

2. mit *Tillmans-Reagenz*: Das 2.6-Dichlor-phenolindophenol wurde in Phosphatpufferlösung, pH 7, gelöst. Der Titer wurde mit reiner Ascorbinsäure bestimmt. Die Lösung war $1.08 \cdot 10^{-3}$ molar. 13.3 mg Redukton wurden unter Röhren im Stickstoffstrom titriert. Verbrauch im Verlauf von 5 Min.: 95 ccm, im Verlauf einer Stunde insgesamt 115 ccm. Gesamtverbrauch: $115 \cdot 1.08 = 124$ ccm (96% d. Th.).

3. mit *Natronlauge*: 123 mg Redukton, gelöst in 5 ccm Wasser, verbrauchten mit Phenolphthalein als Indikator 12.1 ccm $n/10$ NaOH (100% d. Th.).

Darstellung des Triosereduktions

10 g (1/25 Mol) 1.1.3-Trimethoxy-2.3-diacetoxy-propan (X)³⁾ werden mit 100 ccm $n/2$ *p*-Toluolsulfonsäure unter Stickstoff 1 Stde. in einem Wasserbad von 70° gerührt. Die Lösung wird abgekühlt, mit 12 g Blei(II)-acetat in 20 ccm Wasser und mit 8 g Natriumacetat in 16 ccm Wasser versetzt. Das sofort ausfallende schwach gelb gefärbte Bleisalz wird abzentrifugiert, je zweimal mit Wasser und Methanol gewaschen und i. Vak. über Calciumchlorid sorgfältig getrocknet. Das feingepulverte Bleisalz (9 g) wird in 100 ccm trockenem Aceton unter heftigem Röhren aufgeschlämmt und tropfenweise mit 1.6 ccm konz. Schwefelsäure versetzt. Man röhrt noch 1 Stde., zentrifugiert das Bleisulfat ab, dampft das Aceton unter Stickstoff auf 2-3 ccm ein, kühl auf -20° und saugt das Redukton ab.

Die Kristalle werden zweimal mit Essigester ausgekocht, der Essigester mit Kohle aufgekocht und i. Vak. unter Stickstoff eingeengt. Das *Triosereduktton* kristallisiert im Eisschrank aus. Es wurde bei 90°/1 Torr sublimiert. Ausb. 1.5 g (45% d. Th.), Schmp. 148°. Der Misch-Schmelzpunkt mit einem nach l. c.^{1a)} aus Glucose dargestellten Präparat zeigt keine Depression.

**GIULIA BORETTI, DOMENICO CATTAPAN, ANACLETO MINGHETTI,
MARIO REGGIANI, UMBERTO VALCAVI und LUIGI VALENTINI**

Über einige Cobalamin-Analoga der Benzimidazol-Reihe

Laboratori Ricerche Farmitalia, Mailand

(Eingegangen am 8. Mai 1959)

Einige neue durch Biosynthese erhaltene Analoga des Vitamins B₁₂ wurden untersucht. Durch spektrophotometrische Untersuchung im ultravioletten und infraroten Licht gelang es, die Benzimidazol-Komponente dieser Substanzen als 5(6)-Äthyl-6(5)-n-propyl-benzimidazol, 5.6-Tetramethylen-benzimidazol, 5(6)-Amino-6(5)-methyl-benzimidazol zu identifizieren. Diese letzte Verbindung ist an der Struktur zweier Cobalamin-Analoga beteiligt.

Aus Kulturen von *Nocardia rugosa*¹⁾ wurden vier neue Analoga des Vitamins B₁₂ isoliert. Die Biosynthese dieser neuen Derivate gelang durch Zugabe eines der folgenden Phenylendiamine zu den Kulturnährösungen: 4-Äthyl-5-n-propyl-phenylendiamin-(1.2) (I), 6.7-Diamino-tetralin (IV) bzw. 2.4.5-Triamino-toluol (VI). Die neuen Cobalamin-Analoga wurden aus den Kulturen mit den für das Vitamin B₁₂ üblichen

¹⁾ A. DI MARCO, C. G. ALBERTI, G. BORETTI, M. GHIONE, A. MIGLIACCI, und C. SPALLA, „Vitamin B₁₂ und Intrinsic Factor“, F. Enke Verlag, Stuttgart 1957, S. 55.

Methoden extrahiert, von diesem letzteren durch Gegenstromverteilung oder durch Elektrophorese auf der Cellulosesäule getrennt und aus Aceton kristallisiert.

In der vorliegenden Mitteilung wird über die Identifizierung der Benzimidazol-Komponente dieser Verbindungen und über ihre chemischen Merkmale berichtet. Die biologischen Eigenschaften dieser Substanzen wurden an anderer Stelle schon beschrieben²⁾.

IN ANWESENHEIT VON 4-ÄTHYL-5-PROPYL-PHENYLENDIAMIN-(1.2) BIOSYNTHETISCH ERHALTENE VERBINDUNG

Durch salzaure Hydrolyse wurde aus diesem Cobalamin-Analogon 1 eine Substanz freigemacht, die das gleiche chromatographische Verhalten und UV-Absorptionsspektrum zeigt wie 5(6)-Äthyl-6(5)-n-propyl-benzimidazol (III) (Tab. 1). Das

Tab. 1. R_F -Werte und UV-Daten der durch Säure-Hydrolyse aus den Cobalamin-Analoga 1–3 erhaltenen Benzimidazol-Anteile und einiger synthetischer Benzimidazolderivate

Substanz	R_F *)	Lösungs-mittel	UV-Absorption **)		
			λ_{\max} (m μ)	$d_{283.5} / d_{274.5}$	λ_{\min} (m μ)
5.6-Dimethyl-benzimidazol	0.74	HCl	274.5; 283.5	$d_{283.5} / d_{274.5} = 1.02$	280
5(6)-Äthyl-6(5)-n-propyl-benzimidazol (III)	0.80	HCl	276; 284.5	$d_{284.5} / d_{276} = 0.98$	281
Hydrolyseprodukt des Cobalamin-Analogons 1	0.77	HCl	276; 284.5	$d_{284.5} / d_{276} = 0.98$	281
5.6-Tetramethylen-benzimidazol (V)	0.79	HCl	281; 289	$d_{288} / d_{281} = 0.94$	286
Hydrolyseprodukt des Cobalamin-Analogons 2	0.77	HCl	281; 288	$d_{288} / d_{281} = 0.94$	286
5(6)-Amino-6(5)-methyl-benzimidazol (VIII)	0.30	HCl NaOH	271; 279 297.5		276
Hydrolyseprodukt der Cobalamin-Analoga 3.I und 3.II	0.30	HCl NaOH	271; 279 297.5		276

*) Entwickler: n-Butanol/Eisessig/Wasser (40:10:50; Oberphase), Whatman Papier Nr. 1.

**) Lösungen in 0.1 n HCl oder in 0.1 n NaOH.

Vorhandensein dieses Benzimidazolderivats im Molekül des Cobalamin-Analogons 1 konnte durch dessen im Vergleich zum Vitamin B₁₂ höhere Lipoidlöslichkeit bestätigt werden. Diese erhöhte, durch die Äthyl- und Propylgruppen bedingte Lipoidlöslichkeit, wurde durch die chromatographischen Ergebnisse wie auch auf Grund der Werte der Verteilungskoeffizienten zwischen Butanol und wäßrigen Ammoniumsulfatlösungen bewiesen (Tab. 2).

Die im sichtbaren und UV-Bereich gelegenen Absorptionsspektren von wäßrigen Lösungen dieses Cobalamin-Analogons unterschieden sich nicht wesentlich vom Spektrum des B₁₂.

Einige Unterschiede wurden dagegen bez. der IR-Absorptionsbanden nachgewiesen, und zwar in der Zone zwischen 900 und 800/cm; dieser Bereich wird stark durch den

²⁾ A. DI MARCO, Haematologica latina II, 167 [1959].

Benzimidazolteil des Moleküls beeinflußt, da in ihm die Absorptionsbanden der CH-Deformationsschwingungen des verschieden substituierten Benzimidazolrings liegen.

Tab. 2. Verteilungskoeffizienten, R_F -Werte und elektrophoretisches Verhalten des Vitamins B_{12} und der Cobalamin-Analoga 1–3

Verbindung	Verteilungskoeffizient im System n-Butanol/Ammoniumsulfat in Wasser (23 g $(NH_4)_2SO_4$ + 100 ccm H_2O)	Papierchromato- graphie *) $R_F/R_F(B_{12})$	Papier-Elektro- phorese **) (p_H 2.7)
Vitamin B_{12}	0.86	0.16	1
Cobalamin-Analo- gon aus I	—	1.52	1.8
Cobalamin-Analo- gon aus IV	1.40	0.35	1.2
Cobalamin-Analo- ga aus VI	0.10	—	0.45
	0.13		0.45

*) Entwickler: sek.-Butanol/Eisessig/Wasser/5-proz. wäbr. KCN-Lösung (100 : 1 : 50 : 0.25)

**) In 0.5 n CH_3CO_2H

Ein Vergleich der IR-Spektren des Vitamins B_{12} einerseits und des Cobalamin-Analogons 1 andererseits mit denjenigen ihrer jeweiligen Benzimidazol-Anteile zeigt, daß zwischen dem Spektrum des betreffenden Vitamin B_{12} -Analogs und demjenigen

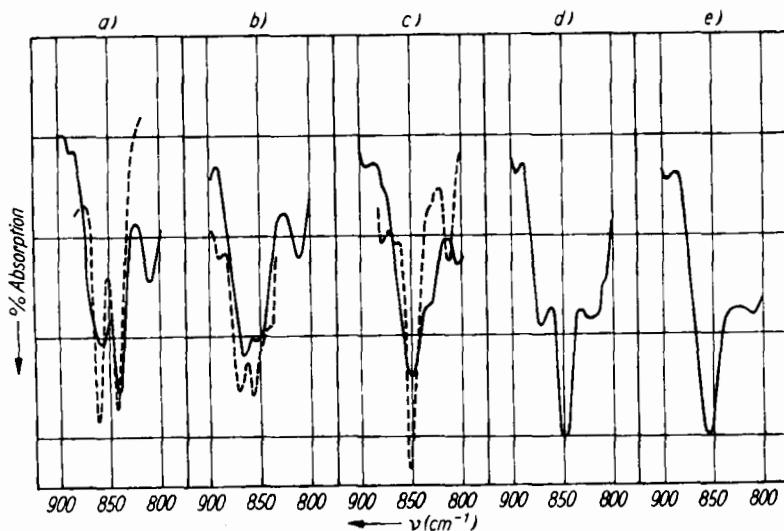


Abbildung 1. IR-Spektren von

- a) Vitamin B_{12} (—), 5,6-Dimethyl-benzimidazol (---)
- b) Cobalamin-Analogon 1 (—), 5(6)-Äthyl-(6)5-propyl-benzimidazol (III) (---
- c) Cobalamin-Analogon 2 (—), 5,6-Tetramethylen-benzimidazol (V) (---)
- d) Cobalamin-Analogon 3. I (—)
- e) Cobalamin-Analogon 3. II (—)

Die Spektren des Vitamins B_{12} und der Analoga wurden in geeigneter Weise erweitert (in der Ordinate), um den Vergleich mit den entsprechenden Benzimidazolen deutlicher zu ermöglichen

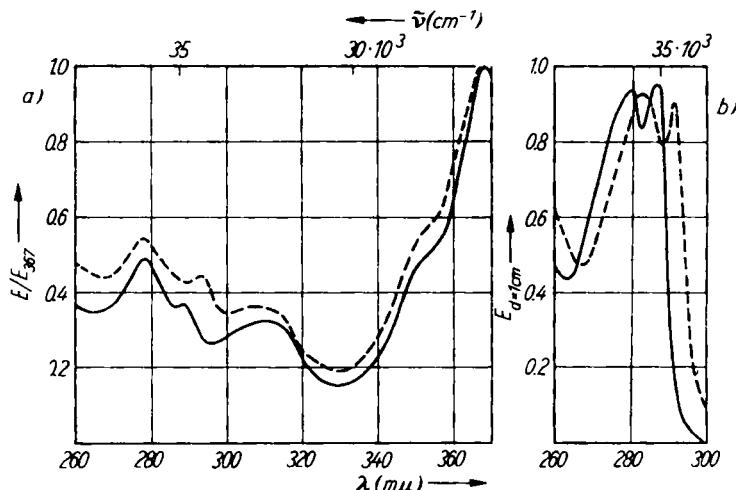
des 5(6)-Äthyl-6(5)-propyl-benzimidazols eine ähnliche Übereinstimmung im Habitus besteht wie zwischen den Spektren des Cobalamins und des 5,6-Dimethyl-benzimidazols (Abbild. 1).

IN ANWESENHEIT VON 6,7-DIAMINO-TETRALIN BIOSYNTHETISCH ERHALTENE VERBINDUNG

Aus dieser Verbindung (2) wurde durch Säure-Hydrolyse ein Benzimidazol-Derivat freigesetzt, das die charakteristischen Merkmale des 5,6-Tetramethylen-benzimidazols (V) zeigt (Tab. 1).

Die Untersuchung des IR-Spektrums in der durch die Benzimidazol-Gruppe beeinflußten Zone bestätigt die Anwesenheit von 5,6-Tetramethylen-benzimidazol (V) im Molekül des Cobalamin-Analogons (Abbild. 1).

Die Dicyano-Form des Cobalamin-Analogons 2 zeigt im UV-Absorptionsspektrum eine bathochrome Verschiebung eines Maximums, das auf die Benzimidazol-Komponente zurückzuführen ist, nach 292.5 m μ gegenüber 289 m μ bei der Dicyano-Form des Vitamins B₁₂ (Abbild. 2a). Dieses Verhalten stimmt mit der analogen Verschiebung der Absorptionsmaxima von V im Vergleich zu den Maxima des 5,6-Dimethyl-benzimidazols überein (Abbild. 2b).



Abbild. 2. UV-Spektren von

- a) Vitamin B₁₂ (—), Analogon 2 (---) (Dicyano-Formen)
- b) 5,6-Dimethyl-benzimidazol (—), 5,6-Tetramethylen-benzimidazol (V) (---), 25 g/ccm
Alle Lösungen wurden in 0.067 n Na₂HPO₄, (100 g NaCN/ccm enthaltend) hergestellt

Der chromatographische R_F -Wert und der Wert des Verteilungskoeffizienten dieses Cobalamin-Analogons liegen ungefähr zwischen denjenigen des Vitamins B₁₂ und des Cobalamin-Analogons 1.

IN ANWESENHEIT VON 2,4,5-TRIAMINO-TOLUOL BIOSYNTHETISCH ERHALTENE COBALAMIN-ANALOGA

Aus Kulturen mit einem Zusatz von 2,4,5-Triamino-toluol (VI) wurden zwei Cobalamin-Analoga isoliert, die durch ihre verschiedene elektrophoretische Beweglich-

keit bei p_{H} 2.7 voneinander getrennt werden konnten (Tab. 2). Wir bezeichnen als 3. I bzw. 3. II die Analoga mit der größeren bzw. der geringeren Beweglichkeit nach der Kathode.

Die Identifizierung der Benzimidazol-Komponente in beiden Produkten mit 5(6)-Amino-6(5)-methyl-benzimidazol (entspr. VIII) gründet sich auf die Tatsache, daß aus beiden Cobalamin-Analoga 3. I und 3. II durch Säurehydrolyse eine Substanz erhalten werden kann, die im chromatographischen Verhalten und im Absorptionspektrum bei saurem und alkalischem p_{H} mit synthetischem 5(6)-Amino-6(5)-methyl-benzimidazol-dihydrochlorid (VIII) identisch ist. Im Säurehydrolysat der beiden Analoga konnten wir papierchromatographisch eine weitere, nicht identifizierte Substanz nachweisen, die sich von 5(6)-Amino-6(5)-methyl-benzimidazol durch einen höheren R_f -Wert (etwa 0.4), durch gelbe Fluoreszenz und durch das UV-Absorptionsspektrum mit einem einzigen Maximum bei 255 m μ sowohl in 0.1 n HCl wie auch in 0.1 n NaOH unterscheidet. Wir sind der Meinung, daß diese Substanz nicht ursprünglich im Molekül der Cobalamin-Analoga 3. II und 3. I vorhanden ist, sondern sich infolge einer Veränderung der Benzimidazol-Komponente während der Säurehydrolyse bildet. Tatsächlich wurde sie in Lösungen von synthetischem 5(6)-Amino-6(5)-methyl-benzimidazol gefunden, nachdem diese unter den gleichen Bedingungen, wie sie zur Hydrolyse der Cobalamin-Analoga angewendet werden, mit 6 n HCl behandelt worden waren.

Die Anwesenheit von 5(6)-Amino-6(5)-methyl-benzimidazol im Molekül der beiden Vitamin B₁₂-Analoga wird ferner bestätigt durch die Absorptionsspektren ihrer wässrigen Lösungen im Bereich zwischen 260 und 315 m μ . Variiert man nämlich den p_{H} -

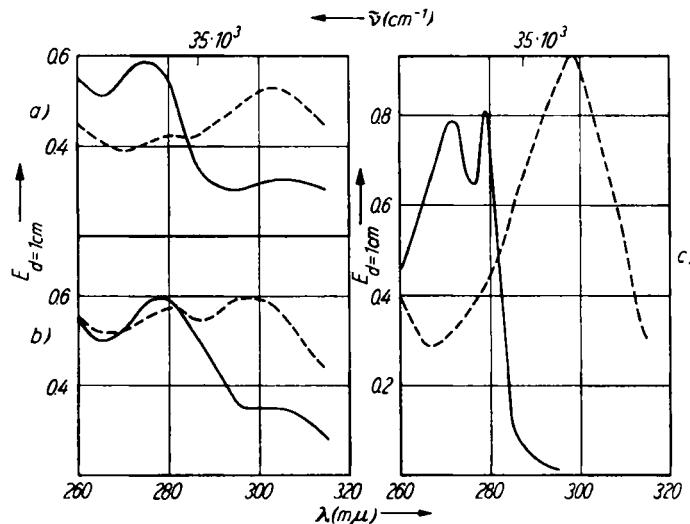


Abbildung 3. UV-Spektren von

- a) Cobalamin-Analogen 3. II, 49.8 γ/ccm in 0.1 n HCl (—), in 0.1 n NaOH (---)
- b) Cobalamin-Analogen 3. I, 46 γ/ccm 0.1 n HCl (—), in 0.1 n NaOH (---)
- c) 5(6)-Amino-6(5)-methyl-benzimidazol, 29 γ/ccm in 0.1 n HCl (—), in 0.1 n NaOH (---)

Wert von 1 bis 13, so beobachtet man bei 300—305 m μ ein Maximum, das denjenigen alkalischer Lösungen von 5(6)-Amino-6(5)-methyl-benzimidazol entspricht (Abbildung 3). Diese Veränderung des Absorptionsspektrums mit variiertem p_H ermöglicht eine näherungsweise Berechnung des p_K -Werts der Aminogruppierung in den beiden Verbindungen; für das Analogon 3. I ergab sich 3.5, für 3. II der Wert 3.

Hier muß erwähnt werden, daß in alkalischer Lösung (p_H 9.35) die Monocyanoformen der beiden Verbindungen einen gewissen Unterschied im UV-Spektrum aufweisen, und zwar in dem durch den Benzimidazolkern beeinflußten Bereich; die Dicyano-Formen dagegen zeigen für gleiche p_H -Werte ein recht ähnliches Spektrum (Abbildung 4). Das könnte so gedeutet werden, daß der Unterschied im Absorptionspektrum der beiden Substanzen zum großen Teil durch den dem porphyrinähnlichen Ring benachbarten Benzimidazolring bestimmt wird und daher abnimmt, wenn die Koordinationsbindung zwischen dem Benzimidazolkern und dem Kobaltatom durch überschüssige CN-Gruppen aufgehoben wird.

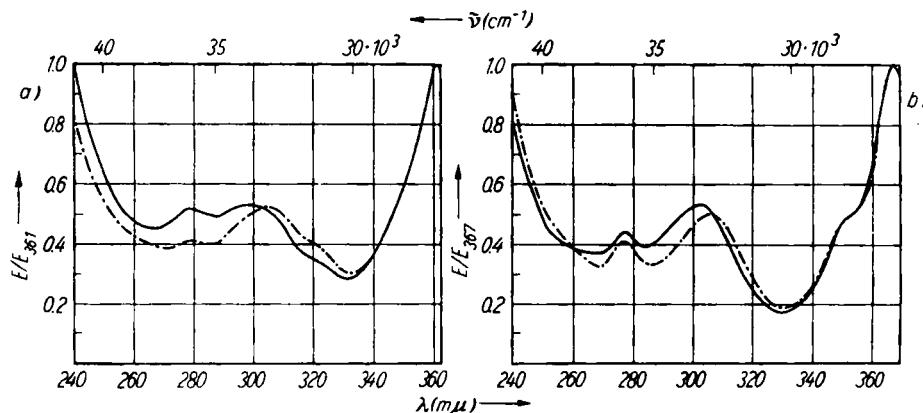


Abbildung 4. UV-Spektren von

a) Cobalamin-Analogon 3. I (—), Cobalamin-Analogon 3. II (— · —), Monocyanoformen bei p_H 9.35

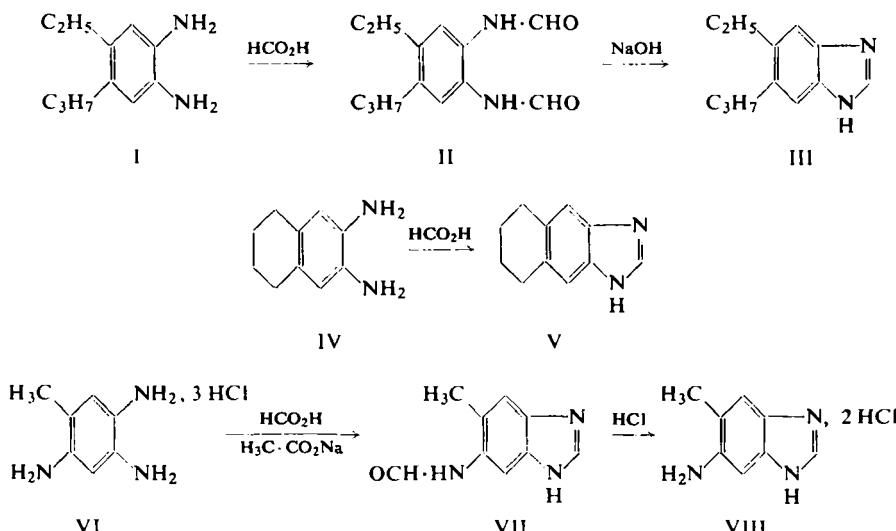
b) Cobalamin-Analogon 3. I (—), Cobalamin-Analogon 3. II (— · —), Dicyanoformen bei p_H 9.35

Die IR-Spektren der beiden Analoga zeigen in der dem Benzimidazolkern zuzuschreibenden Zone deutliche Unterschiede bezüglich der Stellung der Hauptbanden (Abbildung 1). Das Spektrum des 5(6)-Amino-6(5)-methyl-benzimidazols wurde nicht aufgenommen, da es Schwierigkeiten bereitete, die freie Base zu gewinnen.

Wir halten es für wahrscheinlich, daß die beiden Cobalamin-Analoga 3. I und 3. II bezüglich der von den Methyl- und Aminogruppen eingenommenen Stellung im Molekül der Benzimidazol-Riboside untereinander verschieden sind, so wie es für die von K. BERNHAUER und W. FRIEDRICH³⁾ beschriebenen 5- und 6-Methyl-benzimidazol-Cobalamin-Analoga nachgewiesen wurde.

³⁾ IV. Int. Kongress für Biochemie, Wien, 1.—6. Sept. 1958; Zusammenfassungen, Sekt. 10 · 8, S. 123, Pergamon Press, London 1958.

Die in der vorliegenden Mitteilung behandelten, bisher nicht beschriebenen Benzimidazol-Abkömmlinge wurden nach folgendem Schema hergestellt:



Das aus der Literatur⁴⁾ bekannte 4-Äthyl-5-n-propyl-phenylenediamin-(1.2) (I) reagiert mit Ameisensäure zum *N,N'*-Diformylderivat II, das durch alkalische Verseifung in das Benzimidazol III übergeführt wird.

Das ebenfalls bekannte⁵⁾ 6,7-Diamino-tetralin (IV) gibt mit Ameisensäure direkt das Benzimidazol V.

Das in der Literatur⁶⁾ erwähnte 2,4,5-Triamino-toluol-trihydrochlorid (VI) ergibt mit Ameisensäure und in Anwesenheit von Natriumacetat das *N*-Formyl-benzimidazol VII, das mit HCl verseift und in das Dihydrochlorid VIII übergeführt wird.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

5(6)-Äthyl-6(5)-n-propyl-benzimidazol (III): 3 g 4-Äthyl-5-n-propyl-phenylenediamin-(1.2) (I) behandelte man unter Rückfluß mit 10 ccm 95-proz. Ameisensäure und verdampfte sodann bei 60° i. Hochvak. bis fast zur Trockne. Den Rückstand nahm man in 10 ccm Wasser auf, brachte mit 10-proz. Natronlauge auf $p\text{H}$ 8, extrahierte den pastösen Niederschlag 3 mal mit je 30 ccm Äthylacetat, wusch den Extrakt mit Wasser neutral, trocknete über Natriumsulfat und verdampfte i. Hochvak. zur Trockne. Aus 5 ccm Äthanol kristallisierten 1.4 g *Diformylderivat II* vom Schmp. 123–125°.

$\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$ (234.3) Ber. C 66.64 H 7.74 Gef. C 67.30 H 7.91

200 mg *II* erhielt man mit 5 ccm 10-proz. währ. Natronlauge und 10 ccm Methanol 10 Min. unter Rückfluß, verdampfte das Methanol, verdünnte den Rückstand mit 50 ccm Wasser, filtrierte das ausgeschiedene Rohprodukt und wusch mit Wasser. Trocknen bei 50°

⁴⁾ C. G. ALBERTI und U. VALCAVI, Gazz. chim. ital. **87**, 329 [1957].

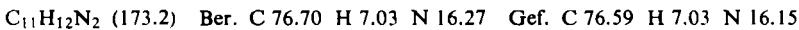
⁵⁾ G. SCHROETER, Liebigs Ann. Chem. **426**, 17 [1922].

⁶⁾ S. RUHEMANN, Ber. dtsch. chem. Ges. **14**, 2657 [1881].

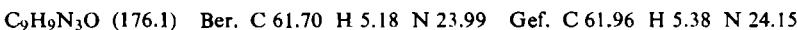
und Umkristallisieren aus Benzol/Petroläther lieferten 170 mg *5(6)-Äthyl-6(5)-n-propyl-benzimidazol* (III) vom Schmp. 108–109°.



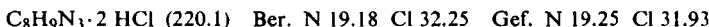
5,6-Tetramethylen-benzimidazol (V): 3 g *6,7-Diamino-tetralin* (IV) und 9 ccm 99-proz. Ameisensäure wurden 2 Stdn. im Wasserbad erhitzt. Nach Kühlung setzte man bis zur schwachen Alkalität 10-proz. Natronlauge zu, extrahierte das abgetrennte halbfeste Produkt mit Äthylacetat, wusch den Extrakt sorgfältig und verdampfte zur Trockne. Der Rückstand lieferte, aus Benzol umkristallisiert, 1,8 g V vom Schmp. 139–141°.



5(6)-Amino-6(5)-methyl-benzimidazol (VIII): 1 g *2,4,5-Triamino-toluol-trihydrochlorid* (VI) erhielt man mit 1 g wasserlöslichem Natriumacetat und 10 ccm 88-proz. Ameisensäure 2 Stdn. unter Rückfluß, beließ nach dem Erkalten über Nacht bei Raumtemperatur, verdünnte mit 10 ccm Wasser und alkalisierte mit 10-proz. Natronlauge bis p_{H} 9–10. Aus der i. Hochvak. eingeengten Lösung fiel ein Niederschlag aus, der filtriert, getrocknet und aus Wasser umkristallisiert wurde: 650 mg VII, Schmp. 203–205° (Zers.).



500 mg der vorstehenden Formylverbindung VII erwärmt man mit 10 ccm 10-proz. Salzsäure 30 Min. auf dem Wasserbad, verdampfte i. Hochvak. zur Trockne und kristallisierte den Rückstand aus konz. Salzsäure um. Ausb. 220 mg VIII vom Schmp. 280–285° (Zers.).



Säurehydrolyse der Cobalamin-Analoga: Man löste die Substanzen (etwa 2 mg) in 0.5 ccm 6 n HCl und erwärmt die Lösungen im zugeschmolzenen Rohr 20 Stdn. auf 150°. Nach der Hydrolyse verdünnte man die Lösungen mit Wasser auf das Zehnfache, befreite sie durch wiederholtes Ausziehen mit n-Butanol von roten Farbstoffen⁷⁾ und engte ein; zur Papierchromatographie der Konzentrate diente das System n-Butanol/Essigsäure/Wasser (40:10:50; Oberphase). In anderen Fällen wurde das Benzimidazol aus dem Hydrolysat nach der Methode von N. G. BRINK und K. FOLKERS⁸⁾ extrahiert.

Spektren im infraroten Bereich: Alle Messungen im infraroten Bereich wurden an Kaliumbromidpreßlingen mit dem Perkin-Elmer-Spektrographen, Mod. 21 (linear in cm^{-1} ; Natriumchloridprisma), im Bereich von 4000 bis 650/cm ausgeführt.

Spektrophotometrische Bestimmung der p_K -Werte: Der p_K -Wert der Aminobenzimidazolgruppen in den beiden Cobalamin-Analoga 3.I und 3.II wurde nach der von D. SHUGAR und J. FOX⁹⁾ beschriebenen Methode bestimmt, und zwar auf Grund der p_{H} -abhängigen Variationen in den UV-Spektren.

Verwendet wurden die folgenden Pufferlösungen: von p_{H} 1–2 0.05 m Salzsäure/Kaliumchlorid-Puffer; von p_{H} 2.25–2.5 0.05 m Glycerin/Salzsäure-Puffer; von p_{H} 2.6–6.17 0.05 m Citronensäure/Natriumbiphosphat-Puffer. Für p_{H} 12 wurde 0.01 n NaOH und für p_{H} 13 0.1 n NaOH verwendet. Zur Berechnung diente die Absorption bei 300 m μ für das Analogon 3.I und bei 305 m μ für das Analogon 3.II.

⁷⁾ G. R. BEAVEN, E. R. HOLIDAY, E. A. JOHNSON, B. ELLIS, P. MAMALI, V. PETROW und B. STURGEON, J. Pharmacy Pharmacol. 1, 957 [1949].

⁸⁾ J. Amer. chem. Soc. 72, 4442 [1950].

⁹⁾ Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 9, 199 [1952].