

Eine neue Methode zur Herstellung und Reinigung von 5-Methyltetrahydrofolsäure

A New Method for Preparation and Purification of 5-Methyltetrahydrofolic Acid

Harold Rüdiger und Reinhard Sieck

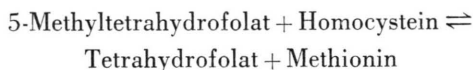
Institut für Biochemie, Universität Köln

(Z. Naturforsch. **28 c**, 650–652 [1973] ; eingegangen am 23. Juli 1973)

5-Methyltetrahydrofolic acid, purification, column chromatography

5-Methyltetrahydrofolic acid is prepared from folic acid by sodium borohydride reduction, reaction with formaldehyde and reduction to the methyl derivative by sodium borohydride. The crude product is precipitated as barium salt which after having been converted to the sodium salt by ion exchange is adsorbed to QAE-Sephadex and eluted by different acetic acid gradients in subsequent chromatographies. This method allows to process gram quantities on reasonably small columns.

5-Methyltetrahydrofolat ist eines der Substrate in der Endstufe der Methioninbiosynthese¹:



und wahrscheinlich das Produkt, in das Stoffwechsel-folate übergehen, wenn die Methioninsynthese blockiert ist („methyl trap“-Hypothese)^{2,3}. Bei der Herstellung von 5-Methyltetrahydrofolat geht man im allgemeinen von Folsäure aus, die zur Tetrahydrostufe reduziert, mit Formaldehyd zur Methylen- bzw. Hydroxymethylverbindung kondensiert und schließlich durch nochmalige Reduktion in das 5-Methyl-derivat übergeführt wird^{4,5}. Für diese Reaktionsfolge haben kürzlich Blair und Saunders⁶ ein Eintopfverfahren entwickelt.

Der Engpaß bei der Herstellung von Methyltetrahydrofolat ist die Reinigung des Rohprodukts. Das bisher übliche Verfahren, durch Chromatographie auf Cellulose-Anionenaustauschern (DEAE-Cellulose^{4,5}, TEAE-Cellulose⁷) mit verhältnismäßig niedriger Kapazität Methyltetrahydrofolat aus dem Rohprodukt zu isolieren, erlaubt nur kleine Versuchsansätze, ist langwierig und birgt trotz Zusatz von Antioxydantien wie Mercaptoäthanol, die selbst mit Folsäurederivaten reagieren können⁸, das Risiko, einen Teil der Substanz durch Nebenreaktionen im schwach alkalischen Milieu zu verlieren. Ein weiterer Nachteil besteht darin, daß das Produkt sehr verdünnt erhalten wird, so daß man zu

Konzentrierungsverfahren greifen muß, die sekundär weitere Verunreinigungen entstehen lassen.

In unserem Laboratorium hat sich in letzter Zeit ein Verfahren bewährt, bei dem in Anlehnung an⁶ Methyltetrahydrofolat hergestellt, als Bariumsalz gefällt und dadurch konzentriert, dann in einem Arbeitsgang auf einer Säule extrahiert und umgesalzt und schließlich durch zweimalige Ionenaustauschchromatographie an einem Anionenaustauscher hoher Kapazität als Acetat in reiner Form gewonnen wird.

Herstellung des Rohprodukts

18 g (41 mMol) Folsäure (Merck) werden in einem 1-l-Dreihalskolben, der Gaseinlaß, Gasauslaß und pH-Elektrode trägt, in 200 ml Wasser suspendiert und unter einem Argonstrom, der gleichzeitig für die Durchmischung sorgt, vorsichtig mit 18 g (476 mMol) Natriumborant in 50 ml Wasser versetzt. Die Suspension klärt sich dabei auf, der pH-Wert steigt auf 9,4. Nach dem Abkühlen wird mit 5 M Essigsäure auf pH 7,8 eingestellt und mit 24 ml 37-proz. Formalin (320 mMol) versetzt. Die gebildete Methylenverbindung wird dann durch langsame Zugabe von 36 g (951 mMol) Natriumborant in 100 ml Wasser reduziert, das Gemisch noch 1 h bei 45 °C gehalten, abkühlen gelassen, mit 5 ml Mercaptoäthanol versetzt und mit 5 M Essigsäure auf pH 6 eingestellt, um überschüssiges Borant zu zerstören. Zu der Lösung fügt man 45 g (151 mMol) Bariumbromid in 100 ml Wasser, eine Probe der sich bildenden Suspension wird zentrifu-

Sonderdruckanforderungen an Dr. H. Rüdiger, Institut für Biochemie der Universität Köln, D-5000 Köln-I, An der Bottmühle 2.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

giert und der Überstand auf Vollständigkeit der Fällung geprüft. Die gesamte Suspension wird dann mit 2 l Äthanol versetzt und zur Vervollständigung der Fällung über Nacht bei 4 °C aufbewahrt. Danach wird abzentrifugiert, der Überstand wird verworfen, wenn sich bei Zusatz von weiterem Äthanol kein nennenswerter Niederschlag mehr bildet. Der Niederschlag wird einmal auf der Zentrifuge mit Äthanol gewaschen, dann im Vakuum über Calciumchlorid und Natriumhydroxid bei Raumtemperatur getrocknet. Nach dem Trocknen wird erneut mit Äthanol gewaschen, bis der Überstand frei von Bariumionen ist. Die Ausbeute an Rohprodukt beträgt 70–75 g, wovon allerdings das Bariumsalz von 5-Methyltetrahydrofolsäure nur einen Teil ausmacht.

Extraktion und Umsalzen zum Natriumsalz

Auf eine Säule (3 × 30 cm, Combinationssäule Boehringer Mannheim) von Carboxymethylcellulose (Whatman CM 32) in der Natriumform wird ein Siebteil und ein weiteres Säulensegment (3 × 20 cm) aufgeschraubt. Auf das Siebteil wird eine Aufschlämmung von grobfaseriger Cellulose gegeben, so daß eine etwa 2 cm hohe Schicht entsteht. Darauf gießt man vorsichtig 20 g des in 50 ml Wasser aufgeschlämmten Rohprodukts. Es wird mit Wasser eluiert (15 ml/h, 12 ml/Fraktion); die Fraktionen, die bei 290 nm mehr als 500 Extinktionseinheiten aufweisen (zwischen 200 und 340 ml des Eluats), werden vereinigt. Die Ausbeute an diesem Zwischenprodukt beträgt unter Zugrundelegung eines molaren Extinktionskoeffizienten von $28 \cdot 10^3$ 5,4 mMol (49% der eingesetzten Folsäure).

Zur Regeneration wird die Carboxymethylcellulose-Säule nach Abschrauben des Siebteils mit dem oberen Segment mit 2,5-proz. Tetranatrium-EDTA gewaschen, bis das Eluat frei von Bariumionen, danach mit Wasser, bis es neutral ist.

Reinigung

Eine Säule (3 × 10 cm) von QAE-Sephadex A-25 (Pharmacia) wird zuerst mit 2 M Essigsäure, dann mit Wasser gewaschen. Darauf pumpt man mit einer Geschwindigkeit von 30 ml/h 2 mMol des in 150 ml Wasser gelösten Zwischenprodukts. Nachdem weitere 2 h mit Wasser gewaschen worden ist, wobei sich gelbe Verunreinigungen abtrennen, wird mit Hilfe eines Ultragrad-Gradientenmischers (LKB

Produkter AB) über 24 h ein konkaver Gradient aus Wasser und 2 M Essigsäure gemischt und über die Säule gepumpt. Methyltetrahydrofolsäure verläßt die Säule bei einer Essigsäurekonzentration von 0,5–0,6 M. Alle Fraktionen (7,5 ml/Fraktion) mit mehr als 100 Extinktionseinheiten bei 290 nm werden vereinigt, mit Ammoniak auf pH 6 eingestellt und diese Lösung in derselben Weise an einer zweiten Säule von QAE-Sephadex A-25 chromatographiert, diesmal mit einem konvexen Gradienten aus Wasser und 1 M Essigsäure. Fraktionen mit mehr als 100 Extinktionseinheiten bei 290 nm werden vereinigt, lyophilisiert und bei –20 °C aufbewahrt. Die Ausbeute nach den Chromatographien an QAE-Sephadex liegt bei 1,40 mMol (62% des Zwischenprodukts, 31% der eingesetzten Folsäure). Die Kombination von zwei Ionenaustauschchromatographien mit verschiedenen geformten Gradienten ermöglicht die Abtrennung von Verunreinigungen, die sich bei Anlegen eines linearen Gradienten mit Methyltetrahydrofolsäure überlappen würden. Wegen der im sauren Milieu verringerten Autoxydation des Folsäurederivats erübrigt sich die Verwendung eines Antioxydants.

Das gereinigte Präparat liefert beim enzymatischen Umsatz mit der B₁₂-abhängigen Methioninsynthetase¹ in einer Ausbeute von 51,3% Tetra-

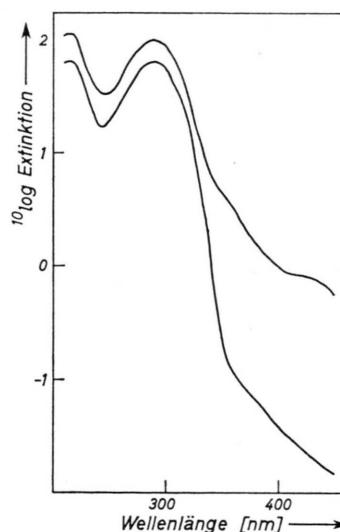


Abb. 1. Spektren von 5-Methyltetrahydrofolat-Präparaten bei pH 7. Oberes Spektrum: Zwischenprodukt nach Umsalzen aus CM-Cellulose; unteres Spektrum: Endprodukt nach zweimaliger Chromatographie an QAE-Sephadex A-25. Das untere Spektrum ist zur Verdeutlichung um 0,2 Skalenteile nach unten verschoben. Die Spektren wurden mit einem Cary 14 Spektralphotometer aufgenommen.

hydrofolat (Extinktionskoeffizienten nach ⁹). Das entspricht dem zu erwartenden Wert, da wegen des bei der Reduktion neu entstehenden Asymmetriezentrum in Position 6 des Pterin-Anteils ein Diastereomerenpaar vorliegt. Das Rohprodukt ergibt demgegenüber nur eine Ausbeute von 29,4%, wobei allerdings nicht untersucht wurde, wieweit hier die Inhibition durch Ba⁺⁺-Ionen ¹⁰ eine Rolle spielt.

Die Reinheit des gewonnenen Präparats ergibt sich aus den UV-Spektren (Abb. 1). Während das noch stark gelb gefärbte Zwischenprodukt der Umsalzung ein Extinktionsverhältnis $E_{288\text{ nm}}/E_{244\text{ nm}} =$

2,95 aufweist, ist dieser Wert bei dem im lyophilisierten Zustand schwach graustichigen Endprodukt nach Lösen in neutralem Phosphatpuffer auf den in der Literatur ^{9, 11} angegebenen Wert von 3,64 angestiegen. Legt man mehr Wert auf den Umsatz größerer Mengen als auf hohe Reinheit, so kann man ohne Schwierigkeiten bis zu 8 mMol des Zwischenprodukt auf QAE-Sephadex-Säulen der angegebenen Dimensionen chromatographieren.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung dieser Arbeit.

¹ H. Rüdiger u. L. Jaenicke, Mol. Cell. Biochem. **1**, 157 [1973].

² R. L. Blakley, The Biochemistry of Folic Acid and Related Pteridines, p. 454, North Holland Publishing Company, Amsterdam, London 1969.

³ K. U. Buehring, K. K. Batra u. E. L. R. Stokstad, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **279**, 498 [1972].

⁴ L. Jaenicke, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **326**, 168 [1961].

⁵ J. C. Keresztesy u. K. O. Donaldson, Biochem. biophysic. Res. Commun. **5**, 286 [1961].

⁶ J. A. Blair u. K. J. Saunders, Analyt. Biochem. [New York] **34**, 376 [1970].

⁷ H. Rüdiger u. L. Jaenicke, FEBS Letters **4**, 316 [1969].

⁸ S. F. Zakrezewski, J. biol. Chemistry **241**, 2957 [1966].

⁹ L. Jaenicke u. C. Kutzbach, Fortschr. Chem. org. Naturstoffe [Wien] **21**, 184 [1963].

¹⁰ H. Rüdiger, FEBS Letters **35**, 295 [1973].

¹¹ V. S. Gupta u. F. M. Huennekens, Arch. Biochem. Biophysics **120**, 712 [1967].