

Aus der methanolisch-ätherischen Mutterlauge erhielt man durch Zugabe von 5 ccm Äther nochmals 80 mg (7.4%) Hydrochlorid vom Schmp. 245–260°; aus wenig absol. Alkohol farblose Nadeln vom konst. Schmp. 263–265°. Eine Mischprobe mit dem reinen, bei 287–288° schmelzenden Hydrochlorid von II schmolz bei 263–265°.

$C_{18}H_{18}ON_2 \cdot HCl$  (314.8) Ber. C 68.67 H 6.08 Gef. C 68.67 H 6.11

Aus der wäßrigen Lösung dieses Hydrochlorids erhält man mit Alkali eine in farblosen Blättchen kristallisierende Base vom Schmp. 183–184°; aus 96-proz. Alkohol Schmp. 184–185°. Diese Base, die das wahrscheinlich schon reine, andere Diastereomere von II darstellt, gibt mit der Base vom Schmp. 210–211° eine Schmp.-Erniedrigung und besitzt das gleiche UV-Spektrum wie diese Substanz.

### 362. Wilhelm Friedrich und Konrad Bernhauer: Beiträge zur Chemie und Biochemie der „Cobalamine“, II. Mitteil.<sup>1)</sup>: Über den Abbau der „Cobalamine“ mit Cer(III)-hydroxyd. 7-[D-Ribofuranosido]-adenin, ein Abbauprodukt des Pseudovitamins B<sub>12</sub>

[Aus dem Biochemischen Forschungslaboratorium der Aschaffenburg  
Zellstoffwerke A.G., Stockstadt a. M.]

(Eingegangen am 19. Juli 1956)

Unter der katalytischen Wirkung des Cer(III)-hydroxyds in wäßrigem Medium bei 95° und neutralem  $p_H$  werden die meisten Vitamine der B<sub>12</sub>-Gruppe rasch zu Ätiocobalamin, Nucleosid und Phosphorsäure abgebaut. Ein Zusatz von  $CN^\ominus$  beschleunigt den Abbau und beseitigt weitgehend die Unterschiede in der Abbaugeschwindigkeit der einzelnen B<sub>12</sub>-Arten. Der Cer-Abbau ist eine sehr schonende Methode zur Gewinnung von reinstem Ätiocobalamin und vor allem von schwer zugänglichen Nucleosiden der B<sub>12</sub>-Faktoren. Das Nucleosid des Pseudovitamins B<sub>12</sub> wird in kristallisiertem Zustand gewonnen und als 7-[D-Ribofuranosido]-adenin charakterisiert.

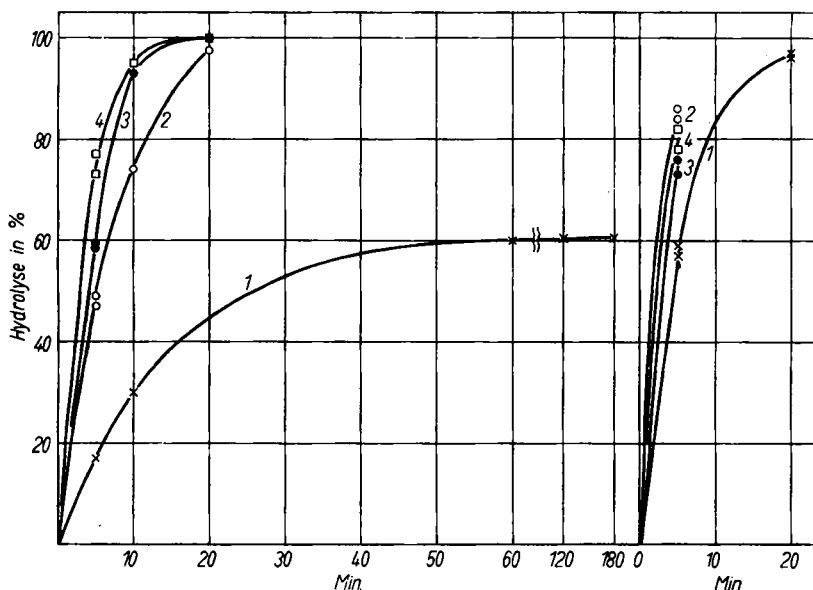
E. Bamann und Mitarbb.<sup>2)</sup> sowie M. Shimomura und F. Egami<sup>3)</sup> zeigten, daß unter der katalytischen Wirkung von Hydroxyden der Seltenen Erden unter milden Bedingungen ( $p_H$  8–9) zahlreiche physiologisch wichtige Phosphorsäureverbindungen gespalten werden. Wie wir zeigen konnten<sup>4)</sup>, lassen sich das Nucleotid des B<sub>12</sub>-Faktors III sowie Vitamin B<sub>12</sub> und Faktor III mittels der Hydroxyde der Seltenen Erden, vor allem des Cers, katalytisch spalten unter Bildung von Ätiocobalamin (Faktor B, Faktor I), Phosphat und Nucleosid. Unsere seinerzeitige Arbeitsweise, die den Versuchen anderer Autoren mit Nucleinsäuren und verschiedenen einfacheren Phosphorsäureverbindungen angeglichen war (Verwendung von Puffersubstanzen vom  $p_H$  8–9), eignete sich zwar für die Spaltung der Nucleotide der B<sub>12</sub>-Vitamine, der Abbau von B<sub>12</sub>-Arten selbst ging jedoch sehr langsam vor sich, auch wenn bei 95° gearbeitet wurde.

<sup>1)</sup> I. Mitteil.: W. Friedrich u. K. Bernhauer, Chem. Ber. **89**, 2030 [1956].

<sup>2)</sup> E. Bamann u. M. Meisenheimer, Ber. dtsch. chem. Ges. **71**, 1711, 1980 [1938]; E. Bamann, F. Fischler u. H. Trapmann, Biochem. Z. **325**, 413 [1954]; E. Bamann, H. Trapmann u. F. Fischler, ebenda **326**, 89 [1954]; E. Bamann, Dtsch. Apotheker-Ztg. **94**, 528 [1953]. <sup>3)</sup> Bull. chem. Soc. Japan **26**, 263 [1953].

<sup>4)</sup> W. Friedrich u. K. Bernhauer, Z. Naturforsch. **9b**, 685 [1954].

Eingehendere Versuche zeigten nun, daß der Abbau der  $B_{12}$ -Arten mittels Cerhydroxyds ein  $p_H$ -Optimum unterhalb von 7 hat und daß die Spaltungsgeschwindigkeit sehr beträchtlich erhöht wird, wenn zum Reaktionsmedium, das das betreffende Cer(III)-Salz enthält, statt des bisher üblichen alkalischen Puffers etwas weniger als die stöchiometrische Menge an NaOH zugegeben wird. Dieses Medium hat nach beendeter Reaktion ein  $p_H$  von ca. 5. Eine weitere Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit erzielten wir durch Arbeiten in möglichst hoher Konzentration und durch Erhöhung des Mol.-Verhältnisses von Cer-Salz zu  $B_{12}$ -Art. So konnten wir eine quantitative Spaltung von Pseudovitamin  $B_{12}$ , Faktor A und Faktor III innerhalb von 20 Min. erzielen. Der Abbau von Vitamin  $B_{12}$  ging jedoch nicht über 60 % hinaus (Abbild. 1).



Abbild. 1. Hydrolyse von Vitamin  $B_{12}$  (1), Faktor III (2), Faktor A (3) und Pseudovitamin  $B_{12}$  (4) mit Cer(III)-hydroxyd ohne  $CN^-$ -Zusatz (links) und mit  $CN^-$ -Zusatz (rechts). Je Versuch wurden 7.84 mg der  $B_{12}$ -Art, in 1.0 ccm Wasser gelöst, mit 0.6 ccm einer 0.333  $m$  Lösung von  $Ce(NO_3)_3 \cdot 6 H_2O$ , 0.5 ccm 1  $n$  NaOH und (in der einen Versuchshälfte) 0.03 ccm einer 10-proz. wäßrigen HCN-Lösung versetzt und im verschlossenen Rohr im Wasserbad (95°) geschüttelt. Der Reaktionsverlauf wurde papierchromatographisch und papierelektrophoretisch durch Bestimmung der Menge an entstandenem Ätiocobalamin verfolgt

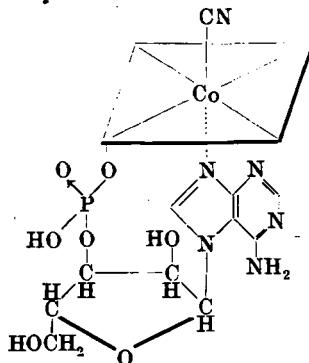
Die relativ langsame Spaltung von Vitamin  $B_{12}$  durch das sonst so wirksame De-phosphorylierungssystem kann nur durch eine weitgehende „Maskierung“ des Nucleotides erklärt werden. Im Raummodell des Vitamins  $B_{12}$  ist das Nucleotid weitgehend von den Atomgruppen des porphyrinähnlichen Grundkomplexes umschlossen, es befindet sich also größtenteils in der „inneren Sphäre“ des Komplexes. Aus den Abbauversuchen mit Cerhydroxyd muß geschlossen werden, daß die Nucleotide der übrigen  $B_{12}$ -Faktoren weniger maskiert sind (sie gehören also in höherem Maße der „äußeren Sphäre“ des Komplexes an, als dies im Vitamin  $B_{12}$  der Fall ist). Das Ausmaß, in dem das Nucleotid der

betreffenden  $B_{12}$ -Art der inneren bzw. äußeren Sphäre des Komplexes angehört, kann nur von der Bindungsstärke zwischen dem Kobaltatom und dem Imidazolstickstoff abhängen. Daß die Stärke dieser Bindung in der Reihenfolge Vitamin  $B_{12}$ , Faktor III, Purin-cobalamine abnimmt, läßt sich qualitativ bereits im Papierchromatogramm zeigen, wenn mit einem bestimmten  $CN^{\ominus}$ -Überschuß entwickelt wird: Bei gewisser  $CN^{\ominus}$ -Konzentration wandert Vitamin  $B_{12}$  als roter Fleck (Monocyanokomplex) und die übrigen Faktoren als violette Flecke (Dicyanokomplexe); bei geringerem  $CN^{\ominus}$ -Überschuß wandern Vitamin  $B_{12}$  und Faktor III als rote, die Purin-cobalamine als violette Flecke; bei weiterer Verminderung der  $CN^{\ominus}$ -Konzentration wandern alle  $B_{12}$ -Arten als rote Flecke. In den Dicyanokomplexen ist die Bindung zwischen dem Kobaltatom und dem Imidazolstickstoff gelöst<sup>1)</sup>, und diese Spaltung geht, wie wir bereits aus den einfachen papierchromatographischen Versuchen entnehmen, am schwierigsten beim Vitamin  $B_{12}$  und am leichtesten bei den Purin-cobalaminen vor sich. Daß in den Dicyanokomplexen der  $B_{12}$ -Vitamine das Nucleotid praktisch der äußeren Sphäre des Komplexes angehört, geht aus den Methylierungsversuchen an Faktor III und Vitamin  $B_{12}$  hervor<sup>1)</sup>.

Es konnte danach erwartet werden, daß die Cer-Spaltung der Vitamine der  $B_{12}$ -Gruppe (und vor allem die des Vitamins  $B_{12}$ ) durch Zusatz von  $CN^{\ominus}$  beschleunigt werden kann. Diese Erwartung erfüllte sich vollkommen, und wir erhielten in Ansätzen, in denen auf 1 Mol. der  $B_{12}$ -Art 20 Moll. HCN kamen, eine praktisch quantitative Spaltung von Vitamin  $B_{12}$  in 20 Min. (Abbild. 1).

Wir gingen anschließend dazu über, Pseudovitamin  $B_{12}$  in präparativem Maßstab mit Cerhydroxyd zu spalten, vor allem um das Nucleosid zu gewinnen und zu charakterisieren.

Über den Nucleotidanteil des Pseudovitamins  $B_{12}$ <sup>5)</sup> war bis jetzt nur bekannt, daß er an Stelle des 5,6-Dimethyl-benzimidazols (im Vitamin  $B_{12}$ ) Adenin enthält<sup>6)</sup>. Von besonderem Interesse war die Frage nach der Struktur des Nucleosides, von dem als Folge der Strukturforschung des Vitamins  $B_{12}$ <sup>7)</sup> die Konfiguration 7- $\alpha$  verlangt wird<sup>8)</sup>, wogegen alle bisher in der Natur aufgefundenen Purinnucleoside die Konfiguration 9- $\beta$  haben. Die  $\alpha$ -glykosidische Bindung wurde auch im Nucleosid des Vitamins  $B_{12}$ <sup>9)</sup> und des Faktors III<sup>10)</sup> gefunden. Die Forderung nach der 7- $\alpha$ -glykosidischen Bindung im Pseudovitamin  $B_{12}$  erscheint auf Grund des nebenstehenden Formelbildes verständlich. Darin liegt die Ebene des Riboseringes



<sup>5)</sup> J. J. Pfiffner, D. G. Calkins et al., Abstr. of 120<sup>th</sup> Meeting of Amer. chem. Soc., New York, 1951, 23 C.

<sup>6)</sup> H. W. Dion, D. G. Calkins u. J. J. Pfiffner, J. Amer. chem. Soc. 74, 1108 [1952].

<sup>7)</sup> D. C. Hodgkin, J. Pickworth, J. H. Robertson, K. N. Trueblood, R. J. Prosen u. J. G. White; R. Bonnet, J. R. Cannon, A. W. Johnson, I. Sutherland, A. R. Todd u. E. L. Smith, Nature [London] 176, 325, 328 [1955].

<sup>8)</sup> D. C. Hodgkin, s. dazu Biochemical Society Symposia No. 13, "The Biochemistry of Vitamin  $B_{12}$ ", Cambridge, University Press 1955, S. 28, Fußnote.

<sup>9)</sup> N. G. Brink, F. W. Holly, C. H. Shunk, E. W. Peel, J. J. Cahill u. K. Folkers, J. Amer. chem. Soc. 72, 1866 [1950].

<sup>10)</sup> C. H. Shunk, F. M. Robinson, J. E. McPherson, M. M. Gasser u. K. Folkers, J. Amer. chem. Soc. 78, 3228 [1956].

senkrecht zur Ebene des Adenins und die Aminogruppe des Adenins aus sterischen Gründen dem kobalthaltigen Grundkomplex abgewandt.

Die Gewinnung der Nucleoside aus den Purin-cobalaminen wurde bisher teils mangels einer geeigneten Methode teils mangel's an Ausgangsmaterial noch nicht in Angriff genommen. Die sehr säurelabile glykosidische Bindung wird bereits unter den Bedingungen der Abspaltung des Nucleotides gelöst. Alkalische Abbaubedingungen, die übrigens das Ätiocobalamin unter Spaltung der Säureamidbindungen angreifen, wurden bisher nicht näher untersucht. Die äußerst schonende Hydrolyse mit Cerhydroxyd erschien daher für diesen Prozeß besonders geeignet. Nach der Einwirkung des Cerhydroxyds auf Pseudovitamin B<sub>12</sub> trennten wir die Hydrolyseprodukte im Prinzip nach der Methode von W. E. Cohn<sup>11)</sup> und Todd u. a.<sup>12)</sup> unter Benutzung des stark basischen Austauschers Dowex-2 in der Formiatform. Dabei wurde Ätiocobalamin von einer bei 271 m $\mu$  absorbierenden Fraktion getrennt, die durch Chromatographie an dem carboxylhaltigen Austauscher Amberlite IRC-50 weiter gereinigt wurde. Aus der bei 271 m $\mu$  absorbierenden Fraktion kristallisierten farblose Rhomboide vom Schmp. 218–222°.

Beim Erhitzen in 0.05 *n* HCl auf 100° während 15 Min. wurde die Substanz zu Adenin und D-Ribose gespalten. Das Adenin wurde durch Papierchromatographie und durch Ermittlung des Absorptionsspektrums<sup>13)</sup> bei  $p_H$  1 und  $p_H$  8, die Ribose durch Papierchromatographie<sup>14)</sup> nachgewiesen. Nach Entwicklung mit (1) Butanol-Essigsäure-Wasser bzw. mit (2) Butanol-Äthanol-Wasser-NH<sub>3</sub> und Besprühen mit Anilinphthalat wurden Flecke mit den  $R_F$ -Werten (1) 0.31 und (2) 0.22 beobachtet. D-Ribose (Handelspräparat) hatte die gleichen  $R_F$ -Werte. Die quantitative Verfolgung der Säurehydrolyse ergab, daß aus 1 Mol. der Substanz (267.2) 1 Mol. Adenin (spektrophotometrisch bestimmt) und 1 Mol. Ribose (bestimmt mit Hilfe der Orcin-Reaktion<sup>15)</sup>) gebildet werden. 1 Mol. der Substanz verbraucht in wäßriger Lösung während 5 bzw. 20 Min. 0.99 bzw. 1.02 Moll. Perjodat<sup>16)</sup>, der Stickstoffgehalt entspricht dem erwarteten. Durch diese Eigenschaften wurde die Substanz als ein Adenin-ribofuranosid charakterisiert. Sie unterscheidet sich jedoch eindeutig vom Adenosin durch Schmelzpunkt, Kristallform (Adenosin kristallisiert aus Wasser in feinen Nadeln), optische Drehung ( $[\alpha]_D$ : 0° in Wasser;  $c$  = 0.262), chromatographisches Verhalten ( $R_{\text{Adenosin}}$  = 0.55; aufsteigend, Whatman-1-Papier, Entwicklungsdauer 24 Stdn., Entwickler wassergesättigtes *n*-Butanol) und Absorptionsspektrum (vergl. Tafel 1 und Abbild. 2).

Ihr Absorptionsspektrum (Abbild. 2) ähnelt dem des 7-Methyl-adenins<sup>17)</sup>, woraus ersichtlich ist, daß das Ribosemolekül nicht am N<sup>9</sup>, sondern am N<sup>7</sup>

<sup>11)</sup> J. Amer. chem. Soc. **72**, 1471 [1950]; Ann. N.Y. Acad. Sci. **57**, 204 [1953].

<sup>12)</sup> W. Andersen, C. A. Dekker u. A. R. Todd, J. chem. Soc. [London] **1952**, 2721.

<sup>13)</sup> E. Chargaff u. J. N. Davidson, The Nucleic Acids, Academic Press Inc., Publ., New York 1955.

<sup>14)</sup> F. Cramer, Papierchromatographie, 2. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., 1953, S. 69–72.

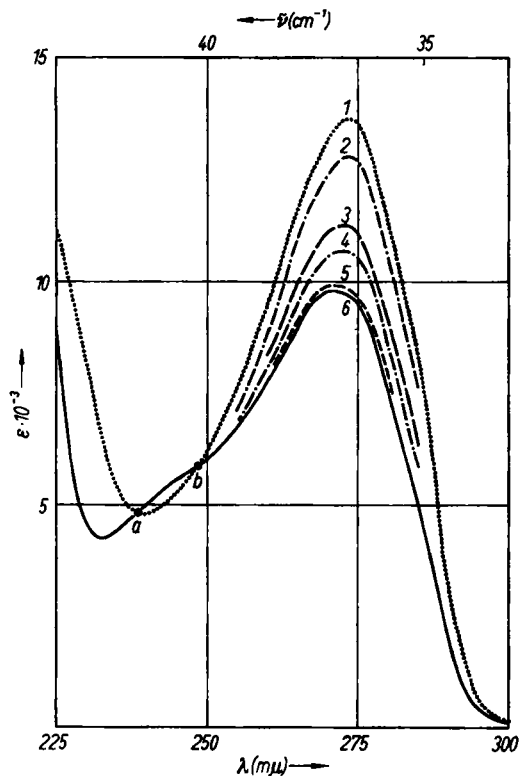
<sup>15)</sup> D. Glick, Methods of Biochemical Analysis, Interscience Publ., New York, Vol. I, 1954.

<sup>16)</sup> l.c.<sup>15)</sup>, Vol. III, 1956.

<sup>17)</sup> J. M. Gulland u. E. R. Holiday, J. chem. Soc. [London] **1936**, 765.

Tafel I. Identifizierung des Ribosides aus Pseudovitamin B<sub>12</sub> durch Vergleich seiner UV-Absorptionsmaxima mit denen verwandter Substanzen

Substanz	$\lambda$ in $m\mu$		$\epsilon \cdot 10^{-3}$	
	0.05 $n$			
	HCl	NaOH	HCl	NaOH
Nucleosid aus $\psi$ -B <sub>12</sub> .....	273	271	13.6	9.8
7-Methyl-adenin <sup>17)</sup> .....	269	269	14.6	11.4
Adenosin <sup>17)</sup> .....	260	260	14.2	14.3
9-Methyl-adenin <sup>17)</sup> .....	260	260	14.2	14.7



Abbild. 2. Absorptionsspektrum des Nucleosides aus Pseudovitamin B<sub>12</sub> in 0.1–0.001  $n$  HCl (1), in 0.05  $m$  Glykokollpuffer,  $p_H$  3.4 (2), in 0.05  $m$  Acetat-Essigsäure-Puffer,  $p_H$  4.1 (3),  $p_H$  4.4 (4),  $p_H$  5.0 (5), in Wasser sowie in 0.15  $m$  NH<sub>4</sub>Cl–NH<sub>4</sub>OH-Puffer vom  $p_H$  8.0 und in 0.01  $n$  KOH (6). Die isobestischen Punkte a und b entsprechen dem Gleichgewicht Kation  $\rightleftharpoons$  freie Base ( $p_K = 3.9$ )

des Adenins haftet. Durch die ermittelten Eigenschaften ist das Nucleosid des Pseudovitamins B<sub>12</sub> als 7-[D-Ribofuranosido]-adenin, eine bisher noch nicht beschriebene Substanz, charakterisiert. Die UV-Absorptionsspektren des Adenosins und seiner Derivate ähneln bekanntlich weitgehend dem des 9-Methyl-

adenins, was seinerzeit J. M. Gulland und E. R. Holiday<sup>17)</sup> veranlaßte, dem Adenosin endgültig das N<sup>9</sup>-Atom als Verknüpfungsstelle mit dem Riboseresst zuzuschreiben, was später auf chemischem Wege bestätigt wurde<sup>18)</sup>.

Über die Konfiguration der glykosidischen Bindung des 7-[D-Ribofurano-sido]-adenins (wir schlagen vor, diese Verbindung kurz Pseudo-adenosin zu nennen) kann erst dann Endgültiges ausgesagt werden, sobald eine Vergleichs-substanz bekannter Konfiguration gefunden ist. Durch die Tatsache jedoch, daß der ermittelte Wert der spezif. Drehung um 60° positiver ist als der des Adenosins, wird die Voraussage von Hodgkin<sup>8)</sup>, daß es sich hier um eine  $\alpha$ -glykosidische Bindung handelt, gestützt.

### Beschreibung der Versuche

7-[D-Ribofuranosido]-adenin aus Pseudovitamin B<sub>12</sub>: In einem 250 ccm fassenden, mit Rückflußkühler versehenen Rundkolben löste man 784 mg ( $5 \cdot 10^{-4}$  Mol) Pseudovitamin B<sub>12</sub> in 100 ccm Wasser und versetzte in der gleichen Reihenfolge mit 60 ccm ( $200 \cdot 10^{-4}$  Mol) einer 0.333 *m* Lösung von  $\text{Ce}(\text{NO}_2)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 50 ccm 1.0 *n* NaOH ( $500 \cdot 10^{-4}$  Äquival.) und 3.0 ccm (ca.  $100 \cdot 10^{-4}$  Mol) einer 10-proz. HCN-Lösung. Das Gemisch wurde unter öfterem Schütteln 30 Min. auf dem siedenden Wasserbad erhitzt und nach Erkalten (End- $p_{\text{H}}$  ca. 5.0) mit 5 ccm 25-proz. wäßriger Ammoniaklösung versetzt, wobei der  $p_{\text{H}}$ -Wert auf 10–10.5 anstieg. Nach Stehenlassen über Nacht im Kühlraum wurde die klare Flüssigkeit abdekantiert, der gallertartige Niederschlag von der anhaftenden Lösung durch Filtration getrennt und mit Wasser gewaschen. Man vereinte die Filtrate mit der klaren Reaktionslösung und ließ die Flüssigkeit durch eine Säule aus Dowex-2-Formiat langsam durchlaufen (Korngröße 0.1 mm, Säulendurchmesser 3.5 cm, Höhe 85 cm; die Säule wurde vorher mit 0.15 *n* NH<sub>3</sub> gewaschen, bis der Durchlauf ein  $p_{\text{H}}$  von ca. 9.5 hatte). Man eluierte zunächst das Ätiocobalamin mit 0.25-proz. wäßriger Ammoniaklösung, sodann das Nucleosid mit Wasser. Die das Nucleosid enthaltenden Fraktionen wurden i. Vak. auf ca. 10 ccm eingengt ( $p_{\text{H}}$  zum Schluß ca. 5) und durch eine Säule aus Amberlite IRC-50 (Säureform, Korngröße 0.1 mm, Säulendurchmesser 1.3 cm, Höhe 38 cm) langsam durchgelassen. Die restlichen roten Farbstoffe blieben dabei im oberen Teil der Säule adsorbiert. Während der Elution mit Wasser verließ den Austauscher zunächst die Ameisensäure, der nach einem beträchtlichen Abstand das Nucleosid folgte. Die nucleosidhaltigen Eluate wurden i. Vak. auf ca. 2 ccm eingengt, wonach im Kühlraum farblose Kristalle in Form winziger, meist zu Drusen vereinter Rhomboide ausfielen. Nach dem Abtrennen, Umkristallisieren aus 3 ccm Wasser und Trocknen i. Vak. über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> bei 100° war die Substanz völlig wasserfrei. Ausb. ca. 75 mg an analysenreiner Substanz. Schmp. 218–222° (Zers., Kofler-Heizbank).

$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{O}_4\text{N}_5$  (267.2) Ber. N 26.21 Gef. N 26.04

<sup>18)</sup> B. Lythgoe, H. Smith u. A. R. Todd, J. chem. Soc. [London] 1947, 355.