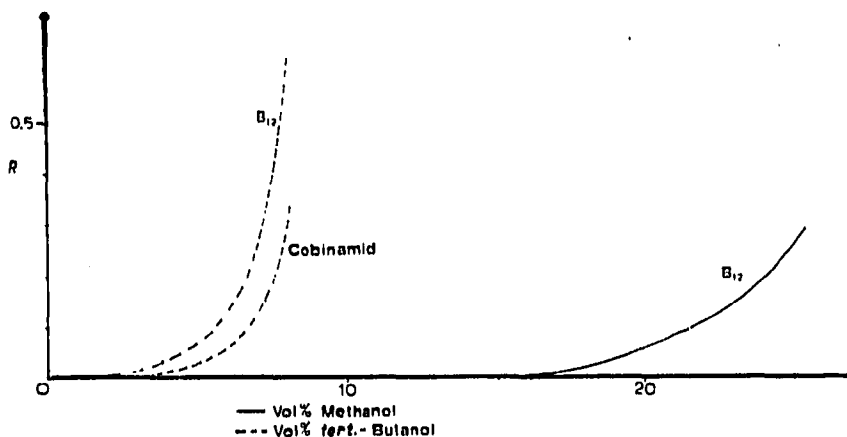


Fig. 2. Abhängigkeit der  $R$ -Werte von Cyanocobalamin ( $B_{12}$ ) und Dicyanocobinamid von der Konzentration an *tert.*-Butanol und Methanol im Eluent an Säulen von Amberlite XAD-2 (50–100  $\mu$ ).

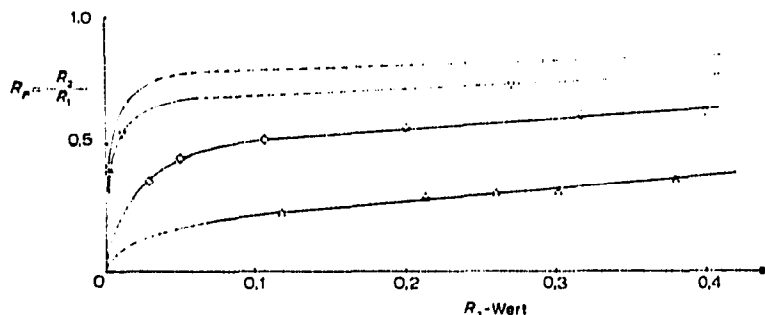


Fig. 3. Abhängigkeit der  $R_r$ -Werte (Selektivität) vom  $R$ -Wert anhand von vier Substanzpaaren. Hierbei ist

$$R_r = \frac{R_2 \text{ (langsam wandernde Substanz 2)}}{R_1 \text{ (schneller wandernde Substanz 1)}}$$

gegen  $R_0$  aufgetragen.  $\triangle-\triangle$ , 1 = Cyanocobalamin und 2 = Aquocobalamin;  $\diamond-\diamond$ , 1 = Cyanocobalamin und 2 = Cyano- $\alpha$ -guanyl-cobamid;  $\nabla-\nabla$ , 1 =  $B_{12}$ -Monocarbonsäure  $cMS_{1-e}$  und 2 =  $B_{12}$ -Monocarbonsäure  $cMS_{3-d}$ ;  $\circ-\circ$ , 1 =  $cMS_{3-d}$  und 2 =  $cMS_{1-e}$ . Für die ersten beiden Substanzpaare enthielt der Eluent *tert.*-Butanol und 0.5 Vol% Essigsäure, für das dritte Methanol und 1/15 M Phosphatpuffer pH 6.5 und für das vierte Methanol und 3% Essigsäure.

tet<sup>7</sup>. Bei  $R$ -Werten unter 0.05 ist eine starke Zunahme der Selektivität zu erkennen, wie aus Fig. 3 zu erkennen ist. Bei Substanzen mit sehr geringen Laufunterschieden kann deshalb eine Trennung bei  $R$ -Werten  $<0.05$  von Vorteil sein, doch wird dann die Trenndauer bereits sehr gross.

#### *Einfluss der Korngrösse*

Die Korngrösse von XAD-2 hat starken Einfluss auf die Zonenbreite. Die Korngrösse 0.3 bis 1.0 mm besitzt einen makroreticulären Bau, indem jedes Korn aus Microbeads besteht, deren Zwischenräume den porösen Bau mit enger Porengrösseverteilung von 85 bis 95 Å bedingen<sup>6</sup>. Diese Korngrösse ist zur Adsorption von Corrinoiden nur beschränkt geeignet, da sich an ihr die Adsorptionsgleichgewichte nur sehr langsam einstellen und die Adsorptionskapazität nur max. 5 bis 10%, bezogen auf die Korngrösse 100 bis 200  $\mu$ , beträgt. Eine selektive Elution gelingt überhaupt nicht. Dieselben Einschränkungen gelten auch für die bereits beschriebene Adsorption von Spuren von Vitamin  $B_{12}$  aus Seewasser an Amberlite XAD-1 (0.3 bis 1.0 mm<sup>6</sup>), welches XAD-2 strukturell ähnlich ist<sup>6</sup>.

An der Korngrösse 100 bis 200  $\mu$  oder 100 bis 125  $\mu$  stellen sich die Adsorptionsgleichgewichte rasch ein, die Adsorptionskapazität beträgt 10 mg für schwach bis 80 mg für stark adsorbierte Corrinoiden je ml Bettvolumen. Diese Korngrössen eignen sich vor allem zur Adsorption von Corrinoiden aus grossen Volumina, z.B. zur Abtrennung von Corrinoiden aus biologischem Material. Hierbei sind bei 50 cm langen Säulen ohne besonderen Aufwand noch Durchflussraten von bis zu 10 cm/min möglich. Bei der selektiven Elution treten jedoch auch bei geringen Durchflussraten relativ breite Zonen auf, so dass sich nur Corrinoiden mit  $R_r$ -Werten von  $>1.6$  trennen lassen.

An der Korngrösse 50 bis 100  $\mu$  werden noch wesentlich schärfere Zonen erhalten. Die maximale Durchflussrate an 50 cm langen Säulen beträgt ca. 0.5 cm/min. An den Korngrössen 30 bis 50  $\mu$  und 20 bis 40  $\mu$  sind die Zonen noch schärfer. Sie

eignen sich deshalb besonders für kleine präparative und analytische Säulen mit hoher Trennleistung. Bei richtig gewählten Trennungsbedingungen lassen sich noch Corrinoiden mit einem  $R_f$ -Wert von 1.15 trennen. Die  $R$ -Werte sind hierbei ca. 20% niedriger als bei 100 bis 200  $\mu$ . Die  $R_f$ -Werte sind zwischen 20 und 100  $\mu$  nur sehr geringfügig von der Korngrösse abhängig und bei 100 bis 200  $\mu$  etwas ungünstiger (s.u.).

An Amberlite XAD-1 und XAD-4, die strukturell XAD-2 ähnlich sind<sup>6</sup>, trennen sich die Corrinoiden prinzipiell wie an XAD-2 auf, wobei derselbe Einfluss der Korngrösse beobachtet wird. An den hydrophileren Kunstharzen Amberlite XAD-9 und XAD-11 (zur Struktur siehe Lit. 2) werden an den Korngrössen 50 bis 100  $\mu$  neutrale Corrinoiden in derselben Reihenfolge wie an XAD-2 aufgetrennt, weshalb ebenfalls überwiegend auf hydrophobe Adsorption geschlossen werden muss. Die Konzentration an *tert.*-Butanol im Eluent ist aber im Vergleich zu XAD-2 wesentlich geringer zu wählen.

#### *Chromatographisches Laufverhalten der Corrinoiden an XAD-2*

Die Corrinoiden werden zur Beschreibung ihres Laufverhaltens im wesentlichen in neutrale, saure und basische Corrinoiden eingeteilt. Dies ist zweckmässig, da komplex zusammengesetzte Gemische von Corrinoiden mit Vorteil und in einfacher Weise an Celluloseaustauschern (siehe dazu z.B. Lit. 2) in diese Gruppen vorgetrennt werden.

Das Laufverhalten wird in den folgenden Tabellen aus genannten Gründen meist durch  $R_f$ -Werte charakterisiert, die die Wanderungsgeschwindigkeit relativ zu einer Standardsubstanz ausdrücken, meist Cyanocobalamin oder Dicyanocobinamid. Durch die Angabe des  $R$ -Wertes der Standardsubstanz lassen sich jedoch sämtliche  $R$ -Werte berechnen. Die Untersuchungen beschränken sich auf  $R$ -Werte zwischen 0.05 und 0.5. Diese sind für die Substanztrennungen im allgemeinen am günstigsten, da mit sinkenden  $R$ -Werten die Selektivität (s.o.) zunimmt und der Zeitbedarf noch nicht zu hoch ist. Selbstverständlich können gut trennbare Corrinoiden auch bei höheren  $R$ -Werten eluiert werden.

Die Elutionsvolumina  $V_E$  (Gipfelwerte) berechnen sich definitionsgemäss aus den  $R$ -Werten nach  $R = (V_t/V_E)$ . Die durch Eluatindikation aus  $V_E$  und  $V_t$  berechneten  $R$ -Werte sind mit den durch Positionsindikation erhaltenen identisch. Diese Zusammenhänge sind im Elutionsdiagramm einer Trennung von Cobinamid und 13-Epi-cobinamid in Fig. 4 dargestellt. Hieraus wurde auch die theoretische Bodenhöhe HETP zu ca. 0.4 mm bestimmt, die jedoch erfahrungsgemäss von der Substanzmenge, Durchflussrate und dem  $R$ -Wert abhängt.

Es zeigt sich, dass bei Durchflussraten von 0.1 cm/min die schärfsten Zonen erhalten werden, doch sind 0.3 cm/min für die meisten Trennungen ausreichend (die  $R_f$ -Werte ändern sich mit der Durchflussrate nur geringfügig). Die in den folgenden Tabellen für Eluenten mit Methanol angegebenen  $R_f$ -Werte werden bei besserer Zonenschärfe auch mit *tert.*-Butanol erreicht, wenn die aus obigem abgeleitete Regel eingehalten wird, dass bei gleichem  $R$ -Wert der Bezugssubstanz stets etwa dieselben  $R_f$ -Werte erhalten werden.

Die  $R$ -Werte von Derivaten mit unterschiedlichen Substituenten wurden überwiegend an den Cyanocorrinoiden bestimmt, da bei chemischen und biologischen Ansätzen üblicherweise die nucleotidhaltigen Corrinoiden als Monocyanoformen und

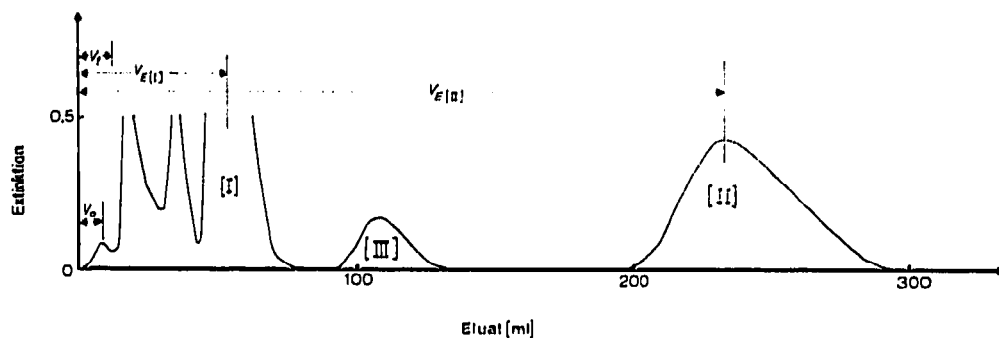


Fig. 4. Elutionsdiagramm einer Trennung von 1.0 mg Dicyano-1,3-epi-cobinamid (I), 1.2 mg Dicyano-cobinamid (II) und Corrinoiden unbekannter Struktur. Säulenbett (1,5 × 7,0 cm, Säule Whatman PC 1520); Amberlite XAD-2 (50–100  $\mu$ ); Eluent: 4.2 Vol. % *tert.*-Butanol + 0.0001% KCN in Wasser; Durchflussrate: 0.13 cm/min; Extinktion bei 280 nm mit Durchflussküvette (0.5 ml) gemessen.  $V_{E(I)}$  = Elutionsvolumen (Gipfelwert) der Substanz (I);  $V_t$  = Säulenbettvolumen (12.3 ml);  $V_0$  = freies Haltevolumen<sup>7</sup>. Die Berechnung des  $R$ -Wertes von (II) nach  $R = (V_t/V_{E(I)})$  (Eluatindikation) ergibt 0.053, der mit dem durch Positionsindikation ermittelten übereinstimmt. Der  $R_r$ -Wert für  $R_I/R_{II}$  nach  $R_r = (V_{E(II)})/V_{E(I)}$  berechnet ergibt 4.2 (Positionsindikation 4.1). Die Berechnung der theoretischen Bodenhöhe HETP erfolgte aus der Peakbreite  $\beta$  bei der Gipfelhöhe  $y/c$  nach der Gleichung  $HETP = [\text{Säulenlänge}/8 (V_E/\beta)^2]$ . Es ist für Substanz (II) mit  $R = 0.053$  die HETP = 0.39 mm und für die Substanz (III) mit  $R = 0.113$  die HETP = 0.41 mm.

## TABELLE II

## LAUFVERHALTEN EINIGER NUCLEOTIDHALTIGER CORRINOIDE UND CO-ALKYLCORRINOIDE

Säule: Amberlite XAD-2 (50 bis 100  $\mu$ ). Der Eluent enthält 0.5 Vol. % Essigsäure und ausser bei den Co-Alkyl- und Aquocorrinoiden 0.00001% Blausäure. Die  $R_r$ -Werte beziehen sich auf Cyanocobalamin und sind Mittelwerte aus drei bis vier Bestimmungen an verschiedenen Säulenbetten, die Abweichungen betragen hierbei max. 5%. Die angegebenen Literaturzitate verweisen auf die Darstellung. Zum Laufverhalten der Lactone, siehe Text.

	Methanol (Vol.%)				<i>tert.</i> -Butanol (Vol.%)	
	15	20	25	40	3.5	7
$R$ -Wert von Cyanocobalamin	0.03	0.05	0.2	0.8	0.05	0.7
$R_r$ -Werte von						
Cyano-10-chlor-cobalamin-8-hydroxy- <i>c</i> -lacton	—	0.09	—	—	—	—
Cyano-10-chlor-cobalamin	—	0.18	—	—	—	—
Cyano-10-brom-cobalamin	—	0.18	—	—	—	—
Cyano-10-nitro-cobalamin <sup>16,17</sup>	—	0.24	0.36	—	—	—
Cyano-cobalamin-8-hydroxy- <i>c</i> -lacton	—	0.33	—	—	—	—
Cyano-cobalamin-8-amino- <i>c</i> -lactam	0.82	—	—	—	—	—
Cyano- $\alpha$ -(2-methyladen-7-yl)-cobamid = Faktor A	1.75	—	—	—	—	—
Cyano- $\alpha$ -(aden-7-yl)-cobamid = $\psi$ -Vitamin B <sub>12</sub>	2.30	—	—	—	—	—
Cyano- $\alpha$ -(guan-7-yl)-cobamid	2.80	2.26	1.75	—	1.50	—
Cyano-1,3-epi-cobalamin <sup>10</sup>	—	2.60	—	—	2.40	—
Dto. aber 2' der Ribose verestert <sup>7</sup>	—	2.60	—	—	—	—
Co-Methylaquocobinamid	—	—	—	—	0.71	0.83
Aquocobalamin	—	2.20	—	—	5.20	1.35
Co-Desoxyadenosylcobalamin	—	—	—	0.62	—	0.58
Co-Methylcobalamin	—	—	—	0.28	—	0.22
Co-Cetylcobalamin <sup>16</sup>	—	—	—	<0.10	—	<0.10



die nucleotidfreien als Dicyanofornien in wässriger Lösung isoliert werden. Diese lassen sich meist nur in Gegenwart von Cyanid unzersetzt chromatographieren.

*Neutrale nucleotidhaltige Cyanocorrinoide.* Die Derivate von Cobalamin mit C-8 und C-10-Substituenten lassen sich überraschend gut abtrennen, wie die  $R_f$ -Werte in Tabelle II zeigen. So wandert z.B. 10-Nitro-cobalamin mit 25 Vol. % Methanol nur etwa 1/3 so schnell ( $R_f = 0.36$ ) wie die Bezugssubstanz Cobalamin, für die  $R = 0.2$  ist. 10-Chlor- und 10-Brom-cobalamin laufen noch langsamer und trennen sich von 10-Nitro-cobalamin gut ab. Allerdings trennen sie erstere wie bei Papierchromatographie nicht untereinander auf. Hingegen kann das seither von Cobalamin durch keine Methode trennbare Dehydrocobalamin nun an NAD-2 abgetrennt werden. Auffallend ist, dass 13-Epi-cobalamin (Propionsäureamidgruppe e nach "oben"<sup>10</sup>) wesentlich rascher als Cobalamin läuft. Das Laufverhalten neutraler Corrinoide ist vom pH-Wert und Art der zugesetzten Pufferlösungen nur geringfügig abhängig (s.u.).

*Neutrale nucleotidfreie Dicyanocorrinoide.* Der Einfluss von C-8 bzw. C-10-Substituenten auf das Laufverhalten ist in völliger Analogie zu den nucleotidhaltigen Cyanofornien wie Tabelle III zeigt. Die  $R$ -Werte sind jedoch erheblich niedriger, Dicyanocobinamid läuft etwa 2/3 langsamer als Cyanocobalamin. Die  $R$ - und  $R_f$ -Werte sind mit 0.5% Essigsäure (mit 0.0001% Cyanid) oder 1/150 M Phosphatpuffer pH 6.5 (mit 0.00001% Cyanid) im Eluent nahezu dieselben. Bei pH-Werten > 6 laufen die Lactone durch Öffnung des Lactonringes wie auch bei den nucleotidhaltigen Derivaten erheblich schneller. Die Auftragslösung und das Fließmittel enthalten zur Ausbildung der Dicyanocorrinoide stets Cyanid, andernfalls bilden sich während der Chromatographie langsam in Abhängigkeit vom pH die anderslaufenden Aquo-(Hydroxo)-formen aus. Höhere als die angegebenen Cyanidgehalte müssen bei gleichzeitiger Chromatographie der nucleotidhaltigen Corrinoide in der Monocyanofornie vermieden werden, da letztere sonst in die wesentlich langsamer laufenden Dicyanofornien überführt werden, wie der  $R_f$ -Wert von Dicyanocobalamin (Cyanidgehalt 0.01%) in Tabelle III zeigt (siehe dazu auch DISKUSSION).

*Co-Alkylcorrinoide.* Den Einfluss der axialen Liganden auf das Laufverhalten zeigt Tabelle II. Die Wanderungsgeschwindigkeit nimmt in folgender Reihenfolge zu: Co-Cetyl-, Co-Methyl-, Co-Desoxyadenosyl-, Cyano- und Aquocobalamin. Die Reihenfolge entspricht dem hydrophoben Charakter der Liganden. Die nucleotidfreien Co-Alkylaquocorrinoide wandern stets wesentlich schneller als die entsprechenden nucleotidhaltigen Derivate, wie z.B. der Vergleich Methylaquocobinamid und Methylcobalamin zeigt. Der Zusatz von 0.5% Essigsäure zum Eluent hat auf die  $R$ -Werte keinen merklichen Einfluss, verhindert aber, dass Aquocobalamin und auch Methylaquocobinamid in die anderslaufenden Hydroxoformen umgewandelt werden (s.u.). Bei Chromatographie der Co-Alkyl- und Aquocorrinoide muss jeder Cyanidzusatz unterbleiben und bei stark gedämpftem Licht gearbeitet werden.

*Basische nucleotidhaltige Corrinoide.* Die Corrinoide mit Purinen im Basenanteil wandern sämtlich schneller als Cobalamin, da 5,6-Dimethylbenzimidazol durch die fehlenden Stickstoffatome und die zusätzlichen Methylgruppen einen hydrophoberen Charakter als Adenin (Basenanteil im  $\psi$ -Vitamin B<sub>12</sub>) besitzt, siehe Tabelle II. Eine zusätzliche Methylgruppe im Adenin (Faktor A) oder Hydroxylgruppe (Guanylcobamid) verringert bzw. erhöht die  $R_f$ -Werte. Während durch Zusatz von 0.5% Essigsäure zum Eluent die  $R_f$ -Werte nur geringfügig verändert werden, sind bei pH-Werten unter 2.5 (z.B. mit 6% Essigsäure) die  $R_f$ -Werte aller drei Basenanalogen

TABELLE III

## LAUFVERHALTEN NEUTRALER NUCLEOTIDFREIER DICYANOCORRINOIDE

Säule: Amberlite XAD-2 (50 bis 100  $\mu$ ). Die  $R_F$ -Werte beziehen sich auf Dicyanocobinamid. Der Cyanidgehalt (Blausäure oder KCN) beträgt 0,00001%, bei Dicyanocobalamin 0,01%. Die  $R_F$ -Werte werden durch Zusatz von 1/150 M Phosphatpuffer oder 0,5% Essigsäure nicht beeinflusst. Zum Laufverhalten der Lactone siehe Text.

	Methanol (Vol.%)		tert.-Butanol (Vol.%)		
	20	25	3.5	4.5	7
$R_F$ -Wert von Dicyanocobinamid	0,02	0,07	0,03	0,06	0,46
$R_F$ -Werte von					
Dicyano-cobalamin (Vitamin B <sub>12</sub> )	0,09	—	—	—	0,16
Dicyano-10-chlor-cobinamid-8-hydroxy- <i>c</i> -lacton <sup>a</sup>	0,07	—	—	—	—
Dicyano-10-chlor-cobinamid	0,13	0,29	—	0,29	0,35
Dicyano-10-brom-cobinamid	—	0,29	—	0,29	—
Dicyano-10-jod-cobinamid	—	0,29	—	0,29	—
Dicyano-10-nitro-cobinamid <sup>b</sup>	0,19	0,38	—	0,39	—
Dicyano-cobinamid-8-hydroxy- <i>c</i> -lacton <sup>a</sup>	0,38	—	—	—	—
Dicyano-10-nitro-13-epi-cobinamid <sup>d</sup>	—	1,60	—	—	—
Dicyano-13-epi-cobinamid <sup>10</sup>	3,80 <sup>b</sup>	3,80	4,40	3,80 <sup>c</sup>	1,90
Cyanocobalamin (zum Vergleich)	—	2,80	3,00	2,75	1,60

<sup>a</sup> Laufmittel enthält 0,5% Essigsäure und 0,01% KCN. Die Lactone haben mit 1/150 M Phosphatpuffer pH 8 im Eluent einen  $R_F$ -Wert von ca. 4,0.

<sup>b</sup>  $R_F$ -Wert an der Korngrösse 100 bis 200  $\mu$  ist 3,10.

<sup>c</sup>  $R_F$ -Wert an der Korngrösse 100 bis 200  $\mu$  ist 2,70.

<sup>d</sup> Darstellung nach Lit. 16 aus 13-Epi-cobinamid, da 10-Nitro-cobinamid wie auch 10-Nitro-13-epi-cobinamid in starken Säuren nach Lit. 10 zu keinem Gleichgewicht zwischen beiden führt<sup>7</sup>.

2,8 bis 3,0. Das elektrophoretische Laufverhalten dieser Corrinoide zeigt, dass in neutraler Lösung die Aminogruppen dieser Basen in nichtprotonierter Form und in 3% Essigsäure (pH 2,7) Guanyl-(elektroneutral), Adenyl-(1/3 positive Ladung) und Methyladenylcobamid (2/3 positive Ladung) entsprechend der Basenstärke protoniert vorliegen. Da Ammoniumgruppen stärker hydrophil als Aminogruppen sind, wird das am stärksten basische Methyladenylcobamid im Fließmittel pH 2,7 stärker beschleunigt als Adenylcobamid und das nichtprotonierte Guanylcobamid überhaupt nicht. Wie schon an der Farbe der Substanzzonen erkenntlich ist, bleibt auch in saurer Lösung das Nucleotid stets koordiniert, während es z.B. bei Co-Methylcobalamin durch Protonierung am Imidazolring ausschwenkt (siehe DISKUSSION).

*Aquo-(Hydroxo-)Corrinoide.* Der Einfluss der Liganden auf das Laufverhalten von Cobinamid zeigt Tabelle IV. Die Wanderungsgeschwindigkeit der nucleotidfreien Corrinoide nimmt in folgender Reihenfolge zu: Hydroxocyno- (elektroneutral), Dicyano- (elektroneutral), Aquocyno- (einfach positiv geladen) und Diaquo- (zweifach positiv geladen). Die Aquoformen sind bei Adsorption nur in saurer Lösung beständig, bei pH-Werten > 6 werden sie in reversibler Reaktion als Hydroxoformen adsorbiert, wie folgende Ergebnisse zeigen: Aquocyanocobinamid wurde in 1/150 M Phosphatpuffer pH 6,5 und in 0,5% Essigsäure (ohne Cyanid) auf eine Säule mit XAD-2 aufgetragen. Nach Waschen mit Wasser wanderte beim Entwickeln mit Wasser-tert.-Butanol (ohne Zusätze) die aus saurer Lösung aufgetragene Substanz wesentlich rascher. Das gleiche Ergebnis wurde erhalten, wenn unabhängig vom pH

TABELLE IV

*R*-WERTE VON COBINAMID IN ABHÄNGIGKEIT VON DEN LIGANDEN

Säule: Amberlite XAD-2 (50 bis 100  $\mu$ ), Zusätze zum Eluent: P = 1/150 M Phosphatpuffer pH 6,5, A = 0,5% Essigsäure. Die Bestimmungen wurden am selben Säulenbett durchgeführt. Formen *a* und *b* sind Koordinations-Isomere (siehe Text).

		Zusätze zum Eluent	<i>tert.</i> -Butanol (Vol.%)	
			3:5	7
Dicyanocobinamid		P oder A	0,10	0,50
Hydroxocyanocobinamid	Form <i>a</i>	P	—	0,13
	Form <i>b</i>	P	—	0,23
Aquoocyanocobinamid	Form <i>a</i>	A	0,42	—
	Form <i>b</i>	A	0,75	—
Methyloquoocobinamid		A	0,15	—
Diaquoocobinamid		A	0,75	—
Sulfonatoaquoocobinamid		A	0,90	—

der Auftragslösung (geprüft pH 1 bis 10) dem Eluent Essigsäure oder Phosphatpuffer zugesetzt wurde. Während die zusätzliche Aufspaltung in jeweils zwei Zonen durch das Vorliegen von Koordinations-Isomeren (s.u.) bedingt ist, müssen sich die schnell und langsam wandernden Zonen durch den Liganden selbst unterscheiden. Während in wässriger Lösung die Hydroxocyanofom erst bei pH > 11 ausgebildet wird, werden bei Adsorption bei pH 6,5 die Aquoocyanofom vollständig in die Hydroxofom umgewandelt. Methyloquoocobinamid, Diaquoocobinamid und Aquocobalamin verhalten sich ähnlich. Das eigenartige Adsorptions- und Laufverhalten der Hydroxocorrinoide ist bis jetzt ohne Erklärung.

Ohne Zusatz von Essigsäure oder anderen Säuren im Eluent wandeln sich die Aquofom langsam in die Hydroxofom um, besonders rasch das stärker basische Methyloquoocobinamid. Bei längerer Chromatographie der Hydroxofom mit Fließmitteln ohne Zusätze wird stets ein Teil "irreversibel" adsorbiert und die Substanz zonen verschmieren auf der Säule. Wenn Aquoocyanocobinamid oder Aquocobalamin aus Wasser an XAD-2 adsorbiert werden und die Elution erst nach 12 Std. begonnen wird, so wandert nur ein Teil der Substanz. Der restliche Teil wandert auch mit Wasser-*tert.*-Butanol (50:50) nur teilweise, eine vollständige Desorption erfolgt erst nach Zusatz von Essigsäure. Die Chromatographie von Hydroxocyanocobinamid gelingt hingegen ohne diese störenden Effekte bei Zusatz von 1/15 bis 1/150 M Phosphatpuffer pH 6,5.

*Nucleotidhaltige Corrinoidecarbonsäuren.* Das Laufverhalten der sich vom Cobalamin ableitenden Mono-bis Pentacarbonensäuren<sup>2</sup> zeigt Tabelle V. Die Reihenfolge der Auftrennung entspricht der Zahl der Carboxylgruppen. In Fließmitteln pH 6 bis 8 läuft Cyanocobalamin am langsamsten, schneller wandert die Monocarbonensäure cMS<sub>1</sub> und am schnellsten die Pentacarbonensäure cPS<sub>1</sub>. In sauren Fließmitteln ist die Reihenfolge umgekehrt, die Laufunterschiede sind jedoch, wie sich an der Monocarbonensäure cMS<sub>1</sub> zeigt, im Vergleich zu pH 6,5 etwas geringer. Der Einfluss der verschiedenen Gruppen auf die Wanderungsgeschwindigkeit nimmt demnach in folgender Reihenfolge zu: -COOH (pH 3), -CONH<sub>2</sub> (pH 2 bis 8), -COO<sup>-</sup> (pH 6 bis 8).

In Tabelle V zeigt sich an den *R*-Werten der cTeS<sub>1</sub> sehr schön der beträchtliche Einfluss der Ionenstärke auf die Adsorptionsgleichgewichte, was in entsprechender

TABELLE V

*R*-WERTE VON NUCLEOTIDHALTIGEN CORRINOIDCARBONSÄUREN = CYANO-*a*-(5,6-DIMETHYLBENZIMIDAZOLYL)-COBAMSÄUREAMIDE

Säule: Amberlite XAD-2 (50 bis 100  $\mu$ ). Zusätze zum Eluent: M = Phosphatpuffer pH 6,5 verschiedener Molarität, HAc = Essigsäure, Vol. % = Gehalt an *tert.*-Butanol. Eluent enthält stets 0,00001 % Blausäure.

	<i>Eluent</i>				
	<i>Vol. %</i>	<i>1/150 M</i>	<i>1/15 M</i>	<i>1/1,5 M</i>	<i>3% HAc</i>
Cyanocobalamin	3,5	0,11	—	—	0,15
	5,0	—	—	—	0,40
Monocarbonsäure (cMS <sub>1</sub> )	3,5	0,31	—	—	0,09
	5,0	—	—	—	—
Dicarbonsäure (cDiS <sub>1</sub> )	3,5	0,61	—	—	—
	2,0	0,13	—	—	—
Tricarbonsäure (cTriS <sub>1</sub> )	2,0	0,55	—	—	—
	0,5	0,09	—	—	—
Tetracarbonsäure (cTeS <sub>1</sub> )	5,0	—	—	—	0,04
	0,5	0,31	0,14	0,03	—
Pentacarbonsäure (cPS <sub>1</sub> )	0,5	—	0,30	—	—

Weise auch bei anderen Corrinoïden zu beobachten ist. Die Adsorption schwach adsorbierter Corrinoïde—wie z.B. der höheren Corrinoïdcarbonsäuren aus neutraler Lösung—ergibt in Gegenwart anderer organischer Substanzen, die zwar nur sehr schwach adsorbiert werden, aber in höherer Konzentration bereits eluierend wirken, relativ breite Auftragszonen. Durch hohe Salzkonzentrationen in der Auftragslösung können wesentlich schärfere Auftragszonen erhalten werden.

*Nucleotidfreie Corrinoïdcarbonsäuren.* Das Laufverhalten der nucleotidfreien Säuren ist analog dem der nucleotidhaltigen. In Tabelle VI werden die *R*-Werte der Mono- bis Tricarbonsäuren im Vergleich zu Dicyanocobinamid bei pH 6,5 aufgeführt. In Fließmitteln mit 3% Essigsäure und 0,01% KCN liegen die Corrinoïdcarbonsäuren in der Dicyanof orm vor, wandern aber durch die undissoziierten Carboxylgruppen langsamer als Dicyanocobinamid. Die Aquocyanoformen in sauren

TABELLE VI

*R*-WERTE VON SAUREN DICYANOCORRINOÏDEN

Säule: Amberlite XAD-2 (50 bis 100  $\mu$ ). Eluent enthält 1/15 M Phosphatpuffer pH 6,5 und 0,01 % Kaliumcyanid.

	<i>Vol. % tert.-Butanol im Eluent</i>		
	<i>3,5</i>	<i>5</i>	<i>7</i>
Dicyano-cobinamid	0,03	0,07	0,45
Dicyano-cobalamin	0,002	—	0,14
Dicyano- <i>p</i> -cresyl-cobamid (Faktor 1 b) <sup>11</sup>	—	—	0,042
Dicyano-cobinsäure- <i>abcdg</i> -pentamid ( <i>m</i> -iMS <sub>1</sub> )	—	0,10	—
Dicyano-cobinsäure- <i>acdg</i> -tetramid ( <i>m</i> -iDS <sub>1</sub> )	—	0,32	—
Dicyano-cobinsäure- <i>aeg</i> -triamid ( <i>m</i> -iTS <sub>1</sub> )	—	0,62	—
Dicyano-P-1-cobinamid-P-2-guanosin-5'-pyrophosphat	0,26	—	—
Dicyano-cobinamid-phosphat	0,52	—	—
Dicyano-cobinamid-pyrophosphat	0,70	—	—

Fliessmitteln (ohne Cyanid) werden entsprechend ihrer Anzahl an Carboxylen stärker als Cobinamid adsorbiert, jedoch in Analogie zu Aquocyanocobinamid schwächer als in der Dicyanoform. Die Aquocyanoforenen der Corrinoidecarbonsäuren in Fliessmitteln pH 6.5 werden sehr schwach adsorbiert, die *m*-iTeS<sub>1</sub> (Cobyrinsäure-*acg*-triamid) spaltet sich in mehrere Zonen auf, wovon die schnellste schon mit wässrigem 1/150 *M* Phosphatpuffer wandert. Wahrscheinlich bildet sich die Hydroxoform im Gegensatz zu Cobinamid durch die Ausbildung intramolekularer Wasserstoffbrücke zwischen Aquoligand und Carboxylatgruppen nur unvollständig aus (siehe dazu Lit. 12).

**Phosphathaltige Dicyanocorrinoide.** Cobinamidphosphat und Cobinamidpyrophosphat lassen sich gut trennen und wandern durch die dissoziierten stark hydrophilen Phosphatgruppen sehr rasch (siehe Tabelle VI). Die Aquocyanoforenen werden noch schwächer adsorbiert und trennen sich in mehrere Zonen auf, die wie bei der *m*-iTeS<sub>1</sub> teilweise bereits mit Phosphatpuffer pH 6.5 wandern. Auffallend ist der extrem niedrige *R*-Wert von *p*-Cresylcobamid (zur Struktur siehe Lit. 11), der in Einklang mit dem Laufverhalten von Cobalamin steht, das in der Dicyanoform ebenfalls wesentlich langsamer als Dicyanocobinamid läuft (siehe dazu DISKUSSION).

**Corrinoidecarbonsäure-Isomere.** Bei niedrigeren *R*-Werten überlagern sich den Auftrennungen der Corrinoidecarbonsäuren nach Zahl der Carboxylgruppen solche in Isomere. Die Isomerentrennungen der nucleotidfreien Mono- und Dicarbonsäure-Isomeren gelingen relativ gut (vgl. Tabelle VII), die der höheren Carbonsäuren trennen sich nicht mehr vollständig auf. Die Säuren mit Isopropanolaminanteil (*m*-iMS, *m*-iDS = Cobinsäureamide) wandern trotz höheren Gehaltes an Methanol im Fliessmittel stets schneller als die ohne Isopropanolanteil (*a*-iMS und *o*-iDS = Cobyrinsäureamide). Zur Auftrennung der Isomeren ist DEAE-Cellulose besser geeignet, doch trennen sich einige wenige Isomere an DEAE-Cellulose nicht auf<sup>2</sup>, nämlich die *m*-iMS<sub>2</sub> von der *m*-iMS<sub>3</sub>, die *a*-iMS<sub>2</sub> von der *a*-iMS<sub>3</sub> und die *m*-DiS<sub>1</sub> und der *m*-iDS<sub>2</sub>. Diese können nun mit Vorteil an XAD-2 getrennt werden.

Bei den nucleotidhaltigen Isomeren trennen sich die Monocarbonsäuren cMS<sub>1</sub>

TABELLE VII

## LAUFVERHALTEN EINIGER NUCLEOTIDFREIER DICYANOCORRINOIDCARBONSÄURE-ISOMEREN

Säule: Amberlite XAD-2. Eluent 1/15 *M* Phosphatpuffer und 0.001% Cyanid. Die Kurzbezeichnungen der Mono- und Dicarbonsäure-Isomeren sind nach Lit. 2. Das schnellstlaufende Isomere dient als Bezugssubstanz für die *R<sub>f</sub>*-Werte.

	<i>R<sub>f</sub></i> bei 15 Vol.% Methanol		<i>R<sub>f</sub></i> bei 10 Vol.% Methanol
<i>m</i> -iMS <sub>1</sub> - <i>e</i> <sup>a</sup>	0.42	<i>a</i> -iMS <sub>1</sub> - <i>e</i> <sup>b</sup>	0.37
<i>m</i> -iMS <sub>2</sub> - <i>b</i>	0.59	<i>a</i> -iMS <sub>2</sub> - <i>b</i>	0.71
<i>m</i> -iMS <sub>3</sub> - <i>d</i> ( <i>R</i> = 0.037)	1.00	<i>a</i> -iMS <sub>3</sub> - <i>d</i> ( <i>R</i> = 0.01)	1.00
<i>m</i> -iDiS <sub>1</sub> - <i>eb</i>	0.45	<i>o</i> -iDiS <sub>1</sub> - <i>ef</i> <sup>d</sup>	0.45
<i>m</i> -iDiS <sub>2</sub> - <i>ed</i>	0.67	<i>o</i> -iDiS <sub>2</sub> - <i>bf</i>	0.67
<i>m</i> -iDiS <sub>3</sub> - <i>bd</i> ( <i>R</i> = 0.15)	1.00	<i>o</i> -iDiS <sub>3</sub> - <i>df</i> ( <i>R</i> = 0.13)	1.00

Nomenklaturgemäss richtige Bezeichnungen (Beispiele): <sup>a</sup> Cobinsäure-*abcdg*-pentamid Carboxyl in Stellung *e* ist frei. <sup>b</sup> Cobyrinsäure-*abcdfg*-hexamid; Carboxyl in Stellung *e* ist frei <sup>c</sup> Cobinsäure-*acdg*-tetramid. <sup>d</sup> Cobyrinsäure-*abcdg*-pentamid.

und  $cMS_2$  an XAD-2 sehr gut auf (vgl. Tabelle VIII), bei den Dicarbonsäuren und höheren Säuren ist die Isomerenselektivität gering. Ihre Auftrennung an DEAE-Cellulose<sup>2</sup> gelingt wesentlich besser.

**Koordinations-Isomere.** Die Formen *a* und *b* der Koordinations-Isomeren von Aquocyanocobinamid unterscheiden sich durch die Lage der Liganden<sup>12</sup>. Sie lassen sich an XAD-2 mit sauren Fließmitteln mit wesentlich besserem Erfolg als durch die seither angewandte Papierchromatographie<sup>12</sup> trennen (siehe Tabelle IX), wobei die Art oder Konzentration der zugesetzten Säure (0,5% Essigsäure, 0,01 M Schwefelsäure oder Salzsäure) keinen Einfluss auf die  $R_f$ -Werte hat (gleiches gilt für das Anion mit neutralen Fließmitteln). Ebenso gut gelingt die Trennung bei 13-Epi-cobinamid

TABELLE VIII

LAUFVERHALTEN DER CYANOFORMEN DER NUCLEOTIDHALTIGEN CORRINOIDMONOCARBONSÄUREN  $cMS_1$  UND  $cMS_2$  MIT SAUREN UND NEUTRALEN LAUFMITTELN

Die Kurzbezeichnung  $cMS$  ist nach Lit. 2, die  $cMS_1$  ist  $\alpha$ -(5,6-Dimethylbenzimidazolyl)-cobamsäure-*abcdg*-pentamid, die  $cMS_2$  das entsprechende Cobamsäure-*abcgg*-pentamid.

Zusätze zum Eluent	Vol. % Methanol	$R_f$ der $cMS_2$	$R_f$ der $cMS_1$ zur $cMS_2$
3% Essigsäure	35	0,294	1,20
	20	0,015	1,51
	10	0,004	2,42
1/15 M Phosphatpuffer pH 6,5	20	0,365	0,74
	10	0,012	0,54
	5	0,007	0,38

und 10-Chlor-cobinamid-8-hydroxy-*c*-lacton. Die Form *b* läuft in allen Fällen etwa halb so schnell wie Form *a*. In neutralen Fließmitteln bilden sich die Hydroxocyanocorrinoide aus, die sich mit gleichem Erfolg in die Form *a* und *b* auftrennen, aber wesentlich langsamer laufen. Zum Vergleich ist in Tabelle IX auch der  $R_f$ -Wert von Dicyanocobinamid angegeben, der durch halbseitiges Auftragen von Substanzzonen auf das Säulenbett ermittelt wurde. Das Laufverhalten in Abhängigkeit von den C-8 und C-10-Substituenten entspricht dem der Dicyanoförmern. Es ist zu erwarten, dass sich auch Koordinations-Isomere anderer Corrinoide mit gleichem Erfolg an XAD-2 trennen lassen. Da sich die Isomerengleichgewichte relativ rasch einstellen, sind wie bei Papierchromatographie<sup>12</sup> Cyanidionen und höhere Temperaturen zu vermeiden. Die sehr gute Trennbarkeit an XAD-2 lässt allerdings relativ kurze Trennzeiten zu, so dass auch bei Zimmertemperatur gearbeitet werden kann.

**Hydrogenobamide und Rhodibamide.** Die rhodium(III)-haltigen Corrinoide<sup>13</sup> verhalten sich prinzipiell wie die kobalt(III)-haltigen. Dicyano- $\alpha$ -Phenylrhodibamid und Rhodibyrsäure trennen sich sehr gut (siehe dazu Tabelle X). Die Diaquoform des  $\alpha$ -Phenylrhodibamids<sup>13</sup> wird wie bei den kobalthaltigen Aquoformen ohne Zusatz von Essigsäure in der Auftragslösung und im Eluent "irreversibel" adsorbiert und ist auch mit stärksten Elutionsmitteln ohne teilweise Zerstörung nicht desorbierbar.

Die Descobaltocorrinoide<sup>14</sup> lassen sich ebenfalls sehr gut an XAD-2 auftrennen, wie die  $R$ -Werte in Tabelle X von Descobaltocobalamin und Hydrogenobyräure (entspricht Cobyräure) zeigen. Die Unterschiede im Laufverhalten zu den ent-

TABELLE IX

LAUFVERHALTEN VON KOORDINATIONS-ISOMEREN<sup>a</sup> EINIGER NUCLEOTIDFREIER AQUOCYANOCORRINOIDE UND HYDROXYCYANOCORRINOIDESäule: Amberlite XAD-2 (50 bis 100  $\mu$ ).

	Eluent			
	0.5% Essigsäure und			Phosphatpuffer 1/150 M, pH 6.5 mit 7% tert.- Butanol
	5% MeOH	10% MeOH	15% MeOH	
R der Zone mit $R_f = 1.00$	—	0.058	0.010	0.10
$R_f$ -Werte <sup>b</sup> von:				
Cobinamide	Form b	0.4	—	0.58
	Form a	1.0	—	1.00
13-Epi-cobinamid	Form b	1.80	0.49	—
	Form a	2.70	1.00	—
10-Chlor-cobinamid- 8-hydroxy- $\epsilon$ -lacton	Form b	—	—	0.45
	Form a	—	—	1.00
Dicyanocobinamid (zum Vergleich)		0.2	—	2.30

<sup>a</sup> Die Koordinations-Isomeren (auch als Ligandenisomeren bezeichnet) unterscheiden sich durch die Lage der Liganden: in der Form *a* ist die Cyanogruppe "unten" (auf der Seite der Propionamidgruppen) und in Form *b* "oben" (auf der Seite der Acetamidgruppen) nach Lit. 12.

<sup>b</sup> Zur chromatographischen Untersuchung wurden zunächst die Dicyanoformen durch Einengen mit Essigsäure in die Aquocyanoförmern überführt, die etwa je zur Hälfte aus Form *a* und *b* bestehen. Nach Auftrag und Elution erfolgt papierchromatographische Identifizierung nach Lit. 12. Einfacher ist es, direkt in 0.1 M  $H_2SO_4$  aufzutragen und nach kurzem Waschen mit Essigsäure oder Phosphatpuffer zu eluieren.

<sup>c</sup> Bei Papierchromatographie mit wassergesättigtem Butanol-2 mit 1% Essigsäure  $R_f$ -Wert der beiden Formen *a* und *b* 0.15 und 0.22 nach Lit. 12.

sprechenden Dicyanokobalt-derivaten sind relativ gering, lassen jedoch bei niedrigeren  $R$ -Werten ebenfalls eine gute Trennung erwarten. Für die Abtrennung der Descobaltocorrinoide aus Extrakten von Chromatium D<sup>14</sup> eignet sich XAD-2 hervorragend (siehe dazu Lit. 15).

TABELLE X

VERGLEICH DES LAUFVERHALTENS VON CORRINOIDEN MIT KOBALT, RHODIUM UND OHNE ZENTRAL-ATOM

Säule: Amberlite XAD-2 (30 bis 50  $\mu$ ). Vol.% = Gehalt an tert.-Butanol im Eluent, P = 1/150 M Phosphatpuffer pH 6.5, HAc = 5% Essigsäure ohne Cyanid im Eluent.

	Vol. %	R-Wert
Dicyano- $\alpha$ -phenylrhodibamid <sup>13</sup>	{ P 5	0.08
Dicyanorhodibyrsäure <sup>13</sup>		0.50
Diaquo- $\alpha$ -phenylrhodibamid <sup>13</sup>	HAc 15	0.8
Dicyanocobalamin	{ P 20	0.25
$\alpha$ -(5,6-Dimethylbenzimidazolyl)- -hydrogenobamid = Descobaltocobalamin <sup>14</sup>		0.30
Dicyanocobyrsäure	{ P 20	0.43
Hydrogenobyrsäure <sup>14</sup>		0.23

## DISKUSSION

Das Auftrennungsmuster der Corrinoide an XAD-2 ist in der Regel stets umgekehrt wie bei Verteilungschromatographie mit Wasser-Butanol, was hier nur am Beispiel von 13-Epi-cobinamid/Cobinamid in Tabelle XI mit *R*-Werten belegt ist, sich aber auch an Cobalamin/Cobinamid, 10-Halogen-corrinoiden usw. zeigen lässt. Besondere Einflüsse auf das Laufverhalten der Corrinoide an XAD-2—wie etwa das Ausschwenken des Nucleotids (s.u.)—müssen hierbei gesondert betrachtet werden. Die Umkehrung im Auftrennungsmuster ist verständlich, da bei Verteilungs-

TABELLE XI

VERGLEICH DER SELEKTIVITÄT VERSCHIEDENER CHROMATOGRAPHISCHER METHODEN BEI DER AUFTRENNUNG VON EINIGEN DICYANOCORRINOIDEN

	<i>R<sub>F</sub></i> -Werte (bezogen auf Cobinamid)			<i>R<sub>F</sub></i> -Wert von Cobinamid
	13-Epi- cobinamid	10-Nitro- -13-epi- cobinamid	10-Chlor- cobinamid	
Papierchromatographie mit Entwickler wasserges. Butanol-2 Verteilungschromatographie an Säulen, Träger: Bio-Glas (Bio-Rad). Verteilung zwischen Wasser- Butanol-1 <sup>7</sup>	0.88	0.93	1.21	<i>R<sub>F</sub></i> = 0.4
Hydrophobe Adsorptionschromato- graphie an Amberlite XAD-2 mit Eluent:				
Wasser- <i>tert.</i> -Butanol (7 Vol.%)	1.90	—	0.35	0.45
Wasser-Metfläinol (25 Vol.%)	3.80	1.60	—	0.06

chromatographie die hydrophobe Phase die mobile und an XAD-2 die stationäre Phase darstellt.

Wie Tabelle XI zeigt, ist die Selektivität an XAD-2 im Vergleich zur Verteilungschromatographie (Wasser-Butanol) an Cellulose oder Bio-Glas<sup>7</sup> bei *R*-Werten um 0.5 etwas grösser und bei noch niedrigeren *R*-Werten noch wesentlich günstiger. Ein weiterer Vorteil ergibt sich aus der Möglichkeit, mit einem Gradienten Wasser-*tert.*-Butanol sehr schwach bis stark adsorbierte Corrinoide nacheinander mit dem jeweils günstigsten *R*-Wert zu eluieren. Daneben sind die an XAD-2 erreichbaren Beladungsdichten und Durchflussraten sehr günstig (siehe dazu Lit. 15).

Der Einfluss der C-8- bzw. C-10-Substituenten, der axialen Liganden oder des Nucleotids auf das Laufverhalten der Corrinoide an XAD-2 gehorcht bestimmten Gesetzmässigkeiten, die je nach Fragestellung Voraussagen über die Struktur des Corrinoides oder den *R*-Wert ermöglichen und die im folgenden eingehender diskutiert werden.

*Einfluss der Cyanidkonzentration.* Die Ausbildung der Dicyanoformen ist bei Adsorption an XAD-2 im Vergleich zu ihren Lösungen stark begünstigt. In 3% Essigsäure (pH 2.7) mit 0.1% Cyanid liegt bei Cobinamid das Gleichgewicht zwischen Aquocyanof orm (orange) und Dicyanoform (violett) praktisch vollständig auf der



linken Seite, bei Adsorption an XAD-2 mit nur 0.005% Cyanid schon vollständig auf der rechten Seite. Ebenso bildet sich die Dicyanoform (violett) aus Cyanocobalamin (rot) in wässriger Lösung in Gegenwart von 0.1% Cyanid erst bei pH-Werten über 10 aus, bei Adsorption an Amberlite XAD-2 schon in 0.1 M Schwefelsäure! Die Verschiebung der Gleichgewichte ist wie bei den Aquo/Hydroxoformen durch die stärkere Adsorption der Dicyanoformen bedingt. Bei der Ausbildung der nucleotidhaltigen Dicyanocorrinoide hat das Ausschwenken des Nucleotids einen weiteren stabilisierenden Einfluss (s.u.).

Zur Chromatographie der nucleotidfreien Dicyanocorrinoide und der nucleotidhaltigen Monocyanocorrinoide als solche nebeneinander soll der Gehalt an Cyanid 0.0001 bis 0.0001% (pH 6.5 bis pH 8) und 0.0001% (0.5 bis 5% Essigsäure) nicht übersteigen. 10-Nitrocobalamin (zur Darstellung siehe Lit. 16 und 17) bildet auch unter diesen Bedingungen die Dicyanoform aus, desgleichen Methyladenyl- und Adenylcobamid in 0.5% Essigsäure. Bei ersterem ist dies durch die grössere Stabilität der Dicyanoform im allgemeinen bedingt, bei letzterem durch die schwächere Koordination des Nucleotids.

*Hydrophobe Gruppen.* Zusätzliche hydrophobe Gruppen verstärken die Adsorption, wie sich z.B. ausgehend von den Grundsubstanzen Cyanocobalamin (vgl. Tabelle II), Dicyanocobinamid (vgl. Tabelle III) und Aquocyano-cobinamid (vgl. Tabelle IX) zeigen lässt. Der hydrophobe Charakter der Substituenten nimmt in folgender Reihenfolge zu: 8-Amino-*c*-lactam, 8-Hydroxy-*c*-lacton, 10-Nitro-, 10-Halogenderivate; die 13-Epicorrinoide wandern hingegen stets schneller. Dieselbe Reihenfolge sollte auch bei den entsprechenden Derivaten von z.B.  $\alpha$ -Methyladenylcobamid, Cobyrsäure oder Aquocobalamin zu beobachten sein. Der Einfluss der Substituenten ist additiv: Die 10-Chlor-8-hydroxy-*c*-lactone laufen langsamer als die 10-Chlorcorrinoide und diese langsamer als 8-Hydroxy-*c*-lactone. Der Einbau des koordinierten Nucleotids führt stets zu höheren  $R_f$ -Werten, wie der Vergleich von Cobinamid und Cobalaminderivaten zeigt. Der Einfluss der Liganden auf das Laufverhalten wurde bereits bei den Co-Alkylcorrinoiden diskutiert.

Der gleichartige Einfluss der Substituenten erlaubt es sogar, quantitative Voraussagen der  $R_f$ -Werte zu machen. Der  $R_f$ -Wert von Dicyano-13-epi-cobinamid bezogen auf die Grundsubstanz ist 3.80, für 10-Nitro-13-epi-cobinamid 4.20 (vgl. Tabelle III), für 13-Epi-cobalamin 2.60 (vgl. Tabelle II) und für Aquocyano-13-epi-cobinamid (mittlerer Wert der Form *a* und *b*) 3.10 (vgl. Tabelle IX). Die  $R_f$ -Werte weichen nur dann stärker ab, wenn die strukturellen Unterschiede in den Grundsubstanzen relativ gross sind, wie die beiden letzten Beispiele zeigen. Natürlich müssen die  $R$ -Werte der Grundsubstanzen etwa gleich gross gewählt werden, da die  $R_f$ -Werte bei höheren  $R$ -Werten kleiner sind (s.o.). Weitere Beispiele hierfür sind: Der  $R_f$ -Wert von 10-Chlor-cobinamid-8-hydroxylacton ist 0.07, vom entsprechenden Cobalamin 0.09, bei den Ligandenisomeren beträgt der  $R_f$ -Wert der Formen *a* und *b* unabhängig von den Substituenten und Liganden (Aquocyano- als auch Hydroxocyanoform) stets 0.4 bis 0.6.

*Hydrophile Substituenten.* Hydrophile Substituenten erhöhen die Laufgeschwindigkeit, wobei dieselben Gesetzmässigkeiten wie für hydrophobe Gruppen gelten: der Einbau der stark hydrophilen Phosphat- und Pyrophosphatgruppen in Cobinamid führt bei pH 6.5 zu einer starken Erhöhung der Wanderungsgeschwindigkeit. Die Monocarbonsäuren von Cobinamid und Cobalamin wandern bei pH 6.5 stets schneller

als die Grundsubstanzen. Die Laufunterschiede sind jedoch relativ gering, da die schon stark hydrophile Carboxamidgruppe lediglich gegen die noch stärker hydrophile Carboxylatgruppe ausgetauscht wird. Hydrophile Gruppen gehen aber keine direkten Wechselwirkungen mit dem Adsorbens ein, sondern führen lediglich zu einer Vergrößerung der Hydrathülle und verringern dadurch die hydrophoben Eigenschaften des Moleküls. Aus demselben Grund weisen die Isomerentrennungen vor allem der höheren Corrinoidcarbonsäuren an NAD-2 im Vergleich zur Ionenaus-

TABELLE XII

EINFLUSS DES NUCLEOTIDANTEILS AUF DAS LAUFVERHALTEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM pH UND DER CYANIDKONZENTRATION IM ELUENT

Die  $R_f$ -Werte wurden in Fließmitteln mit verschiedenen Zusätzen untersucht. Der  $R$ -Wert der Bezugssubstanz ist nur geringfügig von der Ionenstärke des Eluent abhängig und diese liegt unabhängig von den Zusätzen stets in derselben Form vor (vgl. Text).

	Zusätze zum Eluent	tert.-Butanol (Vol.%)	$R_f$ -Werte	$R$ -Werte
Dicyanocobalamin	0.01% HCN	3.5	0.033	
Dicyanocobalamin	0.1% HCN, 0.01 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3.5	0.063	
Dicyanocobinamid	0 bis 0.1% HCN	3.5	0.36	
Cyanocobalamin	0.00001% KCN	3.5	1.00	0.16
Cyanocobalamin	0 bis 0.01 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	8.0	4.00	
Methylaquocobinamid	0 bis 0.01 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	8.0	3.20	
Methylcobalamin	ohne	8.0	1.00	0.2
Methylcobalamin	0.01 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	8.0	0.32	
Cyano- $\alpha$ -(methyladenyl)-cobamid	ohne	5.0	1.50	
Cyano- $\alpha$ -(methyladenyl)-cobamid	0.01 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5.0	3.00	
Cyanocobalamin	0.01 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5.0	1.00	0.15

tauschchromatographie eine geringe Selektivität auf; hierauf wird weiter unten noch näher eingegangen. Der Einfluss von Ladungseinheiten auf das Laufverhalten zeigt sich auch bei den bereits besprochenen Corrinoiden mit Purinen im Basenanteil. In 0.1 M Schwefelsäure ist der  $R_f$ -Wert von Methyladenylcobamid (einfach protoniert) 3.0, während er ohne Zusätze 1.5 ist (vgl. Tabelle XII). Der  $R$ -Wert von Cyanocobalamin (Bezugssubstanz) zeigt keine pH-Abhängigkeit, mit Schwefelsäure ist er jedoch durch den Einfluss der Ionenstärke etwas geringer.

In sauren Fließmitteln wandern Corrinoidcarbonsäuren stets langsamer als die nächstniedrige Carbonsäure oder die Grundsubstanz. Der hydrophile Charakter der Gruppen nimmt demnach in folgender Reihenfolge ab: -COO<sup>-</sup>, -CONH<sub>2</sub>, -COOH. Diese Gesetzmässigkeiten lassen diese Reihe folgendermassen erweitern: -COOH, -CONHCH<sub>3</sub>, -COOCH<sub>3</sub>, -CON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Carboxanilid. Cobyrsäuremethylamid sollte sich also von Cobyramid gut trennen lassen, ebenso Cobinamid (Cobyrsäureisopropanolamid) von Cobyramid. Der stark hydrophobe Einfluss der Isopropanolgruppe zeigt sich bereits beim Vergleich des Laufverhaltens der Mono- und Dicarbonsäure, die sich von Cobinamid (*m*-iMS) und Cobyramid ( $\alpha$ -iMS) ableiten (siehe dazu Tabelle VII): die  $\alpha$ -iMS- wandern trotz höherer Methanolkonzentration langsamer als die *m*-iMS-Isomeren.

### *Einfluss des Nucleotids*

Die im Vergleich zu wässrigen Lösungen ausserordentlich stark begünstigte Ausbildung der Dicyanoformen nucleotidhaltiger Corrinoiden ist nicht allein auf die stärkere Adsorption der Dicyanoformen zurückzuführen. Hierbei ist noch zu berücksichtigen, dass das Ausschwenken des Nucleotids und damit die Ausbildung der Dicyanoform zusätzlich begünstigt wird, indem das ausgeschwenkte Nucleotid— nun frei drehbar—aus sterischen Gründen wesentlich stärker als in koordiniertem Zustand adsorbiert wird: Dicyanocobalamin ( $R_f = 0.033$ ) läuft trotz einfach negativer Ladung an der Phosphatgruppe wesentlich langsamer als Dicyanocobinamid ( $R_f = 0.36$ ) und Cyanocobalamin ( $R_f = 1.00$ ) (siehe dazu Tabelle XII). Der ausserordentlich niedrige  $R$ -Wert von *p*-Cresylcobamid (vgl. Tabelle VI) findet hierdurch eine sehr einfache Erklärung.

Auch in sauren Fliessmitteln (0.5% Essigsäure oder 0.01 bis 0.1 *M* Schwefelsäure mit 0.1% KCN) liegt Cobalamin bei Chromatographie an XAD-2 vollständig in der Dicyanoform vor. Das Molekül ist nun aber elektroneutral, da hierbei N-3 des Imidazolrestes protoniert wird. Diese Protonierung erhöht die Laufgeschwindigkeit von Dicyanocobalamin wie bei  $\alpha$ -Methyladenylcobamid um etwa das Doppelte (vgl. Tabelle XII). Es zeigt sich, dass ionische Gruppen unabhängig von ihrer Ladungseinheit und der resultierenden Gesamtladung die Laufgeschwindigkeit stets erhöhen. Bei Methylcobalamin ist das Nucleotid in 0.1 *N*  $H_2SO_4$  infolge Protonierung an N-3 vollständig ausgeschwenkt und besitzt dann eine Methyl- und Aquogruppe als axiale Liganden. Dadurch läuft nun Methylcobalamin in sauren Fliessmitteln in Analogie zu Dicyanocobinamid/Dicyanocobalamin wesentlich langsamer als Methylaquocobinamid (vgl. hierzu Tabelle XII).

### *Einfluss des Chromophors*

Auffallend ist weiterhin, dass Methylaquocobinamid (positive Ladung) schneller als Methylcobalamin (negative und positive Ladung) läuft, hingegen Dicyanocobinamid (elektroneutral) langsamer als Cyanocobalamin (negative und positive Ladung). Neben ionischen Gruppen ist hier der Einfluss des Chromophors auf die Stärke der Adsorption entscheidend. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass z.B. auch Substituenten an C-10 aus sterischen Gründen kaum direkte Wechselwirkungen mit dem Adsorbens eingehen können, die Adsorption jedoch stets stark erhöhen. Das mesomere  $14\pi$ -Elektronensystem trägt offensichtlich durch  $\pi$ - $\pi$  Wechselwirkungen ganz erheblich zur Adsorption bei, was durch die axialen Liganden und Substituenten an C-10 mit +M und +J-Effekt durch grössere Delokalisierung der  $\pi$ -Elektronen verstärkt wird. Dies geht der Verschiebung ins energieärmere bei den Elektronenspektren weitgehend parallel.

Das Laufverhalten von Co-Desoxyadenosylcobalamin (Vitamin  $B_{12}$ -Coenzym) ist vom pH des Fliessmittels (geprüft pH 1 bis 8) nahezu unabhängig, indem sich die verschiedenen Effekte gegenseitig aufheben.

*Isomeren der Corrinoidcarbonsäuren.* Die Isomeren der Corrinoidcarbonsäuren wandern an XAD-2 in der dissoziierten (neutrale oder alkalische Fliessmittel) und undissoziierten Form (Fließmittel mit Essigsäure) in derselben Reihenfolge wie bei Papierchromatographie<sup>18</sup> (siehe Tabellen VII und VIII). Der Einfluss der einzelnen Carboxyle auf das Laufverhalten ist wie bei Verteilungschromatographie auch hier additiv: wenn die Reihenfolge bei den *m*-IMS  $e > b > d$  ist, dann ist sie bei den *m*-IDS

$cb > ed > bd^{18}$ . Neben dem Dipolmoment ( $-\text{COOH} \leftarrow -\text{CONH}_2 \leftarrow -\text{COO}^-$ ) wird die Grösse der Hydrathülle und damit der hydrophile Charakter einer Seitengruppe durch die benachbarten hydrophoben Gruppen— nach Lit. 18 vor allem durch die Methylgruppen—bestimmt. Zur Erklärung des Laufverhaltens der Isomeren an XAD-2 muss folgendes betrachtet werden: Carboxamid  $c$  bzw.  $d$  besitzt eine Hydrathülle der Grösse  $E$  bzw.  $D$ , wobei nach Lit. 18  $E < D$  ist. Für das entsprechende Carboxylat  $c$  bzw.  $d$  ist dann die Hydrathülle um  $E'$  bzw.  $D'$  grösser. Für die Hydrathülle der  $c\text{MS}_1-c$  und  $c\text{MS}_3-d$  in Fliessmitteln pH 6.5 gilt dann:  $(E + D) + E' < (E + D) + D'$ , denn wenn  $E < D$ , dann auch  $E' < D'$ . Die  $c\text{MS}_2-d$ ,  $m\text{-iMS}_3-d$  und  $a\text{-iMS}_3-d$  wandern also in der dissoziierten Form durch ihre grössere Hydrathülle schneller (vgl. Tabellen VII und VIII). In sauren Fliessmitteln ist die Hydrathülle bei undissoziierten Carboxylgruppen kleiner als an Carboxamidgruppen und es gilt:  $(E + D) - E'$  für  $c\text{MS}_1-c > (E + D) - D'$  für  $c\text{MS}_3-d$ . Die  $c\text{MS}_3-d$  wandert nun langsamer als die  $c\text{MS}_1-c$ , dasselbe gilt für die hier nicht tabellierten entsprechenden  $a\text{-iMS}$ -Isomeren. Das Laufverhalten der Isomeren mit Carboxyl in  $b$  und das Laufverhalten der Dicarbonsäuren lässt sich in analoger Weise erklären.

## DANK

Herrn Dr. V. B. KOPPENHAGEN danken wir für die Überlassung von rhodiumhaltigen Corrinoiden, Herrn K. HOFFMANN und Herrn E. WARMUTH für ihre sorgfältige Mitarbeit.

Die diesem Bericht zugrundeliegenden Arbeiten wurden mit Mitteln des BMBW im Rahmen des Technologieprogramms gefördert.

## ZUSAMMENFASSUNG

Corrinoide werden aus wässrigen Lösungen an Amberlite XAD-2 adsorbiert und bei Säulenchromatographie durch einen Gradienten mit Wasser-*tert.*-Butanol selektiv eluiert (95:5 bis 80:20). Das Laufverhalten wird in Abhängigkeit von C-8 und C-10-Substituenten, von den axialen Liganden und dem Nucleotid unter Berücksichtigung des Einflusses von pH und Cyanidkonzentration anhand der erhaltenen  $R$ -Werte diskutiert.

## LITERATUR

- 1 R. BONNETT, *Chem. Rev.*, 63 (1963) 573.
- 2 K. BERNHAUER, H. VOGELMANN UND F. WAGNER, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 349 (1968) 1271.
- 3 E. L. SMITH, *Vitamin B<sub>12</sub>*, Wiley, New York, 1965.
- 4 IUPAC Nomenclature of Biological Chemistry, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 2992.
- 5 R. L. GUSTAFSON, R. L. ALBRIGHT, J. HEISLER, J. A. LIVIO UND O. T. REID, 1 & EC *Prod. Res. and Dev.*, 7 (1968) 107.
- 6 *Amberlite XAD, Macroreticular Adsorbent*, Rohm and Haas Co., Philadelphia, 1971.
- 7 H. VOGELMANN UND F. WAGNER, unveröffentlicht.
- 8 M. HORI, *Steroids*, 12 (1969) 33.
- 9 J. P. RILEY UND D. TAYLOR, *Anal. Chim. Acta*, 46 (1969) 307.
- 10 R. BONNETT, J. M. GODFREY UND V. B. MATH, *J. Chem. Soc.*, (1971) 3736.
- 11 F. DINGLINGER UND I. BRAUN, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 351 (1970) 1157.

- 12 W. FRIEDRICH, H. OHLMS, W. SANDECK UND R. BIGANOWSKI, *Z. Naturforsch.*, 22b (1967) 839.
- 13 V. B. KOPPENHAGEN, F. WAGNER UND J. J. PFIFFNER, *J. Biol. Chem.*, im Druck.
- 14 V. B. KOPPENHAGEN UND J. J. PFIFFNER, *J. Biol. Chem.*, 246 (1971) 3075.
- 15 H. VOGELMANN UND F. WAGNER, in Vorbereitung.
- 16 F. WAGNER, *Ann. Rev. Biochem.*, 35 (1966) 405.
- 17 V. B. KOPPENHAGEN UND F. WAGNER, unveröffentlicht.
- 18 K. BERNHAUER, F. WAGNER, H. BEISBARTH, P. RIETZ UND H. VOGELMANN, *Biochem. Z.*, 344 (1966) 289.