

Annahme gleicher Liganden und gleicher Abstände berechnet, bekommt man die in Bild 15 dargestellten Werte. Man sieht zunächst, daß beim dreiwertigen Eisen die zusätzliche Verfestigung des Komplexions am geringsten ist.

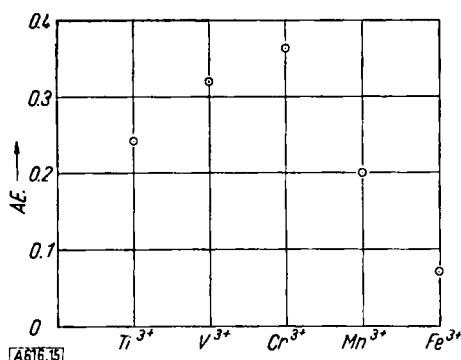


Bild 15. Sonderenergien von Komplexionen

Nun ist das Eisen(III)-Ion auch im strengen Sinne kugelsymmetrisch gebaut und es besitzt keinerlei höhere elektrische Momente. Das der quantentheoretischen Betrachtung zugrunde gelegte Ionenmodell hat aber keinen scharf definierten Radius, die Elektronenwolke erstreckt sich theoretisch ins Unendliche und das hat zur Folge, daß die Gesamtladung, mit der die Liganden in Wechselwirkung stehen, etwas größer als drei positive Einheiten ist. Bei den übrigen Ionen der betrachteten Reihe kommt hinzu, daß sie im Komplex nicht mehr streng kugelsymmetrisch sind, d. h., daß sie elektrische Momente höherer Ordnung besitzen. Durch die Wechselwirkungen dieser höheren Momente mit den Liganden kommt eine zusätzliche Verfestigung gegenüber der bei Fe³⁺ vorliegenden zustande. Es ist nun sehr bemerkenswert, daß die Gesamtverfestigung bei Cr³⁺ einen Maximalwert hat. Damit wird die sonst schwer verständliche Tatsache erklärt, daß gerade bei Cr³⁺ in der Reihe der betrachteten Ionen die Tendenz zur Bildung von Komplexverbindungen besonders ausgeprägt ist.

Die dargestellten Tatsachen veranlassen uns zu der Hoffnung, daß auf dem Wege, den wir theoretisch und experimentell eingeschlagen haben, die Ordnung und das Verständnis von Erscheinungen erreicht werden kann, die in ihrer Mannigfaltigkeit bisher nicht zu übersehen und zu durchschauen waren.

Eingeg. am 28. Mai 1954 [A 616]

Über die Vitamine der B₁₂-Gruppe

Von Prof. Dr. K. BERNHAUER und Dr. W. FRIEDRICH,

unter Mitarbeit von Elisabeth Becher, Dr. Hw. Dellweg und Gisela Gross, Stockstadt (Main)

Biochemisches Forschungs-Laboratorium der Aschaffenburger Zellstoffwerke A.G.*)

Nachdem kürzlich über die Isolierung verschiedener Vitamin-B₁₂-Arten und die Gewinnung des neuen Vitamin-B₁₂-Faktors III aus Faulschlamm berichtet worden war¹⁾, werden nun weitere Einzelheiten über die Aufbereitung und Reindarstellung mitgeteilt. Verschiedene bekannte und neue B₁₂-Arten konnten biosynthetisch erhalten werden. Konstitution und Nomenklatur der Vitamine der B₁₂-Gruppe werden gestreift.

I. Gewinnung von Vitamin B₁₂-Arten aus Faulschlamm

Ausgehend von den Befunden über die Vitamin B₁₂-Aktivität des in einem aeroben Prozeß entstehenden Belebtschlammes²⁾ studierten wir etwa seit Mitte 1952 die Vitamin-B₁₂-Arten des bei der streng anaeroben Ausfäulung (Methan-Gärung) anfallenden Faulschlammes. Die Vitamin-B₁₂-Aktivität entsteht erst während des Ausfäulungsprozesses³⁾.

A. Schema der Faulschlammaufarbeitung

Wir gewinnen die Vitamin-B₁₂-Faktoren des Faulschlammes in folgenden 3 Arbeitsphasen:

1.) Gewinnung des Rohkonzentrates

- Extraktion des Faulschlammes durch Erhitzen und Filtrieren
- Adsorptions- und Elutionsprozesse
- Gewinnung des wäßrigen Eluatkonzentrates ($1/1000$ des ursprünglichen Volumens).

2.) Isolierung des Gemisches der Vitamin-B₁₂-Faktoren

- Extraktion des Eluatkonzentrates mit Phenol in apolaren Lösungsmitteln

- Überführung der B₁₂-Arten in Wasser (Gewinnung einer rubinroten Lösung)

- Ausfällung der B₁₂-Arten mittels p-Chlorphenol an Kieselgur (hochgereinigtes, rotes „Kieselgurpräparat“)

3.) Trennung der einzelnen B₁₂-Arten

- Säulenchromatographie
- Kristallisation der B₁₂-Faktoren II, III und IV.

Bei der Ausarbeitung dieses Reinigungsverfahrens wurden einige grundsätzliche neue Erkenntnisse gewonnen, die hier kurz mitgeteilt werden.

B. Funktion der Phenole bei der Vitamin B₁₂-Gewinnung

Es ist bekannt, daß Phenole als Lösungsmittel für Vitamin B₁₂ dienen können. Das Wesen dieses Prozesses blieb jedoch ungeklärt. Wir prüften daher zahlreiche Phenol-Verbindungen auf ihre Eignung zur Lösung von Vitamin B₁₂, indem wir es im Lösungsmittelpaar Wasser-Trichloräthylen + Phenol-Verbindung verteilten und dabei die Konzentration an Phenol feststellten, bei der, bei gleichem Volumenverhältnis der beiden Phasen, der Verteilungskoeffizient 1 zustande kam. Dies ist optisch leicht möglich. Dabei ergaben sich, abhängig von der Substitution der Phenole, bestimmte Gesetzmäßigkeiten, von denen nur die wichtigsten angeführt seien.

Durch Halogenierung in p- und besonders in m-Stellung wird das Lösungsvermögen der Phenol-Verbindungen sehr verstärkt, durch Halogen in o-Stellung beträchtlich herabgesetzt. Wenn beide o-Stellungen halogeniert sind, so

* Auszug aus einem am 10. 5. 1954 von einem von uns (K. B.) im Medizinisch-Naturhistorischen Verein, Tübingen, gehaltenen Vortrag.

¹⁾ W. Friedrich u. K. Bernhauer, diese Ztschr. 65, 627 [1953].

²⁾ S. R. Hoover, L. Jasewicz, J. B. Pepinsky u. N. Porges, Sew. Ind. Wastes 24, 38 [1952]; V. Kocher u. U. A. Corti, Schweiz. Z. Hydrologie 14, 333 [1952].

³⁾ Über den Verlauf der Bildung der verschiedenen Vitamin-B₁₂-Arten beim „Einfahren“ von Faulbehältern bis zum stationären Zustand im kontinuierlichen Prozeß wird in anderem Zusammenhang berichtet werden.

nimmt das Lösungsvermögen der Phenole noch weiter ab und sie sind bestenfalls nur noch als Schmelze imstande, Vitamin B₁₂ aus Wasser zu extrahieren. Das gleiche gilt für Phenole, bei denen beide o-Stellungen durch Alkyl-Reste substituiert sind.

Phenole können aber auch unter bestimmten Bedingungen den Charakter von Fällungsmitteln für Vitamin B₁₂ besitzen. Wenn man reines kristallisiertes Vitamin B₁₂ in Phenol-gesättigtes Wasser einträgt, so entstehen intensiv rote Öltröpfchen und die Flüssigkeit bleibt völlig farblos. Wir fanden, daß man durch Zusatz von Phenol Vitamin B₁₂ aus wäßriger Lösung in Form eines wasser-unlöslichen öligen Vitamin B₁₂-Phenol-Komplexes praktisch quantitativ ausfällen kann. Wenn man außerdem noch etwas Kieselgur einträgt, so wird dieser Komplex vom Kieselgur aufgenommen. Mit Aceton läßt er sich leicht zerlegen, und das Phenol kann völlig entfernt werden. Man erhält schließlich ein mit Vitamin B₁₂ beladenes Kieselgurpräparat.

Der am Phenol studierte Fällungseffekt konnte auch bei allen anderen grundsätzlich wirksamen Phenol-Verbindungen beobachtet werden. Als besonders geeignet erwiesen sich m- und p-Chlorphenol. Es genügen dabei Mengen, die bemerkenswerterweise unterhalb der Löslichkeit der betreffenden Phenole in Wasser liegen.

Andere Vitamin-B₁₂-Arten verhalten sich grundsätzlich ebenso wie Cyanocobalamin. Ausgehend von Faulschlamm erhält man so ein Kieselgurpräparat, das nun lediglich die Vitamine der B₁₂-Gruppe enthält und mit Vorteil zur chromatographischen Trennung der einzelnen B₁₂-Arten dienen kann.

Ferner konnte die Überführung des Vitamins B₁₂ aus der organischen in die wäßrige Phase wesentlich verbessert werden. Dieser Prozeß bedurfte bisher recht umständlicher und zeitraubender Operationen. Wir fanden, daß die Löslichkeit von Vitamin B₁₂ in Phenol — unabhängig davon ob es sich um unverdünnte Phenole oder um ihre Lösungen in Kohlenwasserstoffen oder Wasser handelt — durch Zusatz einer geringen Menge von Sauerstoff-haltigen polaren Flüssigkeiten, wie z. B. Alkoholen, Äthern, Ketonen, Estern usw., stark herabgesetzt wird. Wenn man z. B. eine Lösung von Vitamin-B₁₂-Faktor III in Trichloräthylen mit 20% p-Chlorphenol mit Wasser ausschüttelt, so bleibt die gesamte B₁₂-Menge in der organischen Phase. Setzt man aber zu dieser Mischung 5–6% der genannten Mittel zu, so geht das Vitamin B₁₂ praktisch quantitativ in die wäßrige Phase über. Die genannten Stoffe wirken dabei als Verdrängungsmittel.

Daß diese Befunde die technische Gewinnung der Vitamin-B₁₂-Arten sehr wesentlich erleichtern und vereinfachen, liegt auf der Hand⁴⁾.

C. Trennung der Vitamin B₁₂-Arten des Faulschlammes, ihre Unterscheidung und Charakterisierung

Der letzte Schritt zur Reinherstellung der verschiedenen Vitamin-B₁₂-Arten des Faulschlammes besteht in ihrer Trennung durch die Säulenchromatographie. Andere Trennmethode, wie die Gegenstromverteilung und Anwendung von Ionenaustauschern, erwiesen sich als weniger geeignet. Die Säulenchromatographie brachte vor allem dann die besten Erfolge, als wir die Adsorptionschromatographie unter Verwendung von Aluminiumoxyd verließen und zur Verteilungschromatographie unter Benützung von Cellulosepulver übergingen. Die Auf-

trennung eines Gemisches der Vitamin-B₁₂-Faktoren gelingt uns heute unter Benützung von wassergesättigtem n-Butanol bereits in wenigen Stunden.

Mit welcher Trennschärfe dieses Verfahren arbeitet, zeigt Bild 1, in dem die Auftrennung eines Gemisches der B₁₂-Faktoren eines Faulschlammes wiedergegeben ist. Ein quantitatives Bild über den Anteil der einzelnen Faktoren am Gesamtgemisch erhält man durch Ermittlung der R-Werte im Cellulosepulver-Chromatogramm und der optischen Dichte der einzelnen Fraktionen im Beckman-Spektrophotometer. Bei den in Gegenwart von Cyanid roten Faktoren II, III und IV mißt man beim Absorptionsmaximum 361 mμ, bei den in Gegenwart von Cyanid

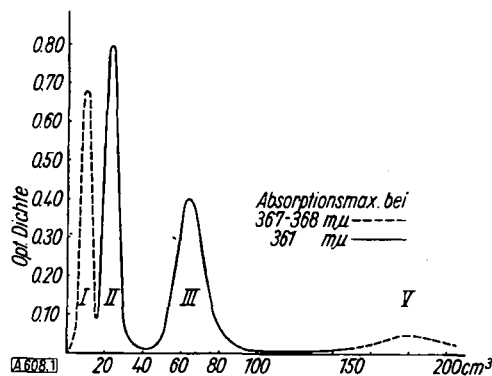


Bild 1
Chromatographische Auftrennung der Vitamin-B₁₂-Arten eines Faulschlammes

violetten Faktoren I und V bei 367 mμ. Auf diese Weise kann der Gehalt eines Faulschlammes an B₁₂-Faktoren qualitativ und quantitativ recht genau ermittelt werden.

Zur Unterscheidung und Charakterisierung der einzelnen Vitamin-B₁₂-Arten eines Faulschlammes dienen folgende Eigenschaften: R-Wert, R_F-Wert, Verteilungskoeffizienten, Absorptionsspektrum, mikrobiologische Aktivität gegenüber der Coli-Mutante, *L. Leichmannii* und *Ochromonas malhamensis*, Verhalten im Kükentest (APF) und gegen perniziöse Anämie. Über die dabei gewonnenen Ergebnisse wurde bereits berichtet¹⁾.

D. Verbreitung der Vitamin B₁₂-Arten in verschiedenen Faulschlamm⁵⁾

Der Gehalt an B₁₂-aktiven Stoffen in verschiedenen Faulschlamm ist sehr unterschiedlich. Bei der bisherigen Untersuchung von Faulschlamm aus über 40 Kläranlagen Westdeutschlands wurden im mikrobiologischen Test folgende Grenzwerte erhalten (bei Trockensubstanzgehalten von 2–20%):

Im nativen Schlamm mg/l	0,1–2,0	} Collimutante	0,1–1,0	} <i>L. Leichmannii</i>
In der Trockensubst. mg/kg	1–30		1–15	
Häufige Werte mg/kg	3–10		2–8	

Die B₁₂-Aktivität im Faulschlamm erreicht demnach manchmal die Größenordnung des B₁₂-Gehaltes der Kulturmedien von gut B₁₂-bildenden Mikroorganismen, die zu meist eine recht diffizile, absolut sterile Gärführung verlangen. Der B₁₂-Gehalt des Faulschlammes entspricht etwa dem des Belebtschlammes (3–9 mg/kg), wenn man den Trockensubstanzgehalt zugrunde legt. Wenn man aber auf nativen Schlamm bezieht, dann ist der Gehalt des Faulschlammes an B₁₂-Faktoren häufig etwa 10 mal so hoch als der des Belebtschlammes (0,02–0,06 mg/l bei 0,3 bis 0,6% Trockensubstanzgehalt).

Die eingehendere Untersuchung zeigte, daß man — abgesehen von den Unterschieden im Gesamtgehalt an B₁₂—

⁴⁾ Über die diesbezüglichen experimentellen Untersuchungen und die Erklärung des Verhaltens von Phenolen gegenüber den Vitaminen der B₁₂-Gruppe soll demnächst ausführlicher berichtet werden.

⁵⁾ Hierüber soll demnächst ausführlicher berichtet werden.

Faktoren — 3 Haupttypen unterscheiden kann, je nachdem, welcher der B₁₂-Faktoren I, II oder III überwiegt.

Besonders bemerkenswert ist, daß der neue B₁₂-Faktor III fast in allen bisher untersuchten Faulschlamm aufgefunden werden konnte. Dies ist um so beachtlicher, als er bisher der Aufmerksamkeit aller Vitamin-B₁₂-Forscher entgangen war.

Andererseits muß darauf hingewiesen werden, daß aus tierischen Fäkalien außer Cyanocobalamin selbst besonders die Pseudofaktoren erhalten wurden. Angesichts der Herkunft unseres Ausgangsmaterials ist es daher überraschend, daß die Pseudofaktoren in den bisher untersuchten Faulschlämmen relativ selten und nur in geringen Mengen vorkommen.

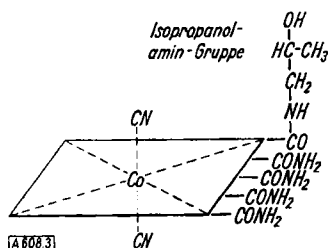
Die Faktoren V fehlen in vielen Faulschlämmen und treten nur selten in größeren Mengen auf.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß in den Faulschlämmen die Faktoren I, II und III weitaus überwiegen. Dies ist ein besonderer Glücksfall, denn alle diese Faktoren sind auch praktisch von Interesse (vgl. unten).

II. Konstitution und Nomenklatur der Vitamine der B₁₂-Gruppe

Die verschiedenartige Bezeichnung der bisher gefundenen Vitamin-B₁₂-Faktoren und Vitamin B₁₂-ähnlichen Substanzen durch Zahlen oder Buchstaben hat zu einem argen Wirrwarr geführt. In Tabelle 1 wird eine rationelle Nomenklatur vorgeschlagen, die die wesentlichen Beziehungen der einzelnen Glieder der Vitamin B₁₂-Gruppe zueinander zum Ausdruck bringt. Die Tabelle enthält zugleich die wichtigsten Merkmale der Vitamin B₁₂-Arten.

Zur allgemeinen Kennzeichnung mag noch folgendes dienen. Das Fehlen der Nucleotid-Gruppe bei den inkompletten Cobalaminen (Ätio-cobalaminen⁹) bedingt, daß sie bereits im neutralen Bereich einen Dicyano-Komplex bilden (violett, Absorptionsmaximum 367 mμ), während die kompletten Cobalamine als Monocyano-Komplexe vorliegen (rot, Absorptionsmaximum 361 mμ). Die kompletten Monocyano-cobalamine verhalten sich elektrophoretisch je nach der vorhandenen Base neutral oder basisch, das violette Dicyanoätiocobalamin (Bild 2) ist neutral, seine orange-farbige Aquo-Form basisch, die Ätiocobalamin-carbonsäuren sind naturgemäß sauer.



Über die Konstitution des B₁₂-Faktors III kann zur Zeit nur soviel gesagt werden, daß er gemäß seinem Verhalten nicht zu den Purin-cobalaminen gehört. Durch Abbau mit Salzsäure oder Perchlorsäure erhält man Ätiocobalamin und farblose Spaltprodukte (eines davon kristallisiert), die weder ein Purin noch 5,6-Dimethyl-benzimidazol enthalten. Die Werte der Elementaranalyse des Faktors III stimmen besser für ein Benzimidazol-cobalamin

⁹) Wir hatten ursprünglich den Namen „Apo-cobalamine“ vorgesehen. Gelegentlich einer Diskussion hierüber hat Doz. Dr. P. Karlson (Tübingen) die oben genannte Bezeichnung vorgeschlagen; dadurch kommt zum Ausdruck, daß es sich um die Grundsubstanz der Vitamin-B₁₂-Gruppe handelt (griech. *αὐρία* = Grund).

als für ein Purin-cobalamin: 55,15% C, 6,27% H, 13,7% N, 2,24% P, 11,62% Asche. Cyanocobalamin enthält 14,63 bzw. 13,13% N, Pseudovitamin B₁₂ 16,90% und Faktor A 16,76% N. Elektrophoretisch verhält sich Faktor III neutral, sein isoelektrischer Punkt liegt übereinstimmend mit dem des Cyanocobalamins bei p_H 1,9⁷). Biologisch verhält er sich grundsätzlich ebenso wie Cyanocobalamin⁸) (vgl. Tabelle 1).

Aus den Purin-cobalaminen konnte durch Abbau Ätiocobalamin erhalten werden. Dadurch war bewiesen, daß sie grundsätzlich gleichartig aufgebaut sind wie Vitamin B₁₂⁹). Diese Substanzen unterscheiden sich offenbar nur durch die verschiedenen Basen des Nucleotid-Anteiles¹⁰).

Zu den Ätiocobalamin-carbonsäuren gehören die Vitamin-B₁₂-Faktoren V. Es handelt sich dabei um Abbauprodukte des Ätiocobalamins (vgl. Bild 2), die durch Abspaltung der Isopropanolamin-Gruppe bzw. von Amid-Gruppen entstehen. Hierbei können bis zu 5 Carboxyl-Gruppen freigesetzt werden. Bei der Papierelektrophorese eines Gemisches der Faktoren V fanden wir 5 Zonen, die jeweils um den gleichen Abstand voneinander getrennt waren, also offenbar je nach der Zahl der Carboxyl-Gruppen. Die Zonen stellen aber zweifellos ein Gemisch einer mehr oder weniger großen Anzahl von Einzelsubstanzen dar. Die mögliche Anzahl der Isomeren ist unten angeführt. Daß zwei Gruppen von Ätiocobalamin-carbonsäuren existieren, und zwar je nachdem, ob die Isopropanolamin-Gruppe noch vorhanden ist oder nicht, konnte wie folgt bewiesen werden: Wenn man das Gesamtgemisch der Ätiocobalamin-carbonsäuren oder der elektrophoretisch aufgetrennten Mischfraktionen der Mono-, Di-, Tri- und Tetra-carbonsäuren amidiert¹¹), so erhält man zwei Substanzen, nämlich das Ätiocobalamin und ein Produkt, das offenbar an Stelle der Isopropanolamin-Gruppe eine Amid-Gruppe besitzt. Diese Substanzen unterscheiden sich durch ihre R-Werte (0,5 und 0,3), sowie dadurch, daß das Ätiocobalamin gegenüber der Coli-Mutante aktiv ist, die Substanz, der offenbar die Isopropanolamin-Gruppe fehlt, aber nicht. Die zur Amidierung verwendeten Ausgangssubstanzen sind gegenüber der Coli-Mutante inaktiv. Bei gleicher Verteilung der Isomeren ist folgender Anteil an durch die Amidierung „reaktivierbaren“ Ätiocobalamin-carbonsäuren zu erwarten (a = „reaktivierbar“, b = nicht „reaktivierbar“):

		a	b
Mono-	5	4 (80 %)	1
Di-	10	6 (60 %)	4
Tri-	10	4 (40 %)	6
Tetra-	5	1 (20 %)	4
Penta-	1	0 (0 %)	1
Summe	31	15 (48,4 %)	16

Hiermit ist die Zahl der Vitamin-B₁₂-Faktoren aber noch nicht erschöpft. Abgesehen von manchen, noch der Aufklärung bedürftigen inkompletten Faktoren und abgesehen von den mannigfachen chemischen Abbauprodukten, wie z. B. den vom Vitamin B₁₂ sich ableitenden Cobalamin-carbonsäuren, die unter Verbleiben der Nucleotid-Gruppe entstehen¹¹), existieren noch weitere natürliche B₁₂-Faktoren, nämlich die vor allem von englischen Autoren aus tierischen Faeces isolierten Faktoren C₁ und C₂ (B_{12s}), D, E und F, die sich in die Tabelle 1 nicht einordnen lassen,

⁷) Nach Untersuchungen von H. Lundin u. Brohult (Stockholm).

⁸) Hierüber soll demnächst a.a.O. ausführlicher berichtet werden.

⁹) D. E. Grant, E. Lester Smith u. L. F. J. Parker, Biochemic. J. (Proc.) 56, XXXIII [1954].

¹⁰) Hinsichtlich Pseudovitamin B₁₂ vgl. H. W. Dion, D. G. Calkins u. J. J. Pfiffner, J. Amer. chem. Soc. 74, 1103 [1952]; Pseudovitamin B_{12d}; dieselben, ebenda 76, 948 [1954]; Faktoren A, G und H: F. B. Brown u. E. Lester Smith, Biochemic. J. (Proc.) 56, XXXIV [1954].

¹¹) Nach der Methode von J. B. Armitage, J. R. Cannon, A. W. Johnson, L. F. J. Parker, E. Lester Smith, W. H. Stafford u. A. R. Todd, J. Chem. Soc. [London] 1953, 3849.

Neue Nomenklatur		Bisherige Bezeichnung	Unterscheidungsmerkmale ¹⁾																						
Allgemein Rationelle Bezeichnung			physikalisch-chemische						biologische (Aktivität)																
			Abs. Max. u. Farbe	elektrophoretisch ^{2a)}	R-Wert ²⁾	R _F -Wert ³⁾	Verteil.-Koeff. 1 ⁴⁾		Coli-Mutante ^{5a)}	L. Leichmannii	Euglena gracilis	Ochrom. Malh.	Kücken (APF)	pernici. Anämie											
A	B																								
Komplette (nucleotidhaltige) Cobalamine	Benzimidazol-cobalamine	5,6-Dimethylbenzimidazol-cobalamin	Vitamin B ₁₂ , α-Cobalamin, „B ₁₂ -Faktor II“	neutral	0,25	0,19	24,0	7,8	+	+	+	+	+	+											
		5-Methylbenzimidazol-cobalamin ⁵⁾													—	0,25	0,19	28,0	8,6	+	+		+		
		Benzimidazol-cobalamin ⁵⁾													—	0,17	0,17	31,0	9,4	+	+		+		
	Purin-cobalamine	—	„B ₁₂ -Faktor III“	neutral	0,10	0,15	34,0	12,3	+	+		+		+											
		Adenin-cobalamin	ψ-Vitamin B ₁₂ β-Cobalamin Vitamin B ₁₂ f ⁶⁾ „B ₁₂ -Faktor IV“	basisch		0,08	38,0		+	+	+	0	0	0											
		2-Methyladenin-cobalamin	B ₁₂ -Faktor A ω-Cobalamin Vitamin B ₁₂ m ψ-Vitamin B ₁₂ d						+	+	+	0	0	0											
		Hypoxanthin-cobalamin	B ₁₂ -Faktor G	neutral					+	(+)															
		2-Methylhypoxanthin-cobalamin	B ₁₂ -Faktor H						+	(+)															
	Ätio-cobalamine	Ätio-cobalamin	B ₁₂ -Faktor B „B ₁₂ -Faktor I“	neutral	0,5	0,25	16,0 ⁷⁾ 40,0	7,8 ⁷⁾ 8,4	+	0	0	0	0	0	0										
mit Isopropanolamin-Gruppe		„B ₁₂ -Faktoren V“ ⁸⁾	sauer	9)	10)	11)	12)	0	0	0	0	0	0												
ohne Isopropanolamin-Gruppe																									

Tabelle 1. Nomenklatur und Unterscheidungsmerkmale der Vitamine der B₁₂-Gruppe

- ¹⁾ + = aktiv, (+) = schwach aktiv, 0 = inaktiv, freie Rubriken = nicht geprüft.
^{2a)} In m/100 Phosphat-Puffer + 0,005 % CN⁻ bei p_H 6,5.
^{2b)} In der Cellulose-Säule, Entwickler wassergesättigtes n-Butanol.
³⁾ Auf Whatmann-I-Papier, Entwickler wassergesättigtes sek. Butanol, aufsteigend, etwa 12 h.
⁴⁾ Im System A: n-Butanol/Ammonsulfat in Wasser. — Im System B: Wasser/p-Cl-Phenol in Trichloräthylen. — Die Zahlen bedeuten Proz.-Gehalt an Ammonsulfat bzw. p-Cl-Phenol, bei dem der Verteil.-Koeff. = 1 ist.
^{5a)} Im Röhrchen-Test.

- ^{5b)} Biosynthetisch gewonnen (vgl. unten).
⁶⁾ Mischung mit B₁₂-Faktor A.
⁷⁾ Die oberen Werte mit, die unteren ohne CN⁻.
⁸⁾ Hierher könnten auch die sauren Faktoren D und E gehören; dagegen ist die Einordnung der sauren Faktoren C₁ und C₂ (B₁₂s) noch fraglich, da sie mikrobiologisch schwach aktiv sind.
⁹⁾ Zwischen 0,1–0,04; einheitliche Substanzen liegen noch nicht vor.
¹⁰⁾ Zwischen 0,03–0,07.
¹¹⁾ In einem Fall mit CN⁻ 38,0; ohne CN⁻ 43,0.
¹²⁾ In einem Fall mit CN⁻ 20,5; ohne CN⁻ 17,0.

da sie noch zu wenig untersucht sind. Einen weiteren, nach seinem Verhalten als „komplett“ anzusehenden Faktor mit interessanten neuartigen Eigenschaften konnten wir in kleiner Menge bei der chromatographischen Fraktionierung der Ätiocobalamin-carbonsäuren aus Faulschlamm finden. Es ist daher noch mit weiteren Überraschungen zu rechnen. Ferner sind wir damit beschäftigt, der Frage der Peptid-Konjugate¹²⁾ mit einer einwandfreien präparativen Methode näher nachzugehen.

III. Biosynthese von Vitamin B₁₂-Arten

Ausgehend von der Überlegung, warum das Ätio-cobalamin im Test mit der Coli-Mutante wirksam ist, nicht aber bei *L. Leichmannii*, fanden wir, daß durch Einwirkung der Coli-Mutante auf das Ätio-cobalamin ein kompletter, nun gegen *L. Leichmannii* wirksamer B₁₂-Faktor entsteht. Die dabei offenbar stattfindende Biosynthese geht viel besser vor sich, wenn außer Ätio-cobalamin auch noch 5,6-Dimethylbenzimidazol dem Medium zugesetzt wird^{13, 14)}.

Ein Coli-Wildstamm besaß mindestens das gleiche Synthese-Vermögen wie die Coli-Mutante. In größeren präparativen Versuchen bewiesen wir, daß auf diese Weise tatsächlich 5,6-Dimethylbenzimidazol-cobalamin gebildet wird. Das entstandene Produkt wurde durch die R- und R_F-Werte, Verteilungskoeffizienten usw. identifiziert. Die Umwandlungsrate des Ätio-cobalamins betrug gegen 50%.

Auf dieser Basis aufbauend gelang uns auch die biosynthetische Verwertung anderer Vorstufen und so die Synthese neuer Vitamin-B₁₂-Arten. Die Beweise hierfür haben wir in größeren präparativen Versuchen (bis zum Ausmaß von 200 l) erbracht, die betreffenden Substanzen durch Säulenchromatographie isoliert und durch ihre R- und R_F-Werte sowie Verteilungskoeffizienten charakterisiert. Die in den ursprünglichen Kleinversuchen mit der papierchromatographischen und bioauxanographischen Methode gewonnenen Ergebnisse erschienen uns nicht genug verläßlich und sind im folgenden nicht berücksichtigt; zu beachten ist nämlich, daß manchmal auch etwas übliches Vitamin B₁₂ und die Faktoren C entstehen.

¹³⁾ Vgl. dazu K. Hausmann, Klin. Wschr. 31, 1017 [1953].

¹⁴⁾ Dtsch. Pat.-Anm. A 19472 IVa/30h vom 11. I. 1954.

¹⁵⁾ Über ähnliche Befunde berichteten J. E. Ford u. E. S. Holdsworth, J. Biochem. (Proc.) 56, XXXV [1954].

Nicht alle geprüften Precursor führen zu neuen B_{12} -Vitaminen, es ergaben sich vielmehr bestimmte Gesetzmäßigkeiten:

5,6-Dimethyl-benzimidazol ^{15a}) ++	5,6-Diäthyl-benzimidazol ^{15c}) ++
5-Methyl-benzimidazol ^{15b})	++	5,6-Dichlor-benzimidazol ^{15a})	0
Benzimidazol	++	5-Nitro-benzimidazol ^{15d})	0
1,5,6-Trimethyl-benzimidazol ^{15b})	0	5-Chlor-6-methyl-benzimidazol ^{15c})	(+)
2-Methyl-benzimidazol ^{15b})	0	Benzimidazol-5-carbonsäure ^{15d})	0
2,5-Dimethyl-benzimidazol ^{15b})	0	Benzimidazol-5-carbonsäureamid	++
2,5,6-Trimethyl-benzimidazol ^{15b})	0	1,2-Diamino-4,5-dimethylbenzol ^{15c})	++
2-Phenyl-benzimidazol	0	3,4-Diamino-toluol	+
Benzimidazol	0	o-Phenylendiamin	+
4-Methyl-benzimidazol ^{15b})	0	3,4-Diamino-benzoesäure ^{15d})	0
4,5-Dimethyl-benzimidazol ^{15c})	0		
4,6-Dimethyl-benzimidazol ^{15c})	++		
4,5,6,7-Tetramethyl-benzimidazol ^{15c})	0		

In der Benzimidazol-Reihe konnten folgende Gesetzmäßigkeiten über die Verwertung verschiedener Precursor¹⁶) aufgefunden werden, die aber nicht Allgemeingültigkeit haben müssen, sondern zunächst streng genommen nur für den von uns benutzten *Coli*-Stamm gelten, und zwar:

1.) Am besten wird 5,6-Dimethyl-benzimidazol verwertet, das zum üblichen Vitamin B_{12} führt. 5-Methyl-benzimidazol und Benzimidazol werden etwas schwächer verwertet.

2.) Durch Besetzung des N_1 im 5,6-Dimethyl-benzimidazol durch eine Methyl-Gruppe wird die Vitamin- B_{12} -Synthese verhindert, offenbar kann die Methyl-Gruppe nicht eliminiert werden.

3.) Wenn die 2-Stellung im Benzimidazol besetzt ist (zumindest durch Methyl, Phenyl oder OH), so findet keine Vitamin- B_{12} -Synthese statt (Beispiele vgl. oben).

4.) Eine Methyl-Gruppe in 4-Stellung hemmt oder vermindert die Vitamin- B_{12} -Synthese (4-Methyl-benzimidazol wird nicht verwertet). Die hemmende Wirkung der 4-Methyl-Gruppe kann aber durch eine Methyl-Gruppe in 6-Stellung aufgehoben werden (4,6-Dimethyl-benzimidazol wird verwertet), nicht aber durch eine in 5-Stellung (4,5-Dimethyl- und 4,5,6,7-Tetramethyl-benzimidazol werden nicht verwertet). Die betreffenden Trimethyl-Produkte sind noch zu untersuchen.

5.) 5,6-Diäthyl-benzimidazol wird sehr gut verwertet. Benzimidazole mit anderen 5,6-Alkyl-Gruppen müssen noch geprüft werden.

6.) Negative Substituenten in 5- bzw. 6-Stellung hemmen die Verwertbarkeit (5,6-Dichlor-, 5-Nitro- und 5-Carboxy-benzimidazol werden nicht verwertet) oder setzen sie stark herab (5-Chlor-6-methyl-benzimidazol wird schwach verwertet). Durch Amidierung der Carboxyl-Gruppe geht der negative Charakter verloren; vielleicht hängt damit zusammen, daß Benzimidazol-5-carbonsäureamid gut verwertet wird.

Die zu den Benzimidazolen zugehörigen Phenylendiamine können — insofern die betreffenden Benzimidazole selbst verwertbar sind — gleichfalls zur Biosynthese von Vitamin B_{12} -Arten dienen, allerdings in etwas geringerem Ausmaß.

Unter den geprüften Purinen (Adenin, Guanin und Hypoxanthin) und Pyrimidinen (Uracil, Cytidin und Thymin) wurde lediglich Adenin schwach verwertet¹⁴), die anderen erwiesen sich als unwirksam.

Ein Vergleich der Eigenschaften von 2 neuen biosynthetischen Benzimidazol-cobalaminen (vgl. Tabelle 1) zeigt, daß sie sich durch die R - und R_f -Werte kaum unterscheiden lassen, sehr deutlich aber durch die Vertei-

lungskoeffizienten, besonders unter Benützung des Lösungsmittelpaares n -Butanol/wäßrige Ammonsulfat-Lösung. Der zur Erzielung des Verteilungskoeffizienten 1 erforderliche Gehalt an Ammonsulfat ist bei den drei Benzimidazol-cobalaminen deutlich verschieden, und zwar in durchaus gesetzmäßiger Weise, denn je hydrophiler die Substanz ist (je weniger Methyl-Gruppen sie also enthält), desto mehr Ammonsulfat wird benötigt, sie in die organische Phase zu drängen. Sinngemäß ist umgekehrt umso mehr p -Chlorphenol erforderlich, den betreffenden B_{12} -Faktor der wäßrigen Phase zu entziehen, je hydrophiler er ist.

Bei der Prüfung der biologischen Aktivität erwiesen sich die beiden neuen Benzimidazol-cobalamine — bezogen auf äquivalente Mengen (gemessen im Beckman-Spektrophotometer) — gegenüber der *Coli*-Mutante und *L. Leichmannii* als ebenso aktiv wie das übliche Cyanocobalamin. Besonders aufschlußreich war das Ergebnis des Ochromonas-Testes¹⁷). Wie Bild 3 zeigt, sind beide neuen Cobalamine auch in diesem Test praktisch ebenso

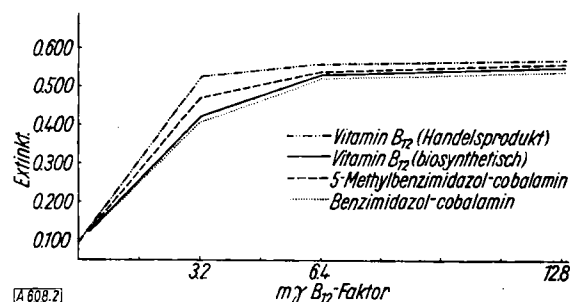


Bild 3
Ochromonas-Test mit Benzimidazol-Cobalaminen

aktiv wie das bekannte Vitamin B_{12} (die kleinen Differenzen sind kaum signifikant und dürften damit zusammenhängen, daß die biosynthetischen Produkte noch nicht ganz rein waren). Die klinische Prüfung bei perniziöser Anämie wird zeigen, ob der Ochromonas-Test der anti-perniziösen Wirkung auch in diesen Fällen parallel läuft.

Unter Verwendung von ruhenden Zellen gelingt die Biosynthese noch besser¹⁸). Es ist so möglich, mit weitaus größeren Bakterienmengen zu arbeiten und ebenfalls höhere Konzentrationen an Ätio-cobalamin und Precursoren anzuwenden. Dadurch gelangt man zu höheren Umsätzen in kürzerer Zeit und — was besonders wichtig ist — auch in schwierigeren Fällen. Außerdem wird durch die höheren Konzentrationen die präparative Aufarbeitung erleichtert.

Versuche unter Verwendung von markierten Precursoren sind in Vorbereitung¹⁸), ebenso Versuche zur Prüfung der Frage, ob u. U. auch mit Hilfe von Enzympräparaten ein Nucleotid mit Ätio-cobalamin in Gegenwart einer geeigneten Energiequelle verknüpfbar ist.

Für die Mitwirkung bei den Versuchen haben wir Dr. V. Dittrich, Frl. R. Eitel, Frl. A. Habermann, Frl. H. Redecker, Frau U. Schattmann und S. Spaude zu danken.

Eingeg. am 26. Mai 1954 [A 608]

¹⁵) Für die freundliche Überlassung von Präparaten danken wir Prof. Dr. F. Weygand, Tübingen (15a), den British Drug Houses Ltd., London (15b) und Dr. K. Folkers, Merck & Co., Inc., Rahway, USA (15c), von Ausgangssubstanzen für Synthesen den Farbenfabriken Bayer, Leverkusen (15d).

¹⁶) Dtsch. Pat.-Anm. A 19703 1Va/30h vom 16. 2. 1954.

¹⁷) Nach der Methode von J. E. Ford, Brit. J. Nutrition 7, 299 [1953]. Wir danken dem Autor sowie Dr. E. Lester-Smith für die freundliche Überlassung von Testkulturen.

¹⁸) Kürzlich konnten F. Weygand, H. Klebe u. A. Trebst (Z. Naturforsch. 9b, i.Dr. [1954]) zeigen, daß 5,6-Dimethylbenzimidazol-2-¹⁴C von *Strept. olivaceus* ohne Zusatz von Ätio-cobalamin zur Vitamin- B_{12} -Synthese verwertet werden kann.