N, O-Acylwanderung bei Cobinamid - Gewinnung von Cobysäure aus Cobamiden

GERHARD MÜLLER und OTTO MÜLLER

Isotopenlaboratorium der Abteilung für Chemie, Geologie und Biologie
der Technischen Hochschule Stuttgart

(Z. Naturforsch. 21 b, 1159—1164 [1966]; eingegangen am 1. August 1966)

Bei der Behandlung von Cobinamid mit Flußsäure/Methanol/Zinkchlorid oder Zinkchlorid/Methanol erfolgt an der Carbonsäureamidgruppe f N,O-Acylwanderung zum Cobysäure- $[\beta$ -aminoisopropylester], der nach Acylierung der Aminogruppe mit Piperidin/Wasser zu Cobysäure hydrolysiert wird. Cobamide werden unter den Bedingungen der Umlagerung zu Cobinamid abgebaut, so daß sie ebenfalls zur Gewinnung des Esters dienen können.

Cobysäure- $[\beta$ -aminoisopropylester] unterliegt in basischem Medium der O,N-Acylwanderung, wobei Cobinamid zurückgebildet wird. Durch Umsetzung mit salpetriger Säure erhält man aus Cobysäure- $[\beta$ -aminoisopropylester] den Cobysäure- $[\beta$ -hydroxyisopropylester]. In wasserfreier Flußsäure wird Cobinamid durch Essigsäureanhydrid, Buttersäureanhydrid und Benzoylchlorid in die entsprechenden O-Acyl-Derivate übergeführt.

- (I), R = -NH₂, R' = -OH
 (II), R = -NH₂, R' = -NH-CH₂-CH(OH)-CH₃
 (III), R = -NH₂, R' = -O-CH(CH₃)-CH₂-NH₂
 (IV), R = -NH₂, R' = -O-CH₃
 (V), R = -NH₂, R' = -O-CH(CH₃)-CH₂-NH-COCH₃
 (VI), R = -NH₂, R' = -O-CH(CH₃)-CH₂-OH
 (VII), R = -NH₂, R' = -NH-CH₂-CH(OH)-CH₃
 (VIII), R = -NH₂, R' = -NH-CH₂-CH(OH)-CH₃
 (IX), R = -NH₂, R' = -NH-CH₂-CH(OH)-CH₃

Aus Cobysäure¹ (I) konnte eine große Anzahl von Vitamin B₁₂-Derivaten gewonnen werden, bei

denen der 1-Amino-propan-2-ol-Anteil des Vitamin B₁₂ durch andere Alkanolamine ersetzt ist. Diese Corrinoiden sind z. T. sehr stark wirksame B₁₂-Antivitaminen²⁻⁵. Ihre therapeutische Testung, die bei Patienten mit bestimmten Leukämie-Formen sehr erwünscht wäre, konnte bisher nicht durchgeführt werden, da die Ausgangssubstanzen für die Synthese – insbesondere Cobysäure – nicht in ausreichendem Umfang zur Verfügung standen.

Cobysäure wurde zum ersten Mal durch BERNHAUER et al.¹ aus Faulschwamm isoliert. BONNET erhielt aus Vitamin B₁₂ durch Hydrolyse mittels konz. wäßriger Salzsäure Cobysäure in einer Ausbeute von ca. 10% neben zahlreichen anderen Abbauprodukten des Vitamins⁶. Ferner wurde Cobysäure in *Clostridium thermoaceticum* aufgefunden^{7,8}. Wir entwickelten kürzlich ein Verfahren zur Umwandlung von Cobinamid (II) in Cobysäure (I)⁹. Der erste Reaktionsschritt ist dabei eine durch Säuren katalysierte N,O-Acylwanderung an der Carbonsäureamidgruppe f. In der vorliegenden Mitteilung berichten wir ausführlich über das neue Verfahren zur Gewinnung von Cobysäure aus Cobinamid und anderen Corrinoiden sowie über die dabei auftretenden Zwischenprodukte.

¹ K. BERNHAUER, H. W. DELLWEG, W. FRIEDRICH, G. GROSS, F. WAGNER u. P. ZELLER, *Helv. chim. Acta* **43**, 693, 696 [1960].

² H. C. HEINRICH u. E. E. GABBE, in: *Vitamin B₁₂ und Intrinsic Factor*, 2. Europ. Symp., Hamburg 1961. Enke-Verlag, Stuttgart 1962.

³ H. C. HEINRICH, W. FRIEDRICH u. P. RIEDEL, *Biochem. Z.* **334**, 284 [1961].

⁴ W. FRIEDRICH, H. C. HEINRICH, E. KÖNIG u. P. SCHULZE, in: *Conference on B₁₂-Coenzymes*. New York Academy of Sciences, New York 1963.

⁵ H. C. HEINRICH u. E. E. GABBE, *Klin. Wschr.* **43**, 196 [1965].

⁶ R. BONNET, J. GODFREY, and D. G. REDMAN, *Chem. Commun.* **1965**, 466.

⁷ L. LJUNGDAHL, E. IRION, and H. G. WOOD, *Biochemistry* **4**, 2771 [1965].

⁸ E. IRION and L. LJUNGDAHL, *Biochemistry* **4**, 2780 [1965].

⁹ G. MÜLLER u. O. MÜLLER, *Angew. Chem.* **78**, 143 [1966].

Die reversible, durch Säuren katalysierte *N,O*-Acylwanderung wurde zuerst von BERGMANN et al.^{10, 11} bei β -Hydroxyaminosäuren untersucht. Die über ein Hydroxyoxazolidin-Derivat verlaufende Umlagerung^{12, 13} wurde später vor allem bei Serin- und Threonin-haltigen Peptiden und Proteinen beobachtet^{14–18}. Die *N,O*-Acylwanderung konnte bei diesen zu spezifischen Peptidspaltungen herangezogen werden, indem der dabei gebildete Ester an der Aminogruppe acetyliert und anschließend in basischem Medium hydrolysiert wurde¹⁹. Eine wesentliche Weiterentwicklung des Verfahrens gelang HESS et al.^{20–22}, welche die meistens verwendete Schwefelsäure durch wasserfreie Flußsäure ersetzten.

Nach Untersuchungen von KANEKO et al. lassen sich bei *N*-Acyl-Derivaten von Threonin die Acylreste nach Cyclisierung zu den *N*-Acyl-oxazolidon-Verbindungen hydrolytisch abspalten^{23–25}. Die Durchführung der entsprechenden Reaktion bei Cobinamid könnte ebenfalls zu Cobysäure führen. Ihre Gewinnung über die *N,O*-Acylwanderung an der Carbonsäureamidgruppe f erschien uns jedoch vorteilhafter.

Gewinnung von Cobysäure

Die Schwierigkeit der Umwandlung von Cobinamid (II) in Cobysäure (I) besteht weniger in der Überführung der Carbonsäureamidgruppe f in eine freie Carboxylgruppe als in der gleichzeitigen Verhinderung leicht eintretender Nebenreaktionen. So kann z. B. bei der Hydrolyse von Cobinamid in saurem oder alkalischem Medium nicht vermieden werden, daß auch an den übrigen Carbonsäureamid-Gruppen Verseifung eintritt⁶. Wasserabspaltende Reagenzien, welche die *N,O*-Acylwanderung an der Carbonsäureamid-Gruppe f sehr begünstigen, bergen z. B. die Gefahr der Nitril-Bildung an den Carbonsäureamid-Gruppen a – e und g in sich.

Zur Gewinnung von Cobysäure nach dem Verfahren der *N,O*-Acylwanderung kann man verschiedene Wege beschreiten. Die besten Ausbeuten werden erzielt, wenn man auf die Isolierung der Zwischenprodukte verzichtet und dabei folgendes

Verfahren anwendet: Cobinamid (II) wird in wasserfreier methylalkoholischer Flußsäure mit Zinkchlorid behandelt. Dabei erfolgt an der Carbonsäureamid-Gruppe f *N,O*-Acylwanderung zum Cobysäure- $[\beta$ -aminoisopropylester] (III), der z. T. durch Umesterung in den Cobysäuremethylester (IV) verwandelt wird:

Umwandlung von Cobinamid in Cobysäureester durch Flußsäure/Methanol/ZnCl₂

Diese *N,O*-Acylwanderung gelingt auch mit anderen Säuren, wie z. B. Schwefelsäure, Phosphorsäure oder Trichloressigsäure. Wasserfreie Flußsäure erwies sich als besonders günstig, da sie sich nach der Umlagerungsreaktion bei niedriger Temperatur vom Corrinoide-Gemisch abdestillieren läßt. Außerdem bietet Flußsäure den Vorteil, ein sehr gutes Lösungsmittel für Corrinoide zu sein und Cobamide rasch zu Cobinamid abzubauen, so daß sie direkt zur Gewinnung des Cobysäureesters herangezogen werden können. Vitamin B₁₂ liefert dabei neben Cobinamid und Phosphorsäure ein Nucleosid, das sich bei chromatographischer, elektrophoretischer und spektrophotometrischer Prüfung als identisch mit Ribazol erwies. Die gute Löslichkeit von Vitamin B₁₂ in Flußsäure wurde bereits sehr früh durch KATZ erkannt²⁶, der dabei eine Abnahme der mikrobiologischen Aktivität des Vitamins feststellte. Durch unsere Untersuchungen wird gezeigt, daß dies auf einen Abbau zu Cobinamid zurückzuführen ist.

¹⁰ M. BERGMANN, E. BRAND u. F. WEINMANN, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **131**, 1 [1923].

¹¹ M. BERGMANN u. A. MIEKELEY, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **140**, 128 [1924].

¹² A. P. PHILLIPS and R. BALTZLY, J. Amer. chem. Soc. **69**, 200 [1947].

¹³ W. E. HANBY, S. G. WALEY, and J. WATSON, J. chem. Soc. [London] **1950**, 3239.

¹⁴ J. A. MOORE, J. R. DICE, E. D. NICOLAIDES, R. D. WESTLAND, and E. L. WITTE, J. Amer. chem. Soc. **76**, 2884 [1954].

¹⁵ H. HOERMANN, W. GRASSMAN, E. WUENSCH u. H. PRELLER, Chem. Ber. **89**, 933 [1956].

¹⁶ E. O. P. THOMPSON, in: Advances in Organic Chemistry, Interscience Publishers, Inc., New York, N. Y., 1960, S. 149.

¹⁷ L. A. COHEN u. B. WITKOP, Angew. Chem. **73**, 253 [1961].

¹⁸ H. ZAHN, Chimia **15**, 378 [1961].

¹⁹ D. F. ELLIOT, Biochem. J. **50**, 542 [1952].

²⁰ S. SAKAKIBARA, K. H. SHIN, and G. P. HESS, J. Amer. chem. Soc. **84**, 4921 [1962].

²¹ J. LENARD and G. P. HESS, J. biol. Chemistry **239**, 3275 [1964].

²² J. LENARD, A. V. SCHALLY, and G. P. HESS, Biochem. biophys. Research Commun. **14**, 498 [1964].

²³ T. KANEKO and T. INUI, Bull. chem. Soc. Japan **36**, 1541 [1963].

²⁴ D. BEN-ISHAÏ, J. Amer. chem. Soc. **78**, 4962 [1956].

²⁵ F. BERGEL and R. WADE, J. chem. Soc. [London] **1959**, 941.

²⁶ J. J. KATZ, Arch. Biochem. Biophysics **51**, 293 [1954].

Bei der Einwirkung von Flußsäure auf optisch aktives 2-Butanol wurde Racematbildung beobachtet²⁷. Es ist daher nicht ausgeschlossen, daß Flußsäure auch am 1-Amino-propan-2-ol-Anteil von Cobinamid eine Racemisierung verursacht. Da sie für die Gewinnung von Cobyrsäure ohne Bedeutung ist, untersuchen wir diese Frage in anderem Zusammenhang.

An Stelle von Flußsäure verwenden wir zur Umlagerung vielfach Methanol/Zinkchlorid. Auch dieses Reagenz baut Cobamide zu Cobinamid ab, so daß z. B. Cyano-Cobalamin direkt zur Darstellung des Cobyrsäure- $[\beta\text{-amino-isopropylester}]$ (III) dienen kann.

Durch Behandeln des Reaktionsgemisches mit Essigsäureanhydrid führt man den Cobyrsäure- $[\beta\text{-amino-isopropylester}]$ in seine Acetylverbindung (V) über und verhindert dadurch eine teilweise Rückbildung von Cobinamid (II), die sonst bei der anschließenden Esterspaltung in basischem Medium eintreten würde. Nach der Hydrolyse des Esters mit Piperidin/Wasser wird nicht umgewandeltes Cobinamid an einer Säule aus DEAE-Cellulose von Cobyrsäure abgetrennt, die man durch Cellulose-Säulenchromatographie weiter reinigt.

Die Abtrennung von Cobinamid kann auch unmittelbar nach der Umlagerung vorgenommen werden. Man verwendet dazu eine mit Acetattuffer von p_H 4,5 vorbehandelte Säule aus CM-Cellulose, an der sich Cobinamid von dem langsamer laufenden Cobyrsäure- $[\beta\text{-amino-isopropylester}]$ trennt. Dabei ist allerdings der durch Umesterung gebildete Cobyrsäuremethylester (IV), der von Piperidin/Wasser ebenfalls zu Cobyrsäure hydrolysiert wird, in der Cobinamid-Fraktion enthalten. Im Falle der Umlagerung mit Methanol/Zinkchlorid handelt es sich um relativ kleine Mengen dieses Esters.

Die chromatographische Reinigung der Cobyrsäure ist erforderlich, da bei der Säurebehandlung violettblau gefärbte Nebenprodukte entstehen, die sich wohl elektrophoretisch wie Cobyrsäure verhalten, jedoch nicht bei der Papierchromatographie. Dies gilt entsprechend auch für die Cobinamid enthaltende Zone und für die Vorstufen der Umwandlung. Die hauptsächlichen Nebenprodukte laufen bei Verwendung der sek. Butanol enthaltenden Fließmittel (s. u.) chromatographisch langsamer als Cobyrsäure bzw. Cobinamid. Sehr wahrscheinlich stehen die Nebenprodukte in enger struktureller Beziehung zum sogenannten Faktor Ia²⁸, dessen Konstitution jedoch noch nicht bekannt ist.

Zum Beweis des Reaktionsablaufes an der Carbonsäureamid-Gruppe f stellten wir mit Hilfe von *Propionibacterium shermanii* unter Zusatz von $[u\text{-}^{14}\text{C}]$ -L-Threonin zum Gärmedium ^{14}C -markiertes Cobinamid her, dessen 1-Amino-propan-2-ol-Anteil aus Threonin stammt²⁹. Dabei wurde nur ein sehr kleiner Teil des zugesetzten Threonins verwertet, wie der geringen spezifischen Aktivität des Cobinamids zu entnehmen ist (s. experimenteller Teil). Da sie für unsere Zwecke ausreichend war, haben wir Versuche zur Steigerung der Einbaurate, z. B. durch Veränderung der Zusammensetzung des Gärmediums, nicht unternommen. Die Umlagerung des Cobinamids zum Cobyrsäure- $[\beta\text{-amino-isopropylester}]$ war von keiner Änderung der spezifischen Aktivität begleitet, während die daraus gewonnene Cobyrsäure nicht mehr radioaktiv war. Ferner wurde die aus Cobinamid gewonnene Cobyrsäure nach der Anhydrid-Methode¹ in Cobinamid zurückverwandelt.

Gewinnung von Cobyrsäure- $[\beta\text{-amino-isopropylester}]$ und Cobyrsäure- $[\beta\text{-hydroxy-isopropylester}]$

Die Reindarstellung des Cobyrsäure- $[\beta\text{-amino-isopropylesters}]$ ist von Interesse, da er vielleicht ein Zwischenprodukt der Biosynthese von Cobinamid aus Cobyrsäure und Threonin vorstellt. Entsprechende enzymchemische Untersuchungen zur Klärung dieser Frage sind im Gange.

Zur Reindarstellung von Cobyrsäure- $[\beta\text{-amino-isopropylester}]$ trennt man nicht umgewandeltes Cobinamid unmittelbar nach der Umlagerungsreaktion an einer CM-Cellulose-Säule ab (s. o.). Das so gewonnene Rohprodukt wird durch Cellulose-Säulenchromatographie, kleine Mengen besser durch Chromatographie auf Papier, unter Verwendung säurehaltiger Fließmittel gereinigt. Die Verbindung wandelt sich leicht — insbesondere in basischem Medium — in Cobinamid um. In 0,05-m. Na_2HPO_4 als Reaktionsmedium waren nach 1 Stde. bei 0 °C 74% des Cobyrsäure- $[\beta\text{-amino-isopropylesters}]$ in Cobinamid übergeführt. Saures Medium und tiefe Temperaturen verzögern diese Rückbildung. Bei schonender Einwirkung von salpetriger Säure auf Cobyrsäure- $[\beta\text{-amino-isopropylester}]$ (III) entsteht Cobyrsäure- $[\beta\text{-hydroxy-isopropylester}]$ (VI), der durch

²⁷ R. L. BURWELL, J. Amer. chem. Soc. **64**, 1025 [1942].

²⁸ W. FRIEDRICH u. K. BERNHAUER, Z. Naturforsch. **9b**, 685 [1954].

²⁹ A. I. KRASMA, C. ROSENBLUM, and D. B. SPRINSON, J. biol. Chemistry **225**, 745 [1957].

Piperidin/Wasser ebenfalls zu Cobysäure hydrolysiert wird.

Die Umlagerungsreaktion ermöglicht eine rasche Entscheidung, ob bei Corrinoide-carbonsäuren die in Stellung f befindliche Carboxylgruppe mit 1-Aminopropan-2-ol amidiert ist. Dies ist für das Studium des Mechanismus der Biosynthese von Cobinamid aus Cobyrynsäure von Bedeutung. Nucleotidfreie Corrinoide-carbonsäuren verhalten sich in der Cyano-Form bei p_H 2,7 elektrophoretisch wie Cobinamid, während die entsprechenden, durch *N,O*-Acylwanderung an der Carbonsäureamidgruppe f entstehenden β -Amino-isopropylester nahezu doppelt so schnell zur Kathode wandern (s. u.).

Acylierung von Cobinamid in wasserfreier Flußsäure

Zu Beginn unserer Untersuchungen zur Umwandlung von Cobinamid in Cobysäure setzten wir der wasserfreien Flußsäure kein Methanol zu. Die *N,O*-Acylwanderung verlief dabei mit geringeren Ausbeuten, wir konnten aber die Acetylierung des Cobysäure- $[\beta$ -amino-isopropylesters] bereits in Flußsäure durchführen. Bei dieser Umsetzung mit Essigsäureanhydrid wird gleichzeitig nicht umgewandeltes Cobinamid an der OH-Gruppe seines 1-Amino-propan-2-ol-Anteiles acetyliert.

Wasserfreie Flußsäure eignet sich infolge ihrer sehr guten Lösungsmiteileigenschaften ausgezeichnet zur Gewinnung von Acyl-Derivaten des Cobinamids. Bei den Umsetzungen mit Buttersäureanhydrid und Benzoylchlorid, die nach wenigen Min. beendet sind, erhielten wir die entsprechenden Butyryl- (VIII) bzw. Benzoyl-Derivate (IX). Die Reaktionen verlaufen praktisch quantitativ. Nebenprodukte, wie sie bei der Durchführung der *N,O*-Acylwanderung infolge lang dauernder Säureeinwirkung entstehen (s. o.), werden nicht gebildet. Die genannten Acyl-Verbindungen des Cobinamids werden durch Piperidin/Wasser zu Cobinamid hydrolysiert.

Elektrophoretisches und papierchromatographisches Verhalten

Cobysäure- $[\beta$ -amino-isopropylester] (III) wandert bei der Elektrophorese in saurem Medium (p_H 2,7 mit 0,01-proz. Blausäure) annähernd doppelt so schnell zur Kathode wie Cobinamid (II). Dies er-

klärt sich aus dem Vorliegen folgender Formen:

Im neutralen Gebiet (p_H 6,5, Phosphatpuffer, mit Cyanid) verhält sich Cobinamid infolge Ausbildung der Dicyano-Form elektrophoretisch neutral, während Cobysäure- $[\beta$ -amino-isopropylester] (III) in der Dicyano-Form infolge teilweiser Protonierung der Aminogruppe langsam zur Kathode wandert. Bei höheren p_H -Werten wandelt sich der Ester in Cobinamid um.

Cobysäure- $[\beta$ -acetylamino-isopropylester] (V), Cobysäure- $[\beta$ -hydroxy-isopropylester] (VI) sowie die Acyl-Derivate des Cobinamids verhalten sich in neutralem und saurem Medium elektrophoretisch wie Cobinamid.

Corrinoide (jeweils Monocyano-Form)	Fließmittel		
	a	b	c
Cobysäure- $[\beta$ -amino-isopropylester]	0,71	0,87	—
Cobysäure- $[\beta$ -acetylamino-isopropylester]	1,03	1,02	—
Cobysäure- $[\beta$ -hydroxy-isopropylester]	1,16	1,08	—
Cobysäure ¹	0,53	0,97	0,65
<i>O</i> -Acetyl-cobinamid	1,18	1,18	1,20
<i>O</i> -Butyryl-cobinamid	1,46	1,39	1,37
<i>O</i> -Benzoyl-cobinamid	1,41	1,34	1,43

Tab. 1. $R_{\text{Cyano-Cobinamid}}$ -Werte der Corrinoide.

Aufsteigende Chromatographie bei 21 °C mit ausgewaschenem Schl. & Sch.-Papier 2043 a. Entwicklungssysteme: a = Wasserges. sek. Butanol mit 0,01% HCN; b = 10 Tle. wasserges. sek. Butanol, 1 Tl. Eisessig, 0,1 Tl. 10-proz. HCN-Lösung; c = 100 Tle. sek. Butanol, 36 Tle. Wasser, 14 Tle. 25-proz. NH_3 -Lösung, 0,05 Tle. 10-proz. HCN-Lösung.

Experimenteller Teil

Dicyano-cobyrinsäure-abcdeg-hexamid-f-[β-aminoisopropylester] (Cobyrinsäure-[β-aminoisopropylester])

Verfahren I. In einer Mischung aus 15 ml wasserfreier Flußsäure und 5 ml absolutem Methanol löst man bei 0 bis 5 °C 200 mg Cyano-cobalamin (24 Stdn. bei 80 °C über P₂O₅ i. Vak. getrocknet), fügt ca. 200 mg wasserfreies Zinkchlorid hinzu und läßt das Reaktionsgemisch 3 Tage bei 20 bis 25 °C stehen. Das Lösungsmittel wird i. Vak. abdestilliert, der Rückstand in 200 ml 0,1-proz. wäßriger Blausäure-Lösung aufgenommen und sofort der Phenolextraktion unterworfen. Das so erhaltene Rohprodukt wird i. Vak. zur Trockene eingedampft, in wenig 0,2-n. Acetatpuffer (Essigsäure/NaOH mit 0,1% HCN) von p_H 4,5³⁰ aufgenommen und auf eine Säule (180·15 mm) aus CM-Cellulose (CM-Sephadex C-25) gegeben, deren Na-Form so lange mit dem gleichen Puffer gewaschen wurde, bis der Durchlauf p_H 4,5 anzeigte. Beim Waschen mit dem Acetatpuffer trennt sich Cobyrinsäure-[β-aminoisopropylester] vom schneller laufenden Cobinamid ab. Man reinigt durch Phenolextraktion und chromatographiert absteigend auf Chromatographiepapier (Whatman 3 MM) mit einer Mischung aus 100 Tln. wasserges. sek. Butanol, 1 Tl. Eisessig und 0,1 Tl. 10-proz. HCN-Lösung. Die Hauptzone enthält Cobyrinsäure-[β-aminoisopropylester], der nach einer weiteren Phenolextraktion in reiner Form erhalten wird. Ausbeute: 28 Prozent.

Verfahren II. In 20 ml absolutem Methanol löst man nacheinander unter Rühren und Erwärmen auf 50 bis 60 °C 200 mg Cyano-Cobalamin (24 Stdn. bei 80 °C über P₂O₅ i. Vak. getrocknet) sowie 20 g wasserfreies Zinkchlorid und erhitzt die Reaktionsmischung unter Ausschluß von Luftfeuchtigkeit 1 Stde. bei einer Ölbadtemperatur von 170 °C am Rückfluß. Die erkaltete Lösung wird mit 0,1-proz. Blausäure auf 100 ml verdünnt und sofort der Phenolextraktion unterworfen. Dabei verbleiben ca. 20% der Corrinoiden, die sich nur schwer in der wäßrigen Phase zurückführen lassen (dies gelingt z. B. durch Zugabe von Diisopropyläther), im Phenol-haltigen Lösungsmittel. Diese Nebenprodukte werden verworfen. Das so erhaltene Rohprodukt wird, wie bei Verfahren I beschrieben, an einer Säule aus CM-Cellulose (CM-Sephadex C-25) aufgetrennt und weiter durch Chromatographie gereinigt (s. o.). Ausbeute: 20 Prozent.

Dicyano-cobyrinsäure-abcdeg-hexamid (Cobyrinsäure)

Verfahren I. Das durch Einwirkung von Flußsäure/CH₃OH/ZnCl₂ auf Cyano-Cobalamin und anschließende Reinigung durch Phenolextraktion erhaltene Rohprodukt (s. o. Verfahren I zur Darstellung von Cobyrinsäure-[β-aminoisopropylester]) wird in 100 ml Wasser aufgenommen und bei 0 bis -2 °C unter Schütteln durch Zutropfen von 5 ml Essigsäureanhydrid acetyliert. Nach 1 Stde. wäscht man zweimal mit je

10 ml Chloroform und reinigt durch Phenolextraktion. Das i. Vak. eingedampfte Corrinoid-Gewisch wird in 30 ml 1-m. Piperidin-Lösung von 0 bis -2 °C aufgenommen und bei dieser Temperatur 2 Stdn. stehengelassen. Man wäscht dreimal mit je 30 ml Isopropyläther/n-Butanol (2 : 1) und stellt mit verdünnter Salzsäure auf p_H 5,5 ein. Das durch Phenolextraktion gereinigte Rohprodukt wird i. Vak. zur Trockene eingedampft und in ca. 5 ml Tris(hydroxymethyl)-amino-methan/HCl-Puffer p_H 7,8³⁰, der mit 0,1% HCN versetzt wurde, aufgenommen und auf eine Säule (180·15 mm) aus DEAE-Cellulose (DEAE-Sephadex A-25) gegeben, deren Chlorid-Form so lange mit dem gleichen Puffer gewaschen wurde, bis der Durchlauf p_H 7,8 anzeigte. Beim Waschen mit dem Puffer trennt sich Cobinamid von der langsamer laufenden Cobyrinsäure ab. Nach einer weiteren Phenolextraktion chromatographiert man an einer Säule aus Cellulosepulver¹, wobei sich die Hauptzone aus Cobyrinsäure von kleinen Mengen an Nebenprodukten trennt. Sie wird durch Phenolextraktion in reiner Form erhalten. Ausbeute: 20 Prozent.

Verfahren II. Das durch Einwirkung von Zinkchlorid/Methanol auf Cyano-Cobalamin und anschließende Reinigung durch Phenolextraktion erhaltene Rohprodukt (s. o. Verfahren II zur Darstellung von Cobyrinsäure-[β-aminoisopropylester]) wird in wenig 0,2-n. Acetatpuffer (Essigsäure/NaOH mit 0,1% HCN) von p_H 4,5³⁰ gelöst und auf eine Säule (180·15 mm) aus CM-Cellulose (CM-Sephadex C-25) gegeben, deren Na-Form so lange mit dem gleichen Puffer gewaschen wurde, bis der Durchlauf p_H 4,5 anzeigte. Beim Waschen mit dem Acetatpuffer trennt sich Cobinamid vom langsamer laufenden Cobyrinsäure-[β-aminoisopropylester] ab. Letzterer wird sofort bei 0 bis -2 °C unter Schütteln durch Zutropfen von 5 ml Essigsäureanhydrid acetyliert. Nach 1 Stde. wäscht man zweimal mit je 10 ml Chloroform und reinigt durch Phenolextraktion. Der Cobyrinsäure-[β-acetylamino-isopropylester] wird in 30 ml 1-m. Piperidin-Lösung von 0 bis -2 °C gelöst und bei dieser Temperatur 2 Stdn. stehengelassen. Man wäscht dreimal mit je 30 ml Isopropyläther/n-Butanol (2 : 1) und stellt mit verdünnter Salzsäure auf p_H 5,5 ein. Das durch Phenolextraktion gereinigte Rohprodukt wird durch Cellulosesäulenchromatographie gereinigt¹, wobei sich die Cobyrinsäure enthaltende Hauptzone von kleinen Mengen an Nebenprodukten trennt. Man erhält sie nach einer weiteren Phenolextraktion in reiner Form. Ausbeute: 11 Prozent.

Umwandlung von Cobyrinsäure-[β-aminoisopropylester] in Cobinamid

Eine Lösung von 10 mg Cyano-cobyrinsäure-[β-aminoisopropylester] in 10 ml 0,05-m. Na₂HPO₄-Lösung wird 1 Stde. bei 0 °C stehengelassen. Man neutralisiert mit verd. Salzsäure und chromatographiert das durch Phenolextraktion gereinigte Produkt auf Chromatographiepapier (Whatman 3 MM) mit einer Mischung aus 100 Tln. wasserges. sek. Butanol, 1 Tl. Eisessig und 0,1 Tl. 10-proz. HCN-Lösung. Dabei trennt sich Cobin-

³⁰ Biochemisches Taschenbuch, Springer-Verlag, 2. Auflage, 1964, 2. Teil, S. 95 bzw. S. 99.

amid vom langsamer wandernden Cobyrinsäure- $[\beta$ -aminoisopropylester]. Sie werden nach Elution mit Wasser und Überführung in ihre Dicyano-Form (molarer Extinktionskoeffizient beim Absorptions-Maximum $367\text{ m}\mu$: $30,6 \cdot 10^3$) spektrophotometrisch bestimmt. Ausbeute: 74 Prozent.

Desaminierung von Cobyrinsäure- $[\beta$ -aminoisopropylester] zu Cobyrinsäure- $[\beta$ -hydroxy-isopropylester]

Eine Lösung von 20 mg Cobyrinsäure- $[\beta$ -aminoisopropylester] in 10 ml Wasser wird mit verd. Salzsäure auf pH 3 eingestellt und bei 0 bis 2°C während ca. 20 Min. mit einer Lösung von 200 mg NaNO_2 in 5 ml Wasser versetzt. Dabei wird durch Zusatz von wenig verd. Salzsäure der pH -Wert 3 aufrecht erhalten. Man läßt die Reaktionsmischung 12 Stdn. bei 0°C stehen, reinigt durch Phenolextraktion und chromatographiert absteigend auf Chromatographiepapier (Whatman 3 MM) mit einer Mischung aus 100 Tln. wasserges. sek. Butanol, 1 Tl. Eisessig und 0,1 Tl. 10-proz. HCN-Lösung. Die Hauptzone enthält Cobyrinsäure- $[\beta$ -hydroxy-isopropylester], der nach Elution mit Wasser durch Phenolextraktion in reiner Form erhalten wird. Ausbeute: 75 Prozent.

Dicyano-cobyrinsäure-abcdeg-hexamid-f-[2-hydroxypropyl]-amid-essigsäureester (O-Acetyl-cobinamid)

100 mg Cyano-Cobalamin (24 Stdn. bei 80°C über P_2O_5 i. Vak. getrocknet) löst man bei 0 bis -2°C in 5 ml wasserfreier Flußsäure von 0 bis -2°C und versetzt tropfenweise mit 0,3 ml Essigsäureanhydrid. Nach 15 Min. destilliert man das Lösungsmittel i. Vak. ab und unterwirft den Rückstand der Phenolextraktion. Das so gewonnene Rohprodukt wird durch Cellulose-Säulenchromatographie unter Verwendung von wassergesättigtem sek. Butanol + 0,01% HCN als Fließmittel gereinigt. Dabei trennt sich die Hauptzone des O-Acetyl-cobinamids von kleinen Mengen an Nebenprodukten ab. Nach einer weiteren Phenolextraktion wird das Produkt in reiner Form erhalten. Ausbeute: 91 Prozent.

Dicyano-cobyrinsäure-abcdeg-hexamid-f-[2-hydroxypropyl]-amid-buttersäureester (O-Butyryl-cobinamid) und Dicyano-cobyrinsäure-abcdeg-hexamid-f-[2-hydroxypropyl]-amid-benzoesäureester (O-Benzoyl-cobinamid)

Man verfährt wie beim O-Acetyl-cobinamid (s. o.) beschrieben, ersetzt aber Essigsäureanhydrid durch Buttersäureanhydrid bzw. Benzoylchlorid.

Umwandlung von O-Acetyl-cobinamid in Cobinamid

(Die Vorschrift gilt auch für die Hydrolyse von O-Butyryl- und O-Benzoyl-cobinamid zu Cobinamid.)

10 mg O-Acetyl-cobinamid werden in 10 ml 1-m. wäßriger Piperdin-Lösung von 0 bis -2°C gelöst und bei dieser Temperatur 2 Stdn. stehengelassen. Man wäscht dreimal mit je 4 ml Isopropyläther/n-Butanol (2 : 1) und stellt den pH -Wert mit verdünnter Salzsäure auf 5,5 ein. Das durch Phenolextraktion gereinigte Rohprodukt wird auf Chromatographiepapier (Whatman 3 MM) mit wassergesättigtem sek. Butanol + 0,01% HCN chromatographiert. Die Hauptzone enthält Cyano-cobinamid, das nach einer weiteren Phenolextraktion in reiner Form erhalten wird. Ausbeute: 82 Prozent.

^{14}C -Markierung von Cobinamid an der Carbonsäureamidgruppe f

Die gärungschemische Synthese von Cobinamid mit Hilfe von *Propionibacterium shermanii* wird in zwei 2-l. Ansätzen unter bereits beschriebenen Bedingungen³¹ durchgeführt. Unmittelbar nach dem Animpfen des Gärmediums werden je $25\text{ }\mu\text{C}$ [^{14}C]-L-Threonin (spezifische Aktivität $5,7\text{ mC/mM}$), gelöst in 70-proz. Alkohol, zugegeben. Die durch Zentrifugieren gewonnene Bakterienmasse (feucht, je Gäransatz ca. 125 g) wird in 1 l Wasser suspendiert und mit 2,5 ml einer 5-proz. KCN-Lösung versetzt. Den pH -Wert der Lösung stellt man mit verd. HCl auf 6 bis 6,5 ein und erhitzt im Autoklaven 10 Min. auf 110°C . Nach dem Abkühlen wird zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit von der Bakterienmasse abgegossen. Man wiederholt die Extraktion in der beschriebenen Weise, bis die Flüssigkeit nur noch schwach rot gefärbt ist. Aus dem so gewonnenen Rohprodukt werden die Corrinoiden (Cobinamid + wenig Cyano-Cobalamin) in reiner Form gewonnen. Man trennt Cyano-Cobalamin an einer Säule (120 · 25 mm) aus Carboxymethyl-cellulose ab, eluiert Cyano-cobinamid mit 0,2-n. Natriumacetat-Lösung und reinigt es durch Phenolextraktion. Ausbeute: 74 mg Cyano-Cobinamid (spezif. Aktivität: $0,35\text{ }\mu\text{C/mMol}$).

Herrn Professor Dr. BREDERECK danken wir für freundliche Unterstützung aus Institutsmitteln. Dem Verband der Chemischen Industrie und der Deutschen Forschungsgemeinschaft sind wir für Personal- und Sachbeihilfen zu Dank verpflichtet. Für die Überlassung von Flußsäure haben wir der Firma Saline Ludwigshalle AG., Bad Wimpfen, zu danken. Ferner danken wir Fräulein GISELA SCHULZE, Herrn stud.chem. WALTER DIETERLE und Herrn HELLMUT ROBISCH für fleißige und gewissenhafte Mitarbeit.

³¹ K. BERNHAUER, E. BECHER u. G. WILHARM, Arch. Biochem. 83, 248 [1959].