

WILHELM FRIEDRICH und KONRAD BERNHAUER

Zur Chemie und Biochemie der „Cobalamine“, VII¹⁾

2-METHYLMERCAPTO-ADENIN-COBALAMIN-ANALOGON,
EIN NEUER B_{12} -FAKTOR DES FAULSCHLAMMES

Aus dem Biochemischen Forschungslaboratorium
der Aschaffenburger Zellstoffwerke A.G., Stockstadt a. M.

(Eingegangen am 9. Mai 1957)

Aus Faulschlamm wird ein neuer kristallisierte B_{12} -Faktor gewonnen, der näher charakterisiert und als 2-Methylmercapto-adenin-cobalamin-Analogon erkannt wird. Beim Abbau mit Cerhydroxyd erhält man daraus Faktor B und ein amorphes Nucleosid, das bei der Hydrolyse mit verdünnter Salzsäure D-Ribose und 2-Methylmercapto-adenin ergibt. Durch Einwirkung von salpetriger Säure wird aus dem 2-Methylmercapto-adenin-cobalamin-Analogon ein weiterer kristallisierte B_{12} -Faktor, das 2-Methylmercapto-6-hydroxy-purin-cobalamin-Analogon, dargestellt.

Bei der halbtechnischen Cellulosechromatographie eines aus 16 cbm Faulschlamm hergestellten Konzentrates wurde eine Fraktion gewonnen²⁾, aus der wir nach weiterer Cellulosepulver-Chromatographie einen bisher noch nicht beschriebenen kristallisierten B_{12} -Faktor isolierten.

Um eine gute Trennung des neuen B_{12} -Faktors vom begleitenden Faktor Ib³⁾ zu erreichen, muß bei der chromatographischen Reinigung ein hoher Gehalt an Blausäure im Entwickler aufrechterhalten werden (s. Versuchsteil). Der neue Faktor läuft unter diesen Bedingungen als Dicyanokomplex (violett gefärbt) langsamer als Faktor Ib (ebenfalls violett), bei Mangel an Cyanid läuft er jedoch in seiner Monocyanoform etwas rascher und ist vom Faktor Ib nicht trennbar. Bei Cyanidmangel bildet der neue Faktor in der Cellulosepulversäule normalerweise zwei Banden, eine schnellere, rote und eine langsamere, violette. Um das zu vermeiden, muß noch vor Beginn der Chromatographie für eine gründliche Sättigung der Säule mit Blausäure gesorgt werden.

Der Faktor kristallisiert aus wasserhaltigem Aceton sehr rasch in verhältnismäßig groben Prismen. Sein Absorptionsspektrum (Abbild. 1) unterscheidet sich sehr deutlich von allen bisher beschriebenen natürlichen Vitamin B_{12} -Faktoren durch das Fehlen des Maximums bei 278 m μ (an dieser Stelle ist nur eine schwach ausgeprägte Schleife) und durch das Vorhandensein eines neuen Maximums bei 302 m μ . Das Maximum bei 278 m μ kommt in der Dicyanoform (Abbild. 1), in der bekanntlich die koordinative Bindung zwischen dem Kobaltatom und der Base fehlt, in der üblichen Stärke zum Vorschein; sein Fehlen in der Monocyanoform ist also durch die Bindung zwischen dem Kobaltatom und der Base verursacht. Der neue B_{12} -Faktor ver-

¹⁾ VI. Mitteil.: W. FRIEDRICH und K. BERNHAUER, Angew. Chem. 69, 478 [1957].

²⁾ Herrn Dr. H. DELLWEG danken wir für die Überlassung dieser Fraktion.

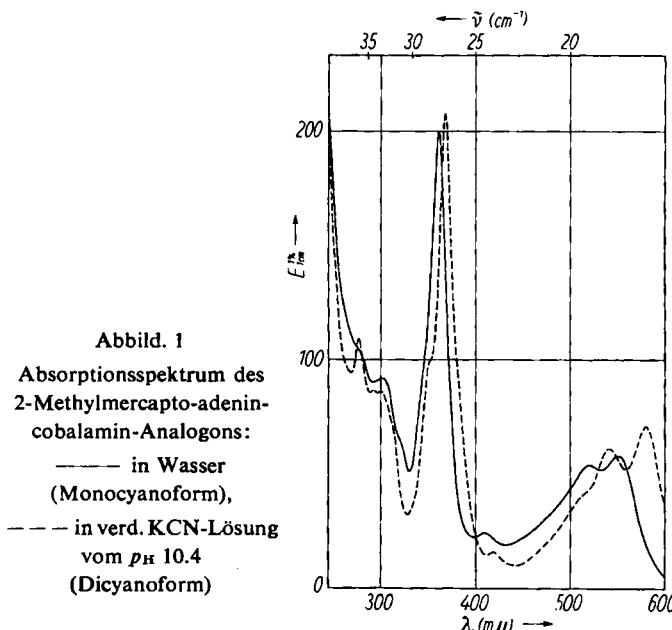
³⁾ H. DELLWEG und K. BERNHAUER, Arch. Biochem. Biophysics, im Druck.

hält sich im p_{H} -Bereich 1.9–12 elektrophoretisch neutral, in seiner papierchromatographischen Wanderung unterscheidet er sich nicht sehr beträchtlich vom Faktor III (s. Tab. 1). In seinen mikrobiologischen Eigenschaften ähnelt er dem Faktor A.

Tab. 1. Papierchromatographisches Verhalten der neuen B_{12} -Faktoren⁴⁾

Entwickler	2-Methylmercapto-adenin-cobalamin-Analogon		2-Methylmercapto-6-hydroxy-purin-cobalamin-Analogon	
	$R_{\text{B}_{12}}$	$R_{\text{Fakt. III}}$	$R_{\text{B}_{12}}$	$R_{\text{Fakt. III}}$
a	0.82	1.1	0.62	0.87
b	0.75	1.07	0.43	0.60
c	0.65	0.93	0.59	0.88
d	0.43	0.8	0.34	0.56

Durch den Abbau des neuen Faktors mit Cerhydroxyd⁵⁾ und Chromatographie des Hydrolysates an Dowex-2-Formiat gewannen wir Faktor B und ein Nucleosid.



Abbild. 1
Absorptionsspektrum des
2-Methylmercapto-adenin-cobalamin-Analogons:

- in Wasser
(Monocyanform),
- - - in verd. KCN-Lösung
vom p_{H} 10.4
(Dicyanoform)

Das Nucleosid bleibt in der Säule stark adsorbiert und lässt sich erst mit verdünnter Amiensäure eluieren. In der gleichen Säule werden die Nucleoside aus Pseudovitamin B_{12} ⁵⁾ und Faktor A⁶⁾ nur sehr schwach zurückgehalten und verlassen die Säule bereits beim Waschen mit Wasser knapp nach Faktor B. In diesem Verhalten ähnelt das Nucleosid des neuen

⁴⁾ Papierchromatogramme aufsteigend, Entwicklungsdauer 24 Stdn., Schleicher & Schüll-Papier 2043 A, Entwickler (stets CN^{\ominus} -haltig): a) wassergesätt. sek.-Butanol, b) wasserhalt. sek.-Butanol + NH_3 , c) wassergesätt. sek.-Butanol mit Kaliumperchlorat, d) wassergesätt. sek.-Butanol mit 0.5 % Natriumtetraphenyloborat.

⁵⁾ W. FRIEDRICH und K. BERNHAUER, Chem. Ber. 89, 2507 [1956].

⁶⁾ W. FRIEDRICH und K. BERNHAUER, Chem. Ber. 90, 465 [1957].

Faktors den Nucleosiden aus Vitamin B₁₂ und Faktor III, die erst durch verdünnte Salzsäure (verdünnte Ameisensäure wirkt hier nur sehr schwach eluierend) aus Dowex-2 eluiert werden können. Da den Nucleosiden aus Vitamin B₁₂ und aus dem 2-Methylmercaptoadenin-cobalamin-Analogon saure Eigenschaften fehlen, muß ihr Verhalten gegenüber Dowex-2 auf Adsorption zurückgeführt werden.

Das Nucleosid (Abbild. 2) wurde nach zweimaliger Chromatographie durch Amberlite XE-64 in Form eines gut wasserlöslichen amorphen Pulvers gewonnen. Es bildet kein kristallines Pikrat. Es verbraucht praktisch augenblicklich 1 Mol. Perjodat. Ein weiterer sehr langsamer Perjodatverbrauch ist auf Veränderungen des Purinanteils zurückzuführen. Die Ribose muß daher im Nucleosid als Furanose gebunden sein.

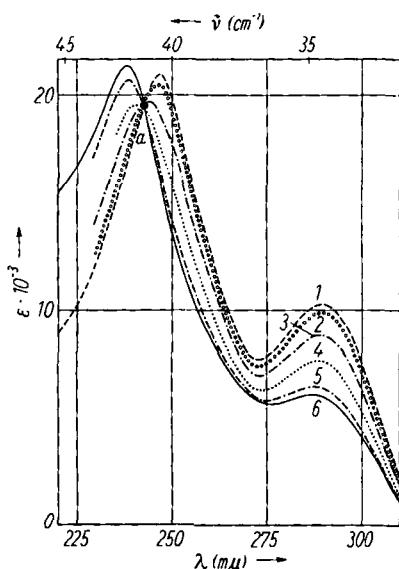


Abbildung 2
Absorptionsspektrum des
Nucleosides aus dem
2-Methylmercaptoadenin-
cobalamin-Analogon
in 0.02–0.2 m HCl (1), in
0.05 m Glykokoll-HCl-Puffer
vom p_H 2.28 (2)
und p_H 2.92 (3),
in 0.05 m Acetat-Eissigsäure-
Puffer vom p_H 3.19 (4)
und p_H 4.10 (5)
sowie in Wasser,
in 0.15 m
 NH_4Cl-NH_4OH -Puffer
vom p_H 7.8
und in 0.01 n KOH (6).
Der isosbestische Punkt a
entspricht dem Gleich-
gewicht Kation \rightleftharpoons freie Base
(p_K 3.1)

Wenn eine 0.0267 m Nucleosidlösung mit 0.1 n Perjodat zusammengebracht wird, so werden nach 3, 8 bzw. 25 Min. insgesamt 1.1, 1.17 bzw. 1.24 Moll. Perjodat je Mol. Nucleosid verbraucht. Zwecks Klärung der Ursache des Mehrverbrauchs an Perjodat wurde die Reaktion spektrophotometrisch verfolgt. Nach 1.5 Min. Reaktionsdauer hatte das Gemisch noch das Absorptionsspektrum des Nucleosides, nach 30 Min. war das Maximum bei 287.5 mμ nicht mehr vorhanden, nach 20 Stdn. war ein neues Maximum bei ca. 273 mμ gebildet und das Maximum bei 238 mμ nicht mehr wahrnehmbar. Die Anwesenheit von zwei isosbestischen Punkten bei 265 mμ und 285 mμ, durch die alle Absorptionskurven verlaufen, deutet darauf hin, daß nur ein Reaktionsprodukt gebildet wird. Da die Veränderung des Absorptionsspektrums erst nach Verbrauch von 1 Mol. Perjodat beginnt und die Reaktionsgeschwindigkeit in der zweiten Oxydationsphase von ganz anderer Größenordnung ist, wird das erste Mol. Perjodat eindeutig zur Oxydation des Riboseanteils, die weitere Perjodatmenge jedoch zur Veränderung des Purinanteils verbraucht.

Als Verknüpfungsstelle des Riboserestes mit dem Purinrest im Nucleosid muß als Folge der Konstitutionsaufklärung des Vitamins B₁₂ in Analogie zu Pseudovitamin B₁₂

und Faktor A N-7 verlangt werden⁷⁾. Die vorhandenen spektroskopischen Daten (Tab. 2), verbunden mit unseren früheren Ausführungen⁶⁾, stützen diese Annahme aus zwei Gründen: 1.) Die längerwelligen Maxima des Nucleosides sind, verglichen mit denen des 2-Methylmercapto-9-methyl-adenins^{8,9)} um 10.5 bzw. 19.5 m μ in der Richtung der längeren Wellen verschoben; das ist die übliche Wellenlängendifferenz zwischen 7- und 9-substituierten Adeninderivaten. 2.) Für die längerwelligen Maxima des Nucleosides ist der ϵ -Wert der kationischen Form viel höher als der der basischen Form — eine für 7-substituierte Adeninderivate charakteristische Eigenschaft.

Tab. 2. UV-Absorptionsmaxima des Nucleosides des 2-Methylmercapto-adenin-cobalamin-Analogons und einiger verwandter Verbindungen

Verbindung	Kation		Puffer	Base		
	λ in m μ	$\epsilon \cdot 10^{-3}$		λ in m μ	$\epsilon \cdot 10^{-3}$	p_H bzw. Puffer
6-Dimethylamino-9-äthyl-purin ¹⁰⁾	270	17.5	0.1 n HCl	277.5	18.3	0.1 n NaOH
2-Methylmercapto-9-methyl-adenin	270	14.2	0.1 n HCl	277 234	13.9 22.0	0.05 n KOH
Nucleosid aus 2-Methyl-mercapto-adenin-cobalamin-Analogon	289.5 247	10.3 21.1	0.1 n HCl	287.5 238	6.1 21.4	p_H 6—12
6-Dimethylamino-7-äthyl-purin ¹⁰⁾	290	23.3	0.1 n HCl	295	19.4	0.1 n NaOH

Im Papierchromatogramm läuft das Nucleosid aus dem 2-Methylmercapto-adenin-cobalamin-Analogon etwas schneller als Adenosin. Nach Entwicklung mit (1) n-Butanol-Äthanol-Wasser-NH₃ bzw. mit (2) wassergesätt. n-Butanol wurden für R_{Adenosin} die Werte (1) 1.17 und (2) 1.21 gefunden^{11,12,13)}. Die Flecke fluoreszieren im UV-Licht hellblau. Durch Hydrolyse des Nucleosides mit 0.05 n HCl bei 100° während 15 Min. entsteht im molaren Verhältnis 1:1 d-Ribose und 2-Methylmercapto-adenin^{8,14)}. Ribose wurde mit Hilfe der Orcin-Reaktion¹⁵⁾ und papierchromatographisch^{11,12)} nachgewiesen. Nach Entwicklung mit (1) n-Butanol-Äthanol-Wasser-NH₃ bzw. mit (2) n-Butanol-Essigsäure-Wasser und Besprühen mit Anilinphthalat wurden Flecke mit den R_F -Werten (1) 0.20 und (2) 0.30 beobachtet. d-Ribose (Handelspräparat) hatte die gleichen R_F -Werte.

⁷⁾ D. C. HODGKIN, s. dazu Biochem. Soc. Symposium No. 13, „The Biochemistry of Vitamin B₁₂“, Cambridge, University Press 1955, S. 28, Fußnote.

⁸⁾ J. BADDILEY, B. LYTHGOE, D. MCNEIL und SIR A. R. TODD, J. chem. Soc. [London] 1943, 383.

⁹⁾ Wir danken Prof. SIR A. R. TODD für die freundliche Überlassung einer Probe.

¹⁰⁾ C. W. WALLER, P. W. FRYTH, B. L. HUTCHINGS und J. H. WILLIAMS, J. Amer. chem. Soc. 75, 2025 [1953].

¹¹⁾ F. CRAMER, Papierchromatographie, 2. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1953.

¹²⁾ Schleicher & Schüll-Papier Nr. 2043 A; aufsteigend; Entw.-Dauer 22 Stdn.

¹³⁾ Die Flecke wurden mit Hilfe der Analysenlampe PL 320 der Quarzlampengesellschaft m.b.H., Hanau, sichtbar gemacht.

¹⁴⁾ R. K. ROBINS, K. J. DILLE, C. H. WILLITS und B. E. CHRISTENSEN, J. Amer. chem. Soc. 75, 263 [1953].

¹⁵⁾ D. GLICK, Methods of Biochemical Analysis, Interscience Publishers, New York, Vol. I, 1954.

Die bei der Hydrolyse erhaltene Base (Abbild. 3) besitzt in (1) n-Butanol-Äthanol-Wasser-NH₃, in (2) wassergesättigtem n-Butanol bzw. in (3) n-Butanol-Essigsäure-Wasser die R_{Adenin} -Werte (1) 1.49, (2) 1.45 und (3) 1.28^{11,12,13}. Die Elementaranalyse der Base entspricht der Formel C₆H₇N₅S, Schmp. 294–300°.

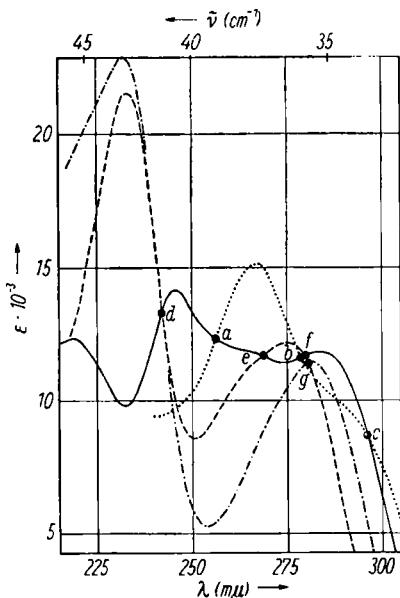


Abbildung 3
Absorptionsspektrum von
2-Methylmercaptopadenin
in 3n HCl (zweite kationische Form,
Maximum bei 267 mμ)
in 0.07n HCl
(erste kationische Form,
Maxima bei 219, 246
und 284 mμ) —
in Wasser sowie in 0.15m
NH₄Cl-NH₄OH-Puffer vom p_{H} 7.8
(neutrale Form, Maxima bei 233
und 275 mμ) ----,
sowie in 0.033n KOH
(anionische Form, Maximum bei
232 und 282 mμ) - - - .
Die isosbestischen Punkte
entsprechen folgenden Gleich-
gewichten: a, b und c,
zweite kationische Form \rightleftharpoons
erste kationische Form ($p_K < 1$);
d, e und f, erste kationische Form \rightleftharpoons
neutrale Form ($p_K 3.1$);
d und g, neutrale Form \rightleftharpoons
anionische Form ($p_K 10.2$)

Die Base wird in 10n KOH sowie in 6n HCl bei 100° während 1 Stde. nicht verändert. Nach Einwirkung von 6n HCl (1) bei 120° während 1 Stde. bzw. bei 150° während 5–10 Min. oder (2) bei 150° während 1 Stde., Trocknen der Hydrolysate i. Vak. über Natriumhydroxyd und Papierelektrophorese der Hydrolysate bei p_{H} 2.7 werden (1) außer unveränderter Substanz (kräftige Zone, $R_{\text{Isoguanin}}$ 0.46) und einem noch nicht identifizierten Abbauprodukt (sehr schwache Zone, $R_{\text{Isoguanin}}$ 0.22), Xanthin (kräftige unbewegliche Zone) und Isoguanin (schwache Zone) bzw. (2) nur Xanthin gefunden. Isoguanin und Xanthin wurden nach Elution der Flecke mit heißem Wasser durch das UV-Absorptionsspektrum der Eluate bei verschiedenen p_{H} -Werten¹⁶ identifiziert. Die Hydrolysate besitzen einen unangenehmen, für manche S-Verbindungen charakteristischen Geruch.

Die Base erwies sich in allen geprüften Eigenschaften als identisch mit zum Vergleich herangezogenem synthetischem 2-Methylmercaptopadenin⁹.

In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß nach dem Erhitzen von 2-Methoxyadenin¹⁷ in 6n HCl während 15 Min. auf 126° (also unter Bedingungen, unter denen 2-Methylmercaptopadenin nur sehr geringfügig angegriffen wird) nur Isoguanin und Xanthin elektrophoretisch nachgewiesen werden können. Dies steht im Einklang mit der bereits bekannten Regel, daß

¹⁶) Für die freundliche Überlassung von Isoguanin danken wir Dr. G. ELION.

¹⁷) W. BERGMANN und D. C. BURKE, J. org. Chemistry 21, 226 [1956]. Wir danken Prof. Dr. W. BERGMANN für die freundliche Überlassung einer Probe.

durch Halogenwasserstoffsäuren die *O*-Äther leichter gespalten werden als die analogen *S*-Äther^{17a)}.

Weder 2-Methylmercapto-adenin noch irgendein anderes S-haltiges Purin wurde unseres Wissens bisher frei oder gebunden in der Natur aufgefunden^{17b)}.

Erwartungsgemäß reagiert das 2-Methylmercapto-adenin-cobalamin-Analogon mit salpetriger Säure unter Bildung eines in feinen Nadeln gut kristallisierenden und sehr gut wasserlöslichen B_{12} -Faktors. Er verhält sich papierchromatographisch (s. Tab. 1) gegenüber seinem Mutterfaktor im allgemeinen ähnlich wie die Faktoren G und H gegenüber Pseudovitamin B_{12} und Faktor A und ist deshalb als 2-Methylmercapto-6-hydroxy-purin-cobalamin-Analogon anzusehen. Analog reagiert 2-Methylmercapto-9-methyl-adenin mit salpetriger Säure unter Bildung von 2-Methylmercapto-6-hydroxy-9-methyl-purin⁸⁾. Das 2-Methylmercapto-6-hydroxy-purin-cobalamin-Analogon hat ein für „Cobalamine“ typisches Absorptionsspektrum (Banden bei 278, 361 und 548 m μ). Durch sein elektrophoretisches Verhalten (schwach sauer in neutralen Puffern) unterscheidet sich dieser Faktor von den neutralen Faktoren G und H. Dieses Verhalten ist auf die Anwesenheit des elektronegativen Schwefelatoms am C-2 zurückzuführen. Dieses Schwefelatom ist auch für die geringe Basizität des 2-Methylmercapto-adenins und seines Ribosides (beide p_K 3.1) sowie für das „neutrale“ Verhalten des 2-Methylmercapto-adenin-cobalamin-Analogons verantwortlich. Wie wir gefunden und begründet haben⁶⁾, ist die Basizität der Aminogruppe der basischen Komponente im Pseudovitamin B_{12} und im Faktor A beträchtlich geringer als in den isolierten Nucleosiden (Verringerung der Dissoziationskonstanten um mehr als eine Zehnerpotenz). Analog wäre für das 2-Methylmercapto-adenin-cobalamin-Analogon ein p_K -Wert von 2 oder noch weniger zu erwarten. Eine so geringe Basizität kann papierelektrophoretisch nicht nachgewiesen werden, vor allem wenn als Vergleichssubstanzen „neutrale“ Vitamin B_{12} -Faktoren benutzt werden, die unterhalb von p_H 2 kathodisch wandern¹⁸⁾.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE*

2-Methylmercapto-adenin-cobalamin-Analogon aus Faulschlamm: 16 cbm Faulschlamm wurden in üblicher Weise zum Kieselgur-Trockenpräparat verarbeitet, das sämtliche B_{12} -Faktoren des Ausgangsmediums enthielt. Bei der halbtechnischen Cellulose-Säulenchromatographie (Entwickler: n-Butanol-Wasser, enthaltend Kaliumperchlorat) erschien zwischen den Zonen des Vitamins B_{12} und des Faktors III eine Bande, die in einer gesonderten Fraktion aufgefangen wurde. Aus dieser erhielt man in üblicher Weise 150 g Kieselgur-Trockenpräparat, das mit 4 ccm 10-proz. wässriger Blausäurelösung versetzt und nach Vermischen

17a) R. L. BURWELL jr., Chem. Reviews 54, 677 [1954].

17b) Bei biosynthetischen Versuchen mit *E. coli* 113-3 beobachteten J. E. FORD, E. S. HOLDSWORTH und S. K. KON (Biochem. J. 59, 86 [1955]) nach Zusatz von 2-Methylmercapto-adenin als „precursor“ zum Nährmedium und papierchromatographischer Trennung der gebildeten B_{12} -Faktoren einen Fleck vom $R_{B_{12}} = 0.57$ (Entwickler sek.-Butanol-NH₃-Wasser), der keinem der bekannten B_{12} -Faktoren entsprach. Ob diese Substanz 2-Methylmercapto-adenin als Base enthielt, wurde nicht geprüft.

18) H. NIHLEN und L. E. ERICSON, Acta chem. scand. 9, 351 [1955].

* Mikroanalyse durchgeführt von A. BERNHARDT, Mikroanalyt. Laboratorium im Max-Planck-Institut für Kohlenforschung, Mülheim (Ruhr).

in 4 Säulen (je 60×230 mm) aus Cellulosepulver (Whatman Standard Grade) eingefüllt wurde. Bei der Entwicklung mit einem Gemisch aus 750 ccm sek.-Butanol, 250 ccm Wasser, 2 ccm 10-proz. wäßriger Blausäure und Kaliumperchlorat (bis zur Sättigung) lief eine kräftige violette Zone (Faktor 1b) voran, der eine schwache Bande eines nicht näher definierten B₁₂-Faktors und schließlich eine violettrete Bande des 2-Methylmercapto-adenin-cobalamin-Analogons folgte. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereint und mit Petroläther versetzt. Die wäßrige Phase wurde mit Phenol-*o*-Dichlorbenzol extrahiert, der organische Extrakt mit Wasser gewaschen und nach Zusatz von sek.-Butanol und Diisopropyläther mit Wasser extrahiert, der wäßrige Extrakt nach Waschen mit einem Gemisch aus sek.-Butanol und Diisopropyläther i. Vak. auf ein kleines Volumen eingeengt und in üblicher Weise durch Zusatz von Aceton zur Kristallisation gebracht. Die Substanz kristallisiert sehr rasch in verhältnismäßig groben roten Prismen. Ausbeute an etwa 13 % Wasser enthaltender Substanz 1930 mg.

Nucleosid aus dem 2-Methylmercapto-adenin-cobalamin-Analogon: In einem 250ccm fassenden Rundkolben mit Rückflußkühler wurden 750mg ($5 \cdot 10^{-4}$ Mol) des 2-Methylmercapto-adenin-cobalamin-Analogons in 100ccm Wasser gelöst und in der gleichen Reihenfolge mit 60ccm ($200 \cdot 10^{-4}$ Mol) einer 0.333 molaren Lösung von Ce(NO₃)₃ · 6H₂O, 50ccm 1.0*n* NaOH ($500 \cdot 10^{-4}$ Äquival.) und 3ccm ($100 \cdot 10^{-4}$ Mol) einer 10-proz. HCN-Lösung versetzt. Das Gemisch wurde unter Schütteln 45 Min. auf dem siedenden Wasserbad erhitzt und nach Erkalten (End-*p*_H ca. 5) mit 4ccm 5-proz. wäßriger Ammoniaklösung auf *p*_H ca. 8.5 gebracht. Nach Filtration durch einen Faltenfilter und Waschen des Rückstandes mit ammoniakhaltigem Wasser vom *p*_H 8.5 (insgesamt 700ccm Filtrat) wurden die vereinten etwas trüben Filtrate mit einigen Tropfen 5-proz. wäßriger Ammoniaklösung versetzt, wodurch sich eine kleine Menge eines flockigen rasch absetzbaren Niederschlages bildete, der durch ein Faltenfilter abgetrennt wurde; das klare Filtrat wurde mit 6ccm 25-proz. wäßriger Ammoniaklösung versetzt und durch eine Säule aus Dowex-2-Formiat (18 × 570mm) langsam hindurchlaufen gelassen (die Säule wurde vorher mit 0.25-proz. wäßriger Ammoniaklösung bis zu leicht alkalischem Durchlauf gewaschen). Während der anschließenden Elution mit Wasser wurde Faktor B aus der Säule entfernt; das Nucleosid wurde mit 0.05*n* Ameisensäure eluiert. Die leicht rosa gefärbten Eluate wurden vereint, mit einigen ccm 5-proz. Ammoniaklösung leicht alkalisch gemacht und i. Vak. auf einige ccm eingeengt. Das Konzentrat wurde durch eine Säule aus Amberlite XE-64 (25 × 850mm, Säureform) durchlaufen gelassen. Die Säule wurde langsam mit 2.3*/* Wasser gewaschen und anschließend in 5ccm lange Stücke zerschnitten. Die Teile 1 – 3 von oben waren rot gefärbt (Reste von Faktor B), die Teile 8 – 14 waren farblos und enthielten das Nucleosid. Der Austauscher der Teile 8 – 14 wurde in Wasser suspendiert, mit Ammoniak neutralisiert, in ein Chromatographierrohr gefüllt und mit 0.24-proz. wäßriger Ammoniaklösung eluiert. Nach Filtration durch eine Glassinternutsche G-4 wurden die Eluate i. Vak. auf 2ccm eingeengt und zwecks Beseitigung der aus dem Austauscher stammenden restlichen Trübung durch eine Säule aus Amberlite XE-64 (9 × 600mm) chromatographiert. Bei der Elution mit Wasser wurde das Nucleosid in völlig klarer farbloser Lösung gewonnen. Nach Einengen i. Vak. erhielt man einen gut wasserlöslichen amorphen glasartigen bzw. pulverförmigen Rückstand, der nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte. Ausbeute (auf optischem Wege bestimmt) ca. $4.15 \cdot 10^{-4}$ Mole, d. h. ca. 83 % d. Th.

2-Methylmercapto-adenin aus dem Nucleosid des 2-Methylmercapto-adenin-cobalamin-Analogons: $3 \cdot 10^{-4}$ Mole Nucleosid wurden in 6.5ccm 0.1*n* HCl gelöst und während 20 Min. auf 100° erhitzt. Beim Stehenlassen über Nacht kristallisierte 2-Methylmercapto-adenin als Hydrochlorid in farblosen kleinen Drusen aus. Nach Umkristallisieren aus 45ccm 25-proz. Äthanol unter Zusatz von 1.2ccm Amberlite IR-4B wurde die freie Base in sehr feinen,

farblosen, zu schneeflockenartigen Kristallbüscheln vereinten Stäbchen erhalten. Ausb. 46 mg (ca. 70 %, bezogen auf den B₁₂-Faktor). Schmp. und Misch-Schmp. mit authentischem 2-Methylmercapto-adenin 294 – 300° (Zers.; Kofler-Mikroschmelzpunkt-Apparat). Ab 220° sublimiert die Substanz unter Bildung grober Prismen.

$C_6H_7N_5S$ (181.2) Ber. C 39.77 H 3.89 N 38.65 S 17.69
Gef.* C 39.92 H 4.09 N 38.43 S 17.60

* Getrocknet i. Hochvak. bei 100°.

2-Methylmercapto-6-hydroxy-purin-cobalamin-Analogon aus dem 2-Methylmercapto-adenin-cobalamin-Analogon: 5 mg 2-Methylmercapto-adenin-cobalamin-Analogon wurden in einem 5 ccm fassenden Jodzahlkölbchen in 1.2 ccm 5-proz. Essigsäure gelöst und nach Zusatz von 48 mg Natriumnitrit verschlossen unter gelegentlichem Umrühren 3 Tage bei Zimmertemperatur stehengelassen. Anschließend wurde der Inhalt in ein flaches Schälchen gespült und i. Vak. über Natriumhydroxyd bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 1 ccm Wasser aufgenommen, mit etwas Phenol-*o*-Dichlorbenzol extrahiert, der Extrakt mit Wasser gewaschen und nach Zusatz von Diisopropyläther und sek.-Butanol in 1 ccm Wasser übergeführt. Nach Waschen mit Diisopropyläther wurde die rote wäßr. Phase i. Vak. bis zur Trockne verdampft, der Rückstand in 2 Tropfen Wasser gelöst und mit Aceton versetzt. In einigen Minuten kristallisierte die Substanz in feinen roten Nadeln aus. Ausb. ca. 3 mg.

HANS PLIENINGER und HANS JOACHIM GRASSHOFF

SYNTHESE EINER TETRAHYDROPREPHENSÄURE

Aus dem Chemischen Institut der Universität Heidelberg

(Eingegangen am 10. Mai 1957)

Eine Tetrahydroprephensäure der Konstitution Va wurde aus Chinit synthetisiert und als Ba-Salz und Dinitrophenylhydrazone isoliert.

Im Arbeitskreis von B. D. DAVIS^{1,2)} wurde aus Kulturfiltraten einer Mutante von *Escherichia coli* eine Verbindung als Bariumsalz isoliert, die den Namen Prephensäure erhielt und der die Struktur I zugeschrieben wurde. Die Verbindung geht in saurem Medium in Phenylbrenztraubensäure über. Sie ist bei Colibakterien und, wie kürzlich nachgewiesen wurde, auch in *Neurospora crassa*³⁾ ein wichtiges Zwischenstück auf dem biosynthetischen Weg von den Zuckern zu aromatischen Verbindungen. Eine Synthese dieser Verbindung wäre wichtig zur Sicherung der angenommenen Struktur und wegen einer möglichen Markierung für biochemische Untersuchungen.

¹⁾ U. WEISS, C. GILVARG, E. S. MINGOLI und B. D. DAVIS, Science [Washington] 119, 774 [1954].

²⁾ B. D. DAVIS, „A Symposium on Amino acid Metabolism“, W. D. McElroy und B. Glass, Editors, John Hopkins Press, Baltimore Md. 1955, S. 799.

³⁾ R. L. METZENBORG und H. K. MITCHELL, Arch. Biochem. Biophysics 64, 51 [1956].