

WILHELM FRIEDRICH und KONRAD BERNHAUER

Zur Chemie und Biochemie der „Cobalamine“, VII<sup>1)</sup>

## 2-METHYLMERCAPTO-ADENIN-COBALAMIN-ANALOGON, EIN NEUER B<sub>12</sub>-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 kristallisierter B<sub>12</sub>-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 kristallisierter B<sub>12</sub>-Faktor, das 2-Methylmercapto-6-hydroxy-purin-cobalamin-Analogon, dargestellt.

Bei der halbtechnischen Cellulosechromatographie eines aus 16 cbm Faulschlamm hergestellten Konzentrates wurde eine Fraktion gewonnen<sup>2)</sup>, aus der wir nach weiterer Cellulosepulver-Chromatographie einen bisher noch nicht beschriebenen kristallisierten B<sub>12</sub>-Faktor isolierten.

Um eine gute Trennung des neuen B<sub>12</sub>-Faktors vom begleitenden Faktor Ib<sup>3)</sup> 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<sub>12</sub>-Faktoren durch das Fehlen des Maximums bei 278m $\mu$  (an dieser Stelle ist nur eine schwach ausgeprägte Schleife) und durch das Vorhandensein eines neuen Maximums bei 302m $\mu$ . Das Maximum bei 278m $\mu$  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<sub>12</sub>-Faktor ver-

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

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

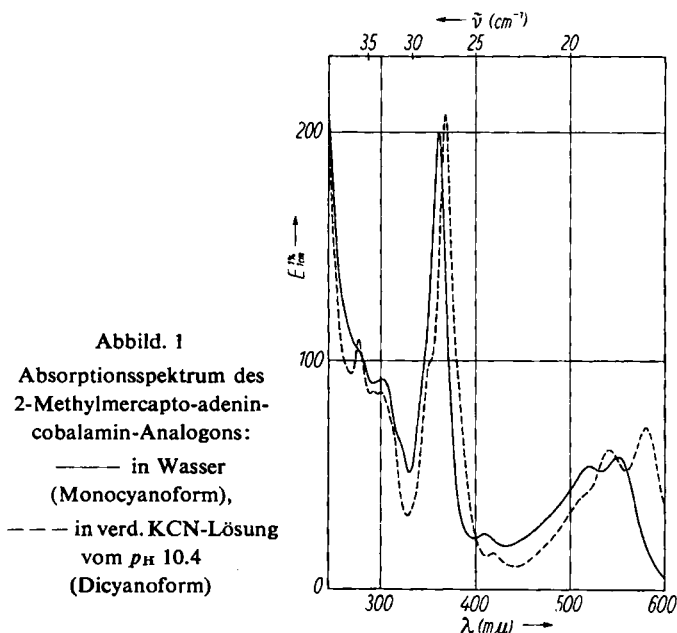
3) Hw. DELLWEG und K. BERNHAUER, Arch. Biochem. Biophysics, im Druck.

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<sub>12</sub>-Faktoren<sup>4)</sup>

Entwickler	2-Methylmercapto-adenin-cobalamin-Analogon		2-Methylmercapto-6-hydroxypurin-cobalamin-Analogon	
	$R_{B_{12}}$	$R_{\text{Fakt. III}}$	$R_{B_{12}}$	$R_{\text{Fakt. III}}$
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 Cerhydroxyd<sup>5)</sup> und Chromatographie des Hydrolysates an Dowex-2-Formiat gewannen wir Faktor B und ein Nucleosid.



Das Nucleosid bleibt in der Säule stark adsorbiert und läßt sich erst mit verdünnter Ameisensäure eluieren. In der gleichen Säule werden die Nucleoside aus Pseudovitamin B<sub>12</sub><sup>5)</sup> und Faktor A<sup>6)</sup> 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

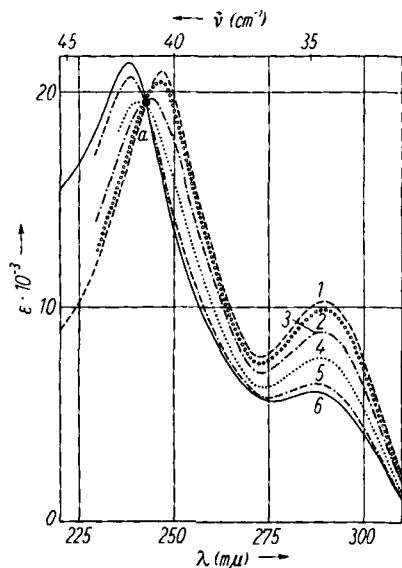
<sup>4)</sup> Papierchromatogramme aufsteigend, Entwicklungsdauer 24 Stdn., Schleicher & Schüll-Papier 2043 A, Entwickler (stets CN<sup>⊖</sup>-haltig): a) wassergesätt. sek.-Butanol, b) wasserhalt. sek.-Butanol + NH<sub>3</sub>, c) wassergesätt. sek.-Butanol mit Kaliumperchlorat, d) wassergesätt. sek.-Butanol mit 0.5 % Natriumtetraphenylborat.

<sup>5)</sup> W. FRIEDRICH und K. BERNHAUER, Chem. Ber. **89**, 2507 [1956].

<sup>6)</sup> W. FRIEDRICH und K. BERNHAUER, Chem. Ber. **90**, 465 [1957].

Faktors den Nucleosiden aus Vitamin B<sub>12</sub> 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 B<sub>12</sub> und aus dem 2-Methylmercapto-adenin-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.



Abbild. 2

Absorptionsspektrum des Nucleosides aus dem 2-Methylmercapto-adenin-cobalamin-Analogon in 0.02–0.2 *m* HCl (1), in 0.05 *m* Glykokoll-HCl-Puffer vom *p*<sub>H</sub> 2.28 (2) und *p*<sub>H</sub> 2.92 (3), in 0.05 *m* Acetat-Essigsäure-Puffer vom *p*<sub>H</sub> 3.19 (4) und *p*<sub>H</sub> 4.10 (5) sowie in Wasser, in 0.15 *m* NH<sub>4</sub>Cl-NH<sub>4</sub>OH-Puffer vom *p*<sub>H</sub> 7.8 und in 0.01 *n* KOH (6). Der isosbestische Punkt a entspricht dem Gleichgewicht Kation  $\rightleftharpoons$  freie Base (*p*<sub>K</sub> 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 Perjodatomenge jedoch zur Veränderung des Purinanteils verbraucht.

Als Verknüpfungsstelle des Riboserestes mit dem Purinrest im Nucleosid muß als Folge der Konstitutionsaufklärung des Vitamins B<sub>12</sub> in Analogie zu Pseudovitamin B<sub>12</sub>

und Faktor A N-7 verlangt werden<sup>7)</sup>. Die vorhandenen spektroskopischen Daten (Tab. 2), verbunden mit unseren früheren Ausführungen<sup>6)</sup>, stützen diese Annahme aus zwei Gründen: 1.) Die längerwelligen Maxima des Nucleosides sind, verglichen mit denen des 2-Methylmercapto-9-methyl-adenins<sup>8,9)</sup> um 10.5 bzw. 19.5 m $\mu$  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  $\epsilon$ -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		$p_H$ bzw. Puffer
	$\lambda$ in m $\mu$	$\epsilon \cdot 10^{-3}$		$\lambda$ in m $\mu$	$\epsilon \cdot 10^{-3}$	
6-Dimethylamino-9-äthyl-purin <sup>10)</sup>	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-Methylmercapto-adenin-cobalamin-Analogon	289.5	10.3	0.1 n HCl	287.5	6.1	$p_H$ 6—12
	247	21.1		238	21.4	
6-Dimethylamino-7-äthyl-purin <sup>10)</sup>	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-NH<sub>3</sub> bzw. mit (2) wassergesätt. n-Butanol wurden für  $R_{\text{Adenosin}}$  die Werte (1) 1.17 und (2) 1.21 gefunden<sup>11,12,13)</sup>. 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<sup>8,14)</sup>. Ribose wurde mit Hilfe der Orcin-Reaktion<sup>15)</sup> und papierchromatographisch<sup>11,12)</sup> nachgewiesen. Nach Entwicklung mit (1) n-Butanol-Äthanol-Wasser-NH<sub>3</sub> 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.

<sup>7)</sup> D. C. HODGKIN, s. dazu Biochem. Soc. Symposium No. 13, „The Biochemistry of Vitamin B<sub>12</sub>“, Cambridge, University Press 1955, S. 28, Fußnote.

<sup>8)</sup> J. BADDILEY, B. LYTGOE, D. McNEIL und SIR A. R. TODD, J. chem. Soc. [London] 1943, 383.

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

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

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

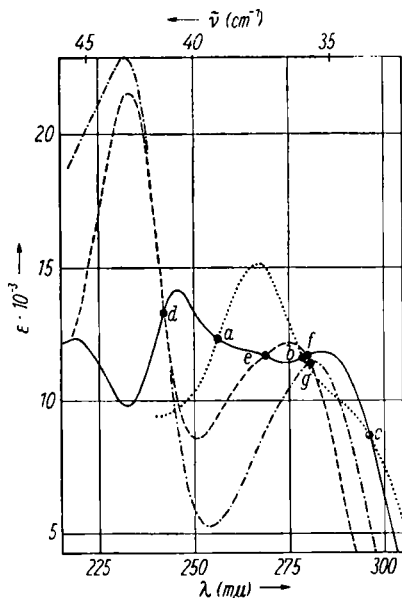
<sup>12)</sup> Schleicher & Schüll-Papier Nr. 2043 A; aufsteigend; Entw.-Dauer 22 Stdn.

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

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

<sup>15)</sup> 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-NH<sub>3</sub>, in (2) wassergesättigtem n-Butanol bzw. in (3) n-Butanol-Essigsäure-Wasser die  $R_{\text{Adenin}}$ -Werte (1) 1.49, (2) 1.45 und (3) 1.28<sup>11,12,13</sup>. Die Elementaranalyse der Base entspricht der Formel C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>N<sub>5</sub>S, Schmp. 294–300°.



Abbild. 3  
Absorptionsspektrum von  
2-Methylmercapto-adenin  
in 3 *n* HCl (zweite kationische Form,  
Maximum bei 267 mμ) ······,  
in 0.07 *n* HCl  
(erste kationische Form,  
Maxima bei 219, 246  
und 284 mμ) ———,  
in Wasser sowie in 0.15 *m*  
NH<sub>4</sub>Cl-NH<sub>4</sub>OH-Puffer vom *p*<sub>H</sub> 7.8  
(neutrale Form, Maxima bei 233  
und 275 mμ) ·····,  
sowie in 0.033 *n* KOH  
(anionische Form, Maxima bei  
232 und 282 mμ) ·····.  
Die isobestischen Punkte  
entsprechen folgenden Gleich-  
gewichten: a, b und c,  
zweite kationische Form ⇌  
erste kationische Form (*p*<sub>K</sub> < 1);  
d, e und f, erste kationische Form ⇌  
neutrale Form (*p*<sub>K</sub> 3.1);  
d und g, neutrale Form ⇌  
anionische Form (*p*<sub>K</sub> 10.2)

Die Base wird in 10 *n* KOH sowie in 6 *n* HCl bei 100° während 1 Stde. nicht verändert. Nach Einwirkung von 6 *n* 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*<sub>H</sub> 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*<sub>H</sub>-Werten<sup>16</sup> 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-Methylmercapto-adenin<sup>9</sup>).

In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß nach dem Erhitzen von 2-Methoxy-adenin<sup>17</sup>) in 6 *n* HCl während 15 Min. auf 126° (also unter Bedingungen, unter denen 2-Methylmercapto-adenin nur sehr geringfügig angegriffen wird) nur Isoguanin und Xanthin elektrophoretisch nachgewiesen werden können. Dies steht im Einklang mit der bereits bekannten Regel, daß

<sup>16</sup>) Für die freundliche Überlassung von Isoguanin danken wir Dr. G. ELION.

<sup>17</sup>) 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<sup>17a)</sup>.

Weder 2-Methylmercapto-adenin noch irgendein anderes S-haltiges Purin wurde unseres Wissens bisher frei oder gebunden in der Natur aufgefunden<sup>17b)</sup>.

Erwartungsgemäß reagiert das 2-Methylmercapto-adenin-cobalamin-Analogon mit salpetriger Säure unter Bildung eines in feinen Nadeln gut kristallisierenden und sehr gut wasserlöslichen B<sub>12</sub>-Faktors. Er verhält sich papierchromatographisch (s. Tab. 1) gegenüber seinem Mutterfaktor im allgemeinen ähnlich wie die Faktoren G und H gegenüber Pseudovitamin B<sub>12</sub> 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-purin<sup>8)</sup>. Das 2-Methylmercapto-6-hydroxy-purin-cobalamin-Analogon hat ein für „Cobalamine“ typisches Absorptionsspektrum (Banden bei 278, 361 und 548 mμ). 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 haben<sup>6)</sup>, ist die Basizität der Aminogruppe der basischen Komponente im Pseudovitamin B<sub>12</sub> 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<sub>12</sub>-Faktoren benutzt werden, die unterhalb von  $p_H$  2 kathodisch wandern<sup>18)</sup>.

#### BESCHREIBUNG DER VERSUCHE\*)

*2-Methylmercapto-adenin-cobalamin-Analogon aus Faulschlamm:* 16 cbm Faulschlamm wurden in üblicher Weise zum Kieselgur-Trockenpräparat verarbeitet, das sämtliche B<sub>12</sub>-Faktoren des Ausgangsmediums enthielt. Bei der halbtechnischen Cellulose-Säulenchromatographie (Entwickler: *n*-Butanol-Wasser, enthaltend Kaliumperchlorat) erschien zwischen den Zonen des Vitamins B<sub>12</sub> 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<sub>12</sub>-Faktoren einen Fleck vom  $R_{B_{12}} = 0.57$  (Entwickler sek.-Butanol-NH<sub>3</sub>-Wasser), der keinem der bekannten B<sub>12</sub>-Faktoren entsprach. Ob diese Substanz 2-Methylmercapto-adenin als Base enthielt, wurde nicht geprüft.

18) H. NIHLÉN 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  $60 \times 230$  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 1 b) voran, der eine schwache Bande eines nicht näher definierten  $B_{12}$ -Faktors und schließlich eine violettrote 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 eingeeengt 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 750 mg ( $5 \cdot 10^{-4}$  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  $Ce(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ , 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 ( $End-pH$  ca. 5) mit 4ccm 5-proz. wäßriger Ammoniaklösung auf  $pH$  ca. 8.5 gebracht. Nach Filtration durch ein Faltenfilter und Waschen des Rückstandes mit ammoniakhaltigem Wasser vom  $pH$  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 ( $18 \times 570$  mm) 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 eingeeengt. Das Konzentrat wurde durch eine Säule aus Amberlite XE-64 ( $25 \times 850$  mm, 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 eingeeengt und zwecks Beseitigung der aus dem Austauscher stammenden restlichen Trübung durch eine Säule aus Amberlite XE-64 ( $9 \times 600$  mm) 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 B<sub>12</sub>-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<sub>6</sub>H<sub>7</sub>N<sub>5</sub>S (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 5ccm fassenden Jodzahlkölbchen in 1.2ccm 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 1ccm Wasser aufgenommen, mit etwas Phenol-*o*-Dichlorbenzol extrahiert, der Extrakt mit Wasser gewaschen und nach Zusatz von Diisopropyläther und sek.-Butanol in 1ccm 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 Dinitrophenylhydrazon isoliert.

Im Arbeitskreis von B. D. DAVIS<sup>1,2)</sup> 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*<sup>3)</sup> ein wichtiges Zwischenglied 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.

<sup>1)</sup> U. WEISS, C. GILVARG, E. S. MINGIOLI und B. D. DAVIS, Science [Washington] **119**, 774 [1954].

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

<sup>3)</sup> R. L. METZENBERG und H. K. MITCHELL, Arch. Biochem. Biophysics **64**, 51 [1956].