

163. Reduktionsprodukte von Vitamin B₁₂.

Versuche mit Vitamin B₁₂, 2. Mitteilung¹⁾

von O. Schindler.

(28. V. 51.)

Schüttelt man eine wässrige Lösung von Vitamin B₁₂²⁾ mit Pt in H₂-Atmosphäre, so wird nach *Kaczka, Wolf & Folkers*³⁾ eine beträchtliche Menge Wasserstoff aufgenommen, wobei die Farbe in hellbraun umschlägt. Diese Lösung wird bei Luftzutritt wieder rot, und es lässt sich aus ihr das krist. Vitamin B_{12a}³⁾ isolieren, für das *Kaczka* und Mitarbeiter⁴⁾ neuerdings den Namen Hydroxo-cobalamin vorschlagen. Es besteht gegenüber dem Ausgangsmaterial ein etwas verändertes Absorptionsspektrum, indem vor allem das Maximum der auffallendsten Absorptionsbande von 361 m μ nach ca. 350–358 m μ verschoben ist, wobei die genaue Lage vom pH abhängig ist (siehe die Kurven bei *Kaczka* und Mitarbeitern⁵⁾ und *Jackson* und Mitarbeitern⁶⁾). Produkte, die wahrscheinlich mit B_{12a} identisch sind, bilden sich auch bei der Chromatographie von B₁₂ auf Papier⁷⁾, bei milder Hydrolyse⁸⁾ und durch Belichtung⁹⁾. Nach *Brockmann* und Mitarbeitern⁸⁾, *Brink* und Mitarbeitern¹⁰⁾ sowie *Kaczka* und Mitarbeitern⁵⁾ ist B_{12a} wahrscheinlich identisch mit Vitamin B_{12b}, wie es aus Leber¹¹⁾, *Aureomyces*¹²⁾- und *Streptomyces*⁵⁾¹³⁾¹⁴⁾-Kulturen und Neomycin-Gärlösungen⁶⁾ isoliert wurde. Je nach pH und Anwesenheit verschiedener Ionen dürften sich auch andere Komplexe bilden können⁴⁾.

¹⁾ 1. Mitteilung: O. Schindler, *Helv.* **34**, 101 (1951).

²⁾ Vgl. Übersichtsreferate von K. Folkers, *Chem. Eng. News* **28**, 1634 (1950) und von E. L. Smith, *J. Pharmac. Pharmacol.* **2**, 409 (1950).

³⁾ E. A. Kaczka, D. E. Wolf, F. A. Kuehl & K. Folkers, *Am. Soc.* **71**, 1514 (1949).

⁴⁾ E. A. Kaczka, D. E. Wolf, F. A. Kuehl & K. Folkers, *Science* **112**, 354 (1950).

⁵⁾ E. A. Kaczka, R. G. Denkewalter, A. Holland & K. Folkers, *Am. Soc.* **73**, 335 (1951).

⁶⁾ W. G. Jackson, G. B. Whitefield, W. H. De Vries, H. A. Nelson & J. S. Evans, *Am. Soc.* **73**, 337 (1951).

⁷⁾ H. B. Woodruff & J. C. Foster, *J. Biol. Chem.* **183**, 569 (1950).

⁸⁾ J. A. Brockmann, J. V. Pierce, E. L. R. Stokstad, H. P. Broquist & T. H. Jukes, *Am. Soc.* **72**, 1042 (1950).

⁹⁾ H. G. Wijmenga, W. L. C. Veer & J. Lens, *Biochim. Biophysic. Act.* **6**, 229 (1950).

¹⁰⁾ N. G. Brink, F. A. Kuehl & K. Folkers, *Science* **112**, 354 (1950).

¹¹⁾ E. L. R. Stokstad, T. H. Jukes, J. V. Pierce, A. C. Page & A. L. Franklin, *J. Biol. Chem.* **180**, 647 (1949).

¹²⁾ J. V. Pierce, A. C. Page, E. L. R. Stokstad & T. H. Jukes, *Am. Soc.* **71**, 2952 (1949).

¹³⁾ H. H. Fricke, B. Lanius, A. F. De Rose, M. Lapidus & D. F. Frost, *Fed. Proc.* **9**, 173 (1950).

¹⁴⁾ Smith, Fantes, Ball, Abstracts of Papers, A. C. S. Meeting Spring 1950, p. 10 A; zitiert nach W. G. Jackson, G. B. Whitefield, W. H. De Vries, H. A. Nelson & J. S. Evans, *Am. Soc.* **73**, 337 (1951).

Da Vitamin B_{12a} sich durch KCN leicht wieder in B_{12} überführen lässt¹⁾ stellt es sicher kein eigentliches Reduktionsprodukt von B_{12} dar. Vielmehr liegt es nahe, anzunehmen, dass letzteres am dreiwertigen³⁾ Co-Atom mindestens eine CN-Gruppe koordinativ gebunden enthält, die im B_{12a} durch die Hydroxo-Gruppe ersetzt ist.

Vitamin B_{12} enthält nur eine polarographisch reduzierbare Gruppierung⁵⁾), die dem Übergang von Co^{III} in Co^{II} entsprechen dürfte.

Herr Prof. V. Prelog hatte die Freundlichkeit, unser Präparat zu untersuchen; er schrieb dazu am 16. und 23. Januar 1950:

„1 mg Vitamin B_{12} wurde in 2 cm³ Britton-Robinson-Puffer⁷⁾ vom pH = 6,98 im Bereich von –0,1 bis –1,6 V untersucht. Die Lösung zeigte nur eine Stufe mit einem Halbstufenpotential von –1,102 V (gegen N.C.E.) $I_D = 0,79$ A ($c = 3,4 \cdot 10^{-4}$ Mol). Dies würde recht gut einem Übergang von Co^{II} in Co^I entsprechen. Co^{II} gibt beispielsweise in Pyridin-Pyridin-hydrochlorid ein Halbstufenpotential von –1,10 V. Das Halbstufenpotential des Überganges von Co^{III} in Co^{II} liegt meistens viel positiver bei etwa –0,3 V. Selbstverständlich könnte bei einem besonders stabilen Co^{III} -Komplex das Halbstufenpotential stark negativer werden, wie im Falle von $Co(CN)_6^{+++}$.“

Wir glauben, dass ein analoger Übergang bei der Hydrierung von B_{12} stattfindet, wobei die komplex gebundene CN-Gruppe als HCN vom Cobalt gelöst wird⁸⁾. Bei der anschliessenden Rückoxydation wird, falls keine oder ungenügend CN-Ionen anwesend sind, die wieder verfügbare Koordinationsstelle des Cobalt durch andere Liganden besetzt z. B. durch –OH unter Bildung von B_{12a} .

Es schien uns von Interesse, auch das Spektrum der reduzierten Form mit zweiwertigem Cobalt kennenzulernen. Bei der Hydrierung mit H_2 ergaben sich apparative Schwierigkeiten. B_{12} ist aber auch noch mit andern Mitteln reduzierbar:

Zusatz von $NaHSO_3$ ⁹⁾ zur wässrigen Lösung von B_{12} bei 20° hellt die Farbe wesentlich auf und ändert den Farbton nach orange.

¹⁾ E. A. Kaczka, D. E. Wolf, F. A. Kuehl & K. Folkers, Science **112**, 354 (1950).

²⁾ H. G. Wijmenga, W. L. C. Veer & J. Lens, Biochim. Biophys. Act. **6**, 229 (1950).

³⁾ F. Grün & R. Menassé, Exper. **6**, 263 (1950).

⁴⁾ H. Diehl, R. W. Van der Haar & R. R. Sealock, Am. Soc. **72**, 5312 (1950); vgl. auch J. C. Wallmann, B. B. Cunningham & M. Calvin, Science **113**, 55 (1951).

⁵⁾ E. L. Smith, Vortrag am 1. Internat. Congress of Biochemistry Cambridge, Aug. 1949; H. Diehl, I. E. Morrison & R. R. Sealock, Exper. **7**, 60 (1951); K. H. Fantes, J. E. Page, L. F. J. Parker & E. Lester Smith, Proc. Royal Soc. London **136**, B 592 (1949).

⁶⁾ Wir danken Herrn Prof. V. Prelog, Zürich, für die Ausführung und Interpretierung der polarographischen Messung unseres Präparates.

⁷⁾ H. T. S. Britton & R. A. Robinson, Soc. **133**, 1456 (1931).

⁸⁾ Eine andere Möglichkeit wäre die, dass die CN-Gruppe durch Hydrierung zu Methylamin zerstört wird.

⁹⁾ Änderungen im Absorptionsspektrum von Vitamin B_{12} durch $NaHSO_3$ und $Na_2S_2O_4$ wurden schon von H. H. Fricke, B. Lanius, A. F. De Rose, M. Lapidus & D. V. Frost, Fed. Proc. **9**, 173 (1950), beobachtet. Das kristallisierte Reaktionsprodukt wurde nicht beschrieben. Vgl. auch E. L. Smith, K. H. Fantes, S. Ball, D. M. Ireland, J. G. Waller, W. B. Emery, W. K. Anslow & A. D. Walker, Proc. Biochem. Soc. 293rd. Meeting, Biochem. J. **48**, l, (April 1951).

Nach Ausschütteln des Vitamins mit Chloroform-Phenol-Gemisch liess sich durch anschliessende Kristallisation aus Wasser-Aceton etwa 60% in Kristallen gewinnen, deren Absorptionsmaximum (in Methanol) bei $355\text{ m}\mu$ lag wie bei B_{12a} resp. B_{12b} . Ähnliche Resultate gab Natriumdithionit in leicht alkalischer Lösung. Diese zwei Reagentien scheinen aber keine Reduktion zur zweiwertigen Stufe hervorzurufen. Das Reaktionsprodukt mit NaHSO_3 liess sich mit KCN wieder in B_{12} überführen.

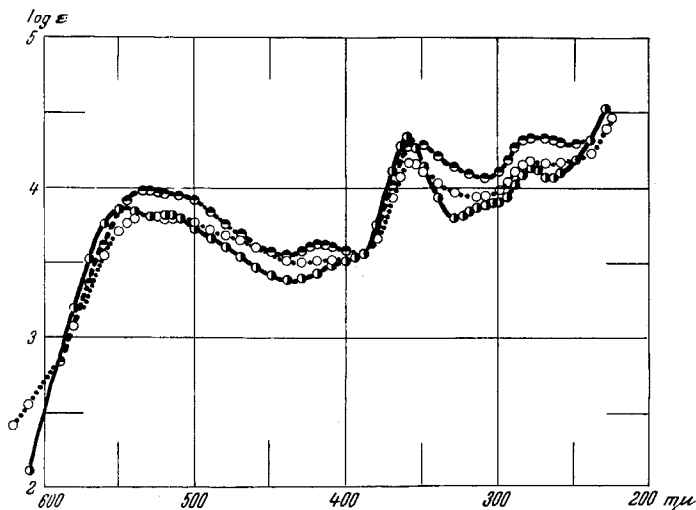


Fig. 1.

Absorptionsspektren in methanolischer Lösung von:

- a) ○······○ Reaktionsprodukt von Vitamin B_{12} mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$
 Max. bei $277\text{ m}\mu$, $\log \epsilon = 4,16$; Max. bei $357\text{ m}\mu$, $\log \epsilon = 4,16$
 Max. bei $532\text{ m}\mu$, $\log \epsilon = 3,79$
- b) ●······● Vitamin B_{12}
 Max. bei $278\text{ m}\mu$, $\log \epsilon = 4,12$; Max. bei $360\text{ m}\mu$, $\log \epsilon = 4,33$
 Max. bei $518\text{ m}\mu$, $\log \epsilon = 3,80$; Max. bei $550\text{ m}\mu$, $\log \epsilon = 3,85$
- c) ●······● Reaktionsprodukt von Vitamin B_{12} mit NaHSO_3
 Max. bei $275\text{ m}\mu$, $\log \epsilon = 4,33$; Max. bei $355\text{ m}\mu$, $\log \epsilon = 4,31$
 Max. bei $418\text{ m}\mu$, $\log \epsilon = 3,62$; Max. bei $530\text{ m}\mu$, $\log \epsilon = 3,98$

Die $\log \epsilon$ -Werte sind auf das Molekulargewicht 1300 berechnet.

Interessanter war die Einwirkung von Zinkstaub in wässriger NH_4Cl -Lösung in N_2 -Atmosphäre. Die Lösung färbte sich zunächst braun und bei längerem Schütteln hellblau. Wir vermuten, dass hier das Reduktionsprodukt mit 2wertigem Cobalt vorliegt. Bei Zutritt von Luft schlägt die Farbe der blauen Lösung sofort in rot um. Die Aufarbeitung dieser Lösung gab aus Wasser-Aceton Kristalle, deren Spektrum ungefähr demjenigen von B_{12a} entspricht. Sie erwiesen sich an *Lactobac. lactis* und *Lactobac. Leichtmannii* als biologisch wirksam. Durch Einwirkung von KCN wurden Kristalle erhalten, die nach

Spektrum (vgl. Fig. 2c) und biologischer Aktivität (gemessen an *Lactobac. Leichmannii*) mit Vitamin B₁₂ identisch waren¹⁾.

Von besonderem Interesse schien uns, das Spektrum der blauen reduzierten Lösung. Zu diesem Zweck haben wir die Reaktion mit reinstem, elektrolytisch abgeschiedenem Zinkstaub und wässriger NH₄Cl-Lösung direkt in der Quarzküvette ausgeführt, die für diesen Zweck luftdicht verschlossen wurde. Als Vergleichslösung diente eine gleiche NH₄Cl-Lösung, die ebenfalls unter völligem Luftabschluss 24 Stunden mit Zinkstaub geschüttelt wurde. Wie sich aus Kurve b (Fig. 2) ergibt, zeigt die blaue Lösung eine von B₁₂ völlig verschiedene Absorption. Leider ist sie wenig charakteristisch, so dass eindeutige Schlussfolgerungen daraus vorläufig nicht gezogen werden können.

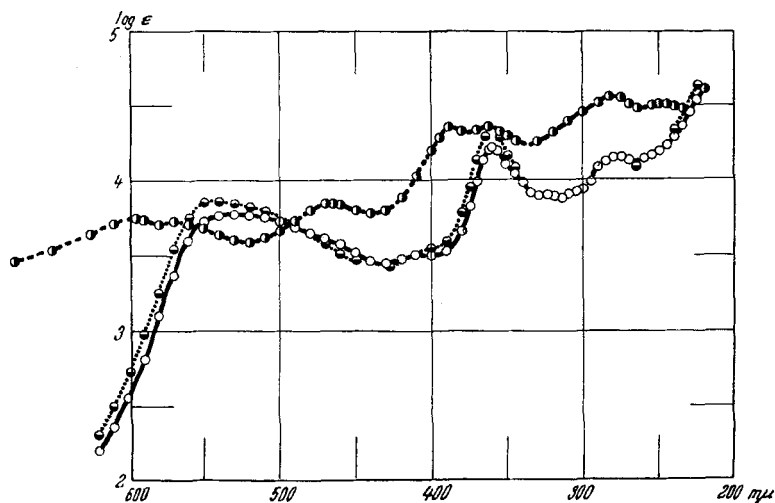


Fig. 2.

Absorptionsspektren von:

- a) ○——○ durch Luft zurückoxydiertes Reduktionsprodukt von Vitamin B₁₂ mit Zn in NH₄Cl-Lösung (Absorptionsspektrum in Methanol)
 Max. bei 277 mμ, log ε = 4,15; Max. bei 325 mμ, log ε = 3,90
 Max. bei 359 mμ, log ε = 4,22; Max. bei 530 mμ, log ε = 3,76
- b) ○-----○ Reduktionsprodukt von Vitamin B₁₂ mit Zn in NH₄Cl-Lösung
- c) ○.....○ Reaktionsprodukt zwischen HCN und dem in Fig. 2a) aufgezeichneten Reduktionsprodukt (Absorptionsspektrum in Methanol)
 Max. bei 278 mμ, log ε = 4,16; Max. bei 320 mμ, log ε = 3,89
 Max. bei 360 mμ, log ε = 4,36; Max. bei 440 mμ, log ε = 3,48
 Max. bei 545 mμ, log ε = 3,86.

Die log ε-Werte sind auf das Molekulargewicht 1300 berechnet.

¹⁾ Die Prüfung wurde von Herrn Prof. W. H. Schopfer, Bern, sowie von Herrn Dr. V. Kocher, Basel, durchgeführt. Ersterer fand einen etwas zu hohen, letzterer einen zu tiefen Wert; es scheint sich um momentane Störungen in der biologischen Bestimmung gehandelt zu haben.

Die Aufnahme der Absorptionsspektren geschah durch Herrn *P. Zoller* in einem *Beckman*-Spektrophotometer an der organisch-chemischen Anstalt der Universität Basel. Die mikrobiologischen B_{12} -Bestimmungen verdanken wir zum Teil Herrn Prof. Dr. *W. H. Schopfer*, Universität Bern, zum Teil Herrn Dr. *V. Kocher*, Basel.

Ich danke Herrn Prof. *T. Reichstein*, Basel, für sein Interesse sowie der *Haco-Gesellschaft AG.*, Gümligen, für die Unterstützung meiner Arbeit.

Experimenteller Teil.

Reaktion von Vitamin B_{12} mit $NaHSO_3$. 15 mg B_{12} wurden in der Lösung von 60 mg $NaHSO_3$ in 5 cm³ Wasser gelöst und eingeschmolzen drei Tage bei 18° im Dunkeln stehengelassen. Die rote Farbe war dabei deutlich heller und orangestichig geworden. Die Lösung wurde 5mal mit je 3-cm³-Portionen einer Mischung von 1 Vol.-Teil frisch destilliertem Phenol mit 4 Vol.-Teilen Chloroform ausgeschüttelt. Die gelbbraun gefärbten organischen Auszüge wurden in einem zweiten Scheidetrichter mit 1 cm³ Wasser gewaschen. Das Chloroform wurde im Vakuum bei Zimmertemperatur abdestilliert und die zurückgebliebene phenolische Lösung mit 20 cm³ Äther verdünnt. Die dabei ausgefallenen braunen Flocken wurden durch Ausschütteln mit Wasser gelöst. Die wässrigen Lösungen passierten einen zweiten Scheidetrichter mit 10 cm³ Äther. Das Ausschütteln mit Wasser wurde so oft wiederholt, bis dieses keine gefärbten Bestandteile mehr aufnahm. Die wässrige Lösung wurde im Vakuum eingedampft; Rückstand 21 mg. Diese gaben aus Wasser-Aceton 10 mg braune, zu Drusen angeordnete Nadeln, die mit Aceton gewaschen und aus Wasser-Aceton umkristallisiert wurden.

8 mg Mutterlaugen wurden in methanolischer Lösung durch eine Säule von 500 mg aktiviertem Aluminiumoxyd filtriert. 20 cm³ methanolische, braunrot gefärbte Eluate hinterliessen beim Eindampfen im Vakuum 4 mg, die aus Wasser-Aceton 1 mg Nadeln lieferten, die im Absorptionsspektrum und in der mikrobiologischen Aktivität von dem nicht chromatographierten Produkt nicht zu unterscheiden waren.

Die Kristalle enthalten neben C, H und N noch Co und P, S-Probe negativ; das Absorptionsspektrum in methanolischer Lösung ist in Fig. 1b) aufgezeichnet. Mikrobiologische Aktivität: *Lactobac. Leichmannii* = 1; *Lactobac. lactis* = 1.

2,5 mg des Reaktionsproduktes wurden in der Lösung von 20 mg KCN in 2 cm³ Wasser, deren pH mit 50-proz. Essigsäure auf 5,5 gestellt war, gelöst und 24 Stunden bei 20° im Dunkeln stehengelassen. Die rotviolette Lösung wurde 4mal mit 1 cm³ einer Mischung von 1 Vol.-Teil Phenol mit 4 Vol.-Teilen Chloroform ausgeschüttelt, wodurch der wässrigen Lösung alle gefärbten Anteile entzogen wurden. Die übliche Aufarbeitung der organischen Auszüge gab 2 mg Rückstand, der aus Wasser-Aceton 1 mg Kristalle gab, die zur Aufnahme des Spektrums aus Wasser-Aceton umkristallisiert wurden. Das Spektrum in methanolischer Lösung war gleich wie dasjenige von B_{12} . Mikrobiologische Aktivität: *Lactobac. Leichmannii* = 1; *Lactobac. lactis* = 1.

Reaktion von Vitamin B_{12} mit $Na_2S_2O_4$. 5 mg B_{12} wurden in 1 cm³ Wasser gelöst, mit 0,01 cm³ 20-proz. Pottasche-Lösung versetzt und zu dieser Lösung 20 mg Natriumdithionit in 1 cm³ Wasser gegeben. Nach 2 Stunden Reaktion bei Zimmertemperatur war das pH gegen den Neutralpunkt abgesunken, weshalb noch einmal 0,01 cm³ 20-proz. Pottasche-Lösung bis zur ganz schwach phenolphthaleinpositiven Reaktion zugefügt wurden. Nach 24 Stunden Stehen bei Zimmertemperatur wurde die Lösung mit 1 cm³ Wasser verdünnt und im Scheidetrichter 5mal mit je 2 cm³ einer Mischung von 1 Vol.-Teil Phenol mit 5 Vol.-Teilen Chloroform ausgeschüttelt. Die braungefärbten, organischen Auszüge wurden 1mal mit 0,5–1 cm³ Wasser gewaschen und dann das Chloroform im Vakuum abdestilliert. Die zurückgebliebene Phenollösung wurde mit 15 cm³ Äther verdünnt und diese Lösung im Scheidetrichter so oft mit kleinen Portionen Wasser ausgeschüttelt, bis dieses keine gefärbten Substanzen mehr aufnahm. Die wässrige Lösung wurde im Vakuum eingedampft. Rückstand: 5 mg. Diese wurden in wenig Wasser gelöst und mit Aceton bis zur Trübung versetzt. Nach 21 Tagen Stehen bei 0° hatten sich 1,5 mg Nadeln, die in kugeligen Haufen angeordnet waren, abgeschieden. Die Kristalle wurden

mit Aceton gewaschen und aus Wasser-Aceton umkristallisiert. Ausbeute an reinem Produkt: 627 γ . Das Absorptionsspektrum in methanolischer Lösung ist in Fig. 1 c) aufgezichnet. Mikrobiologische Aktivität: *Lactobac. Leichmannii* = 0,3; *Lactobac. lactis* = 0,3.

Reduktion von Vitamin B_{12} mit Zinkstaub in Ammoniumchlorid-lösung. 40 mg Vitamin B_{12} wurden mit 200 mg elektrolitisch abgeschiedenem Zinkstaub in 10 cm³ 10-proz. wässriger NH_4Cl -Lösung unter Stickstoff geschüttelt. Nach ca. 15 Minuten hatte die Farbe der Lösung von rot in braun gewechselt. Nach 24 Stunden war die Lösung blau-grün. Nach 48 Stunden wurde die Reaktion abgebrochen und Luft in die Apparatur eingelassen. Dabei wurde die Lösung momentan rotbraun. Die vom Zinkstaub auszentrifugierte Lösung wurde 5mal mit je 10 cm³ einer Mischung von 1 Vol.-Teil Phenol mit 4 Vol.-Teilen Chloroform ausgeschüttelt und die rotbraun gefärbten organischen Auszüge mit 1 cm³ Wasser gewaschen. Das Chloroform wurde im Vakuum abdestilliert und die phenolische Lösung mit 70 cm³ Äther verdünnt. Diese wurde so oft mit kleinen Portionen Wasser ausgeschüttelt, bis dieses keine gefärbten Produkte mehr aufnahm. Durch Eindampfen im Vakuum wurden 41 mg Rückstand erhalten, der aus Wasser-Aceton nach 72 Stunden bei 0° 10 mg Drusen lieferte. Die Kristalle wurden aus Wasser-Aceton 2mal umkristallisiert. Die Prüfung auf Co war positiv. Absorptionsspektrum in methanolischer Lösung vgl. Fig. 2 a). Mikrobiologische Aktivität: *Lactobac. Leichmannii* 0,5; *Lactobac. lactis* 0,3. 2,5 mg des kristallisierten Produktes wurden mit der Lösung von 15 mg KCN in 1,5 cm³ Wasser, deren pH mit 0,03 cm³ 50-proz. Essigsäure auf 4 gestellt war, 24 Stunden bei 20° im Dunkeln stehengelassen. Dann wurde die Lösung 4mal mit 1 cm³ einer Mischung von 1 Vol.-Teil Phenol mit 4 Vol.-Teilen Chloroform ausgeschüttelt, wobei die wässrige Lösung farblos wurde. Die gleiche Aufarbeitung der organischen Auszüge wie oben lieferte 3 mg roten Rückstand, der aus Wasser-Aceton 2 mg Nadeln gab, deren Spektrum in methanolischer Lösung mit dem von B_{12} identisch war (vgl. Fig. 2 c)); mikrobiologische Aktivität an *Lactobac. Leichmannii* wurde teils niedriger, teils höher als B_{12} gefunden¹⁾.

Herstellung der Lösung zur Aufnahme des Absorptionsspektrums des „blauen Reduktionsproduktes“ (vgl. Fig. 2 b). 159 γ B_{12} wurden mit 25 mg elektrolitisch abgeschiedenem reinem Zinkstaub in 3 cm³ 10-proz. wässriger NH_4Cl -Lösung 24 Stunden in luftdicht verschlossener Quarzküvette geschüttelt. Als Deckel der Küvette diente eine kleine Gummiplatte (0,8 cm dick), die mit einer Spannfeder fest auf die Küvette aufgesetzt war. Der ganze Verschlussmechanismus war so konstruiert, dass er eben noch Platz im Schlitten des Spektrophotometers fand. Zur Aufnahme des Spektrums wurde die Lösung mit einer genau gleich behandelten Mischung von Zinkstaub mit Ammoniumchlorid ohne B_{12} verglichen. Vor der Messung wurde der Zinkstaub absitzen gelassen. Nach 48 Stunden Schütteln wurde das gleiche Spektrum wie nach 24 Stunden erhalten.

Zusammenfassung.

Es wird über die Reaktion von Vitamin B_{12} mit drei Reduktionsmitteln, $NaHSO_3$, $Na_2S_2O_4$ und Zinkstaub in NH_4Cl -Lösung berichtet. Mit Zn wurde eine blaue Lösung erhalten, bei der das Co-Atom eine niedrigere Valenzstufe besitzen dürfte. Sie wird von Luft sofort zu einem Produkt zurückoxydiert, das dem B_{12a} -Typus entspricht und von HCN wieder in B_{12} zurückverwandelt wird. Die Einwirkung von $NaHSO_3$ und $Na_2S_2O_4$ gibt ebenfalls Derivate, die dem B_{12a} ähnlich sind und von HCN in B_{12} zurückverwandelt werden.

Pharmazeutische Anstalt der Universität Basel.

¹⁾ Da dasselbe Präparat zur Prüfung gelangte, dürfte es sich um Fehler bei der biologischen Bestimmung handeln.