

Komplexbildung des Hydroxycobalamins mit Kaliumhexacyanoferrat(II)

Von

Y. Popova und K. Manolov

Aus dem Institut für Lebensmittelindustrie, Plovdiv, Bulgarien

(Eingegangen am 21. August 1972)

Complex Formation of Hydroxycobalamin with Potassium Hexacyanoferrate(II)

Hydroxycobalamin forms with potassium hexacyanoferrate(II) at pH 2.5–2.7 a water soluble complex $[B_{12}-Fe(CN)_6-B_{12}]^{2-}$ with a formation constant $\lg K = 10.00 \pm 0.04$. The complex has high reactivity and easily can be converted into other derivatives of vitamin B_{12} .

Das Hydroxycobalamin bildet mit Kaliumhexacyanoferrat(II) bei pH 2,5–2,7 ein wasserlösliches Derivat $[B_{12}-Fe(CN)_6-B_{12}]^{2-}$, das einen Komplex mit einer Bildungskonstante $\lg K = 10,00 \pm 0,04$ darstellt. Der Komplex ist reaktionsfähig und wird leicht in andere Derivate des Vitamins B_{12} übergeführt.

Die große Beweglichkeit der OH-Gruppe der natürlichen biologischen aktiven Form des Vitamins B_{12} — des Hydroxycobalamins (OH— B_{12}) — begünstigt den Eintritt von Substitutionsreaktionen mit OH— B_{12} , die zu einer Reihe von Abkömmlingen des Vitamins B_{12} , wie z. B. Coenzym B_{12}^1 , Alkylcobalamin², Sulfitocobalamin³, Nitritocobalamin⁴, Cyanocobalamin⁵, Thiocyanatocobalamin⁶ u. a., führen. Während der Isolierung des OH— B_{12} aus Bakterienzellen und bei der Reinigung des Produktes wurde festgestellt, daß OH— B_{12} mit Kaliumhexacyanoferrat(II) ein Derivat bildet, das wasserlöslich und in kristallinischem Zustand aus wäßrig-acetonischer Lösung zu erhalten ist. Da dieses Derivat leicht in saurer Lösung entsteht und leicht in verschiedene Vitamin- B_{12} -Derivate überzuführen ist, ist die Feststellung der Bedingungen für dessen Herstellung sowie einiger Eigenschaften der neuen Verbindung von großem Interesse.

Experimenteller Teil

Herstellung

Zu einer mit HCl angesäuerten (pH 2,5—2,7) wäßr. Lösung von OH—B₁₂ wird unter Umrühren eine wäßr. Lösung, die 2—3 Äquivalente Kaliumhexacyanoferrat(II) pro Äquivalent OH—B₁₂ enthält, zugefügt. Die Farbe der Lösung geht von orangerot in purpurrot über. Die Reinigung der entstandenen Verbindung beginnt mit einer Extraktion mit einem Gemisch von Phenol und CHCl₃ (1 : 1), die nach dem bekannten Verfahren durchzuführen ist. Der nach der Behandlung mit Phenol erhaltene wäßr., OH—B₁₂ enthaltende Extrakt wird durch Elektrophorese bei 280 V (40 V/cm) auf S & S-Papier in 0,5M-Essigsäure gereinigt. Die negativ geladene Verbindung läuft vergleichsweise schnell zur Anode. Danach wird sie mit Wasser eluiert und das Eluat mit 9 Vol. Aceton verdünnt. Die Lösung wird durch eine mit neutralem Al₂O₃ (Aktivität II nach *Brockmann*) gefüllte und mit reinem Aceton gewaschene Säule durchfließen gelassen, wobei die Verbindung am Kopf der Säule bleibt. Die dunkelrote Bande wird mit 50proz. Aceton eluiert; diese Lösung wird mit Aceton verdünnt, bis eine schwache Opaleszenz erscheint, und zur Kristallisation stehengelassen. Nach einigen Tagen werden dunkelrote formlose Aggregate, die aus sehr kleinen Plättchen bestehen, erhalten. Die Kristalle werden auf einem Glasfilter abfiltriert, mit Aceton und danach mit Äther gewaschen und im Vak. über P₂O₅ getrocknet.

Zur Analyse werden die Kristalle in Wasser gelöst und 20 Min. auf dem sied. Wasserbad bei pH 6 mit KCN behandelt. Das entstandene CN—B₁₂ wird mit Phenol—CHCl₃ extrahiert und der Vitamingehalt kolorimetrisch bestimmt. Die wäßr. Schicht, die das abgespaltene Fe(CN)₆²⁻ enthält, wird eingedampft, mit konz. H₂SO₄ mineralisiert und das Eisen mit 1,10-Phenanthrolin bestimmt. Parallel wird eine Blindprobe durchgeführt.

Spektrophotometrische Untersuchungen

Die Spektren im sichtbaren Bereich wurden in Lösungen, die eine konstante Konzentration an OH—B₁₂ ($2 \cdot 10^{-5}M$) und eine steigende Konzentration an K₄Fe(CN)₆ ($2 \cdot 10^{-5}$ bis $5 \cdot 10^{-5}M$) aufwiesen, registriert. Als Kompensation diente Wasser oder eine Lösung von OH—B₁₂.

Um die Zusammensetzung und die Stabilität des Komplexes festzustellen, wurden die Ergebnisse nach der logarithmischen Methode^{7, 8} bearbeitet.

Die IR-Spektren wurden im Nujol mit einem Spektrometer UR-10 registriert.

Ergebnisse und Diskussion

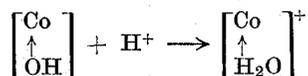
Die Kristallisation der gereinigten Verbindung führt immer zu großen formlosen Aggregaten außerordentlich kleiner Kriställchen. Die Form der Kristalle konnte erst bei 1600facher Vergrößerung festgestellt werden: rechteckige, beinahe quadratische Plättchen. Sie lösen sich leicht in Wasser und acetonisch- oder äthanolisch-wäßrigem Medium, sind aber unlöslich in reinem Aceton bzw. Äthanol sowie in unpolaren Lösungsmitteln.

Die Analyse ergab, daß ein Molekül K₄Fe(CN)₆ an zwei Moleküle OH—B₁₂ gebunden ist. Die nach der logarithmischen Methode^{7, 8} aus-

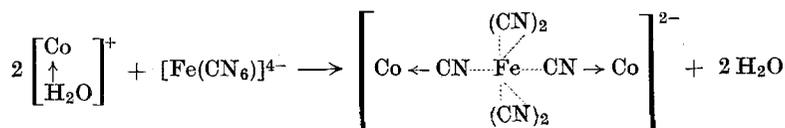
gewerteten spektrophotometrischen Daten bestätigten bei $\lambda = 362$ nm das Verhältnis $B_{12} : K_4Fe(CN)_6 = 2 : 1$. Daraus wurde der Schluß gezogen, daß bei den gegebenen Bedingungen ein Hexacyanoferrato-komplex $[B_{12}-Fe(CN)_6-B_{12}]^{2-}$ entsteht.

Der Komplex ist vergleichsweise stabil, die Totalbildungskonstante $\log K_2 = 10 \pm 0,04$ ($K_2 = \beta_1 \cdot \beta_2$) errechneten wir nach der logarithmischen Methode^{7, 8}.

Wie von anderen Autoren festgestellt wurde⁹, geht das $OH-B_{12}$ in saurer Lösung in Aquocobalamin über



Wenn diese Lösung mit $K_4Fe(CN)_6$ behandelt wird, wird das Wassermolekül durch das Hexacyanoferrat-ion ersetzt, indem der Komplex nach der Reaktion



gebildet wird. Schematisch bezeichnen wir den Komplex wieder mit $[B_{12}-Fe(CN)_6-B_{12}]^{2-}$.

Diese Auffassung über der Komplexbildung ist auch mit den folgenden Überlegungen übereinstimmend.

1. Der Komplex läuft während der Elektrophorese zur Anode, was ihn als Anion kennzeichnet. Unter denselben Bedingungen wandert $OH-B_{12}$ zur Kathode, $CN-B_{12}$ bleibt auf der Startlinie. Die elektrophoretische Geschwindigkeit in 2 Stdn. beträgt bei 280 V (40 V/cm) auf S & S-2045a-Papier. a) 2,8 cm für $(B_{12})_2Fe(CN)_6$ (zur Anode); b) 4,0 cm für $OH-B_{12}$ und 0,3 cm für $CN-B_{12}$ (zur Kathode).

2. Die IR-Spektren zeigen, daß die Absorption des Komplexes im Bereich der Valenzschwingungen der $C \equiv N$ -Gruppe von demselben Charakter wie im Kaliumhexacyanoferrat(II) bleibt: in Kaliumhexacyanoferrat(II) bei 2120 cm^{-1} und 2135 cm^{-1} , in $(B_{12})_2Fe(CN)_6$ — bei 2150 cm^{-1} und 2193 cm^{-1} . Der $C \equiv N$ -Gruppe in $CN-B_{12}$ wurde nur ein Absorptionsmaximum bei 2170 cm^{-1} zugeordnet.

Das neue Derivat des Vitamins B_{12} zeichnet sich durch eine beträchtliche Reaktionsfähigkeit aus. Es ist leicht in andere B_{12} -Derivate überzuführen, wobei oft die Reaktion quantitativ verläuft. Z. B. entsteht, wenn die wäßrige Lösung des Komplexes bei pH 4,5—5,0 auf dem sied. Wasserbad 20 Min. mit $KHSO_3$ behandelt wird, quantitativ Sulfitocobalamin SO_3-B_{12} . Die wäßrige Lösung des Komplexes liefert beim Erhitzen

(3—5 Min.) mit Zinkstaub in Gegenwart von NH_4Cl bei pH 4,5—5,0 eine braun gefärbte Verbindung, die nach Belüften quantitativ in OH—B_{12} übergeht. Wie schon bekannt, verläuft die Behandlung des CN—B_{12} nicht vollständig, da die Reaktion reversibel ist.

Literatur

- ¹ *H. P. C. Hogenkamp*, Feder. Proc. **25**, 1623 (1966).
- ² *A. W. Johnson, L. Mervyn, N. Shaw* und *E. L. Smith*, J. Chem. Soc. **1963**, 4146.
- ³ *D. H. Dolphin, A. W. Johnson* und *N. Shaw*, Nature **199**, 170 (1963).
- ⁴ *E. A. Kaczka, D. E. Wolf, F. A. Kuehl* und *K. Folkers*, J. Amer. Chem. Soc. **73**, 3569 (1951).
- ⁵ *W. L. C. Veer, J. H. Edelhausen, H. G. Wijmenga* und *J. Lens*, Biochim. Biophys. Acta **6**, 225 (1950).
- ⁶ *R. P. Buks, E. G. Newstead* und *N. R. Trenner*, Science **113**, 625 (1951).
- ⁷ *W. D. Kingory* und *D. N. Hume*, J. Amer. Chem. Soc. **71**, 3186 (1949).
- ⁸ *L. Newman* und *D. N. Hume*, J. Amer. Chem. Soc. **79**, 4571 (1957).
- ⁹ *L. S. Smith, J. L. Martin, R. J. Gregory* und *N. H. C. Shaw*, Analyst **87**, 183 (1962).