

Berichtigung

In der Arbeit von *K. Schmeiser und D. Jerchel*: „Quantitativer Nachweis von Schwefel, Chlor und Brom enthaltenden Verbindungen auf Papierchromatogrammen mit Hilfe induzierter Radioaktivität“, diese Zeitschrift 65, 366 [1953], ist auf Seite 367 in Bild 2 statt ^{82}Br ^{80}Br und statt ^{34}Cl ^{38}Cl einzusetzen. *K. Schmeiser und D. Jerchel*.

Berichtigung

In der Arbeit von *R. Riemschneider und P. Geschke*: „Konfiguration von Cyclohexan-Substitutionsprodukten ...“, diese Ztschr. 65, 390 [1953], muß es S. 392, Tab. 2, lfd. Nr. 47 1.1.2.3.4.6 statt 1,1,2,3,5,5 heißen.

R. Riemschneider.

Zuschriften

Über einen neuen Vitamin B_{12} -Faktor

Von Dr. W. FRIEDRICH und Prof. Dr. K. BERNHAUER

Aus dem Biochemischen Laboratorium der Aschaffenburger Zellstoffwerke A.-G., Stockstadt/Main

Nach neueren Untersuchungen existieren — abgesehen von den durch Austausch der Cyan-Gruppe erhältlichen Vitamin B_{12} -Formen¹) — ψ -Vitamin B_{12} ²), Vitamin B_{12} ³), B_{12m} ⁴) und die B_{12} -Faktoren A, B und C⁵). Diese Produkte wurden überwiegend in Fäzes nachgewiesen. In handelsüblichen Vitamin B_{12} -Präparaten und Fermentationsbrühen von *Strept. griseus* scheinen weitere B_{12} -Faktoren vorzukommen⁶). Ferner wurde in Meeres-Algen auch ein Vitamin B_{12s} gefunden⁷). Im Faulschlamm städtischer Kläranlagen wurden neben Cyanocobalamin mehrere Vitamin B_{12} -Faktoren nachgewiesen⁸).

ψ - B_{12} , B_{12f} , B_{12m} und Faktor A konnten bisher kristallisiert gewonnen werden. Bei diesen Kristallsaten handelt es sich aber offenbar nur um zwei verschiedene Individuen, wobei B_{12m} und

Faktor A identisch sind, ψ - B_{12} noch etwas Faktor A enthält und B_{12f} eine Mischung von ψ - B_{12} und Faktor A sein dürfte.

Aus über 140 m³ Faulschlamm verschiedener Herkunft (Kläranlagen) isolierten wir kristallisiertes Vitamin B_{12} , ψ -Vitamin B_{12} und einen neuen, bisher noch nicht beschriebenen Faktor der Vitamin B_{12} -Gruppe sowie mindestens 2 weitere noch nicht kristallisierte B_{12} -Komponenten. In Tabelle 1 wird eine Übersicht einiger, für die Unterscheidung wesentlichen Eigenschaften der hierbei isolierten Vitamin B_{12} -Faktoren I bis V geben, im unmittelbaren Vergleich mit Vitamin B_{12} , ψ -Vitamin B_{12} und Faktor B.

Die Wirkstoffe wurden durch Adsorptions- bzw. Verteilungskromatographie getrennt, wobei sie die Säule in der Reihenfolge I bis V verließen.

Die Verteilungskoeffizienten für n-Butanol/wäßrige Ammonsulfat-Lösung und Wasser/p-Chlorphenol-Lösung in Trichloräthylen sind ein sehr feines Unterscheidungsmerkmal. Änderungen des Gehaltes an Ammonsulfat bzw. p-Chlorphenol verschieben die Verteilungskoeffizienten charakteristisch.

B ₁₂ -Faktor	Zustand	Wäßr. Lsg., pH 7		R _f -Werte ^{a)}	Verteilungskoeffizient ^{b)} bei pH etwa 7								
		mit CN-Überschuß	ohne CN-Zusatz		n-Butanol/wäßr. Ammonsulfat-Lsg.				Wasser/p-Chlorphenol-Lsg. in Trichloräthylen. Konz. an p-Chlorphenol ^{d)} , bei der der Verteilungskoeff. ca. 1 ist.				
					CN-Überschuß		ohne CN-		% Ammonsulfat ^{c)}		CN-Überschuß		
					16,0	19,0	23,5	34,0	38,0	40,0	43,0	CN-Überschuß	ohne CN-Zusatz
I	amorph	violett	orange	0,25	ca.	1,0	ca.	2,6	ca.	1,0	ca.	7,8	8,4
Faktor B ^{e)}	amorph	violett	orange	0,26	ca.	1,0	ca.	1,05	6,0	ca.	1,0	8,2	8,7
II	kryst.	rot	rot	0,19	0,31	ca.	1,05	6,0	ca.	1,0	ca.	8,2	8,2
Vitamin B_{12} ^{f)}	kryst.	rot	rot	0,19	0,31	ca.	1,05	5,9	ca.	1,0	ca.	8,2	8,2
III	kryst.	rot	rot	0,13	0,25	1,04	1,78	ca.	ca.	ca.	ca.	14,0	14,0
IV	kryst.	rot	rot	0,08	ca.	ca.	ca.	ca.	ca.	ca.	ca.	ca.	ca.
ψ -Vit. B_{12} ^{g)}	kryst.	rot	rot	0,08	ca.	ca.	ca.	ca.	ca.	ca.	ca.	ca.	ca.
V	amorph	violett	orange	0,07	ca.	ca.	ca.	ca.	ca.	ca.	ca.	20,5	17

Tabelle 1. Einige Eigenschaften der Vitamin B_{12} -Faktoren I bis V im Vergleich mit bereits bekannten Faktoren

a) Mittels Whatman I-Papier und wassergesättigtem sek. Butanol unter Zusatz von CN-, aufsteigend, ermittelt.

b) Verteilungskoeffizient $K = \frac{\text{Konz. B}_{12}\text{-Faktor obere Phase}}{\text{Konz. B}_{12}\text{-Faktor untere Phase}}$.

c) g Ammonsulfat auf 100 cm³ Wasser.

d) g p-Chlorphenol in 100 cm³ Lösung.

e) Von Dr. E. Lester Smith freundlicherweise überlassen.

f) Handelsprodukt.

g) Einige γ in alkohol. Lösung von Dr. J. J. Pfiffner freundlicherweise überlassen.

¹) E. A. Kaczka, D. E. Wolf, F. A. Kuehl jr. u. K. Folkers, J. Amer. Chem. Soc. 73, 3569 [1951]; G. Cooley, B. Ellis, V. Petrow, G. H. Beaven, E. R. Holiday u. E. A. Johnson, J. Pharm. Pharmacol. 3, 271 [1951].

²) J. J. Pfiffner, D. G. Calkins, R. C. Peterson, O. D. Bird, V. McGlohon u. R. W. Stipeles, Abstr. Amer. chem. Soc. 120th meeting, New York, 22C [1951]; J. J. Pfiffner, H. W. Dion u. D. G. Calkins, Fedor, Proc. 11, 269 [1952]; H. W. Dion, D. G. Calkins u. J. J. Pfiffner, J. Amer. chem. Soc. 74, 1108 [1952].

³) U. J. Lewis, D. V. Tappan u. C. A. Elvehjem, J. biol. Chemistry 194, 539 [1952]; 199, 517 [1952].

⁴) H. G. Wijmenga, Onderzoeken over vitamine B_{12} en verwante factoren, Dissert. Utrecht [1951]; H. G. Wijmenga u. W. L. C. Veer, Chem. Weekblad 48, 33 [1952].

⁵) J. E. Ford, S. K. Kon u. J. W. G. Porter, Biochem. J. 50, Proc. IX [1951]; J. E. Ford u. J. W. G. Porter, ebenda 51, V [1952]; M. E. Coates, J. E. Ford, G. F. Harrison, S. K. Kon u. J. W. G. Porter, ebenda 51, VI [1952]; J. E. Ford, S. K. Kon u. J. W. G. Porter, ebenda 52, VII [1952]; E. S. Holdsworth, Nature [London] 171, 148 [1953]; J. E. Ford, E. S. Holdsworth, S. K. Kon u. J. W. G. Porter, ebenda 171, 150 [1953]; J. E. Ford, ebenda 171, 149 [1953]; Brit. J. Nutrit. 6, 324 [1952].

⁶) L. E. Ericson, Z. G. Bánhid u. G. Gasparotto, Acta Chem. Scand. 6, 1130 [1952]; L. E. Ericson, ebenda 7, 703 [1953].

⁷) L. E. Ericson u. L. Lewis, Arkiv Kemi 6, 427 [1953].

⁸) A. G. M. Sjöström, H. Y. Neujuhr u. H. Lundin, Acta Chem. Scand. 7, 1036 [1953].

Faktor I und Faktor B sind (Tab. 1) höchstwahrscheinlich identisch: Gegenüber der *E. coli*-Mutante 113-3 gleich aktiv und gegenüber L. Leichmannii 313 übereinstimmend fast inaktiv (im Röhrchentest). Die Absorptionsspektren (Beckman, Modell DU) stimmen befriedigend überein.

Faktor II ist nach Tab. 1 und auch im mikrobiologischen Test mit Cyanocobalamin identisch; gleiche Absorptionsspektren.

Faktor III, gleiche mikrobiologische Aktivität gegenüber den genannten Testorganismen wie Cyanocobalamin, unterscheidet sich aber von allen B_{12} -Faktoren sehr scharf durch R_f-Werte und Verteilungskoeffizienten (Tab. 1⁹). Sein Absorptionsspektrum ist dem des Cyanocobalamins sehr ähnlich, aber die sehr schmale Bande bei 278 m μ ist nur schwach angedeutet, während eine kräftige breite Bande bei 295 m μ auftritt (Bild 1). Eine solche Bande wurde noch bei keinem der bisher beschriebenen B_{12} -Faktoren

⁹) Dr. E. Lester Smith, Glaxo Laboratories, England, hatte die Freundlichkeit, einige mg des krist. Faktors III zu untersuchen und stellte elektrophoretisch sowie papierchromatographisch fest, daß es sich um eine einheitliche, von allen bereits bekannten B_{12} -Faktoren verschiedene Substanz handelt. Er teilte ferner mit, daß diese Substanz seinem in sehr geringer Menge aus Schweinefäzes isolierten Faktor E sehr ähnlich ist.

beobachtet. Gibt man z. B. 2 Tropfen 5proz. NaCN-Lösung zu 7 cm³ verd. wäßrigen Lösung des Faktors III, wobei der p_H-Wert von etwa 6,0 auf etwa 10,3 ansteigt, so verändert sich in wenigen Minuten die Farbe von rot in violett, wohl unter Bildung des Di-cyan-Komplexes. Hingegen wird beim Durchlüften bei p_H 4,0

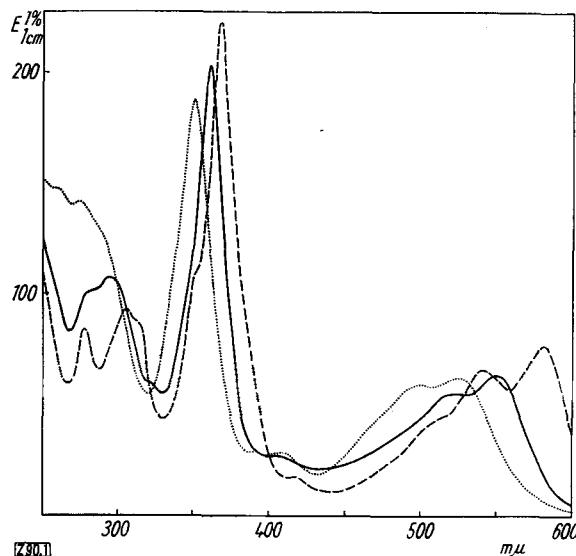


Bild 1

Absorptionsspektrum des Faktors III in Wasser. —— Monocyan-komplex bei p_H 6,0, Max. bei 295, 361, 518, 550 mμ; - - - Di-cyankomplex, bei p_H 10,3, Max. bei 278, 305, 368, 540, 580 mμ; Aquokomplex, bei p_H 4,0, Max. bei 351, 500, 526 mμ.

unter gleichzeitiger intensiver Belichtung (analog der für Cyanocobalamin üblichen Methode¹⁰) Blausäure abgespalten, und die Farbe geht von rot in orangerot über, wobei wohl die Aquoform entsteht (Absorptionsspektren siehe Bild 1). Bei der vorläufigen klinischen Prüfung zeigte die Substanz volle antiperniciöse Wirkung.

Faktor IV entspricht papierchromatographisch ψ -Vitamin B₁₂.

Faktor V besitzt nur geringe Aktivität gegenüber der Coli-Mutante.

Außer den Faktoren der Tab. 1 fanden wir einige weitere Vitamin B₁₂-artige Substanzen, die dem Faktor V sehr ähnlich sind und sich von ihm nur durch ihre R_F-Werte geringfügig unterscheiden.

Vorkommen der Vitamin B₁₂-Faktoren. Die B₁₂-Faktoren I, II, III und V konnten aus allen untersuchten Faulschlämmen, Faktor IV nicht aus allen isoliert werden. II, III und IV wurden stets kristallisiert gewonnen und ihre Identität durch Verteilungskoeffizienten sowie R_F- und R-Werte sichergestellt. Bei einer großen Anzahl von Faulschlämmen wurden einige Typen ermittelt, für die das Überwiegen eines bestimmten Vitamin B₁₂-Faktors charakteristisch ist. Wir fanden vier Faulschlamm-Typen, in denen entweder der Faktor III¹¹) oder der Faktor II¹²) oder die Faktoren II + III in etwa gleichem Mengenverhältnis oder schließlich die Faktoren I + V überwiegen. Die mikrobiologische Gesamtaktivität der untersuchten Faulschlämme (ermittelt mittels der Coli-Mutante 113-3 im Röhrchentest) bewegte sich zwischen 0,2 und 0,6 mg/l¹³). Die beobachteten qualitativen und quantitativen Unterschiede der verschiedenen Faulschlämme im Gehalt an den einzelnen B₁₂-Faktoren hängen kaum mit der Ausfaulungstemperatur zusammen (vergleichende Prüfung von Proben aus dem Emscher Brunnen und beheizten Faulturm der gleichen Kläranlage), wohl aber mit der Zusammensetzung der in die Faulräume gelangenden Schlämme (aus städtischen oder industriellen Abwässern) und damit der jeweiligen Bakterienflora, sowie mit dem Ausfaulungsgrad, da die einzelnen Vitamin B₁₂-

¹⁰) G. E. Boxer u. J. C. Rickards, Arch. Biochem. 30, 392 [1951].

¹¹) Aus je 10 m³ Faulschlamm wurden 1-1,3 g kristallisiertes Produkt erhalten.

¹²) Aus je 10 m³ Faulschlamm wurden 0,4-0,6 g kristallisiertes Produkt gewonnen.

¹³) Die in schwedischen Faulschlämmen gefundenen¹⁴) auffallend hohen Werte (1,2-2,4 mg/l) sind wahrscheinlich dadurch zu erklären, daß der Gehalt mittels des Coli-Plattentestes ermittelt wurde, der aber bei den Faktoren A, B und C weitaus höhere Werte liefert als der Röhrchentest bei Benützung von Vitamin B₁₂ als Bezugsquelle (vgl. vorletzte Literaturstelle⁵).

Faktoren während des Ausfaulungsprozesses mannigfache mikrobielle Umwandlungen durch Auf- und Abbau erleiden.

Einzelheiten werden später mitgeteilt werden.

Für die freundliche Überlassung der *E. coli*-Mutante 113-3 und des *L. Leichmannii* 313 haben wir Dr. B. D. Davis, USA, bzw. Dr. A. Wacker, Tübingen, zu danken, für klinische Prüfungen Doz. Dr. P. Petrides, Düsseldorf. Für die mikrobiologischen Teste danken wir Frl. Dipl.-Chem. Lisa Becher, für die Verarbeitung des Faulschlammes vor allem Dr. V. Dittrich und für die Weiterverarbeitung der Konzentrate im großen Maßstab S. Spaude.

Dem Vorstand der Aschaffenburger Zellstoffwerke A.-G., vor allem Freiherrn M. von Varnbüler und Dr. H. Niethammer sind wir für die großzügige Bewilligung von Mitteln sehr verbunden, Dir. Dr. R. Schepp für sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeiten.

Eingeg. am 19. Oktober 1953 [Z 90]

Versammlungsberichte

Chemische Gesellschaft zu Heidelberg

am 26. Oktober 1953

K. KRAZTL, Wien: Zur Konstitution der Ligninsulfosäure.

Da sich Ligninsulfosäure von Phenylpropan-Verbindungen ableitet, wurden mit Wacek zahlreiche Phenylpropan-sulfosäuren als Modellsubstanzen hergestellt. Die Verwendung der Benzylthiuroniumsalze hat sich zur Identifizierung und zur präparativen Darstellung bewährt. Aldehyd und Ketobisulfit-Verbindungen können direkt als Benzylthiuroniumsalze identifiziert werden. Mit Däubner, Blaha, Rettenbacher, Khautz, Keller, Schubert und Stepnicka wurde die alkalische Oxydation mit Nitrobenzol, das absorptionspektrographische Verhalten im UV und bes. die alkalische Hydrolyse studiert. Die Oxydation erwies sich als nicht spezifisch. Spektrographische Arbeiten zeigten, daß die Überführung von aliphatischem Hydroxyl in der Seitenkette in eine Sulfo-Gruppe meist einen viel geringeren Einfluß auf Höhe und Lage des Maximums besitzt als Änderung der Substitution im Kern oder Kombination von Carbonyl und Sulfo-Gruppe in der Seitenkette. Die Lignin-Bestimmung aus der Höhe der Extinktion der Ligninsulfosäure in der Sulfit-Ablauge ist mit sehr großer Fehlermöglichkeit behaftet.

Die alkalische Hydrolyse unter Ausschluß von Sauerstoff ließ bei den Modellsulfosäuren, durch Austausch der Sulfo-Gruppe gegen Hydroxyl, zwischen Aldol-Typen und Acyloin-Typen unterscheiden. Erstere liefern Aldehyde, letztere Säuren. Als wahrscheinlichste Gruppierung ergab sich die der Coniferyl-aldehyd-hydrosulfosäure, die mit Alkali zu Vanillin und Acetaldehyd zerfällt. Beide Spaltprodukte wurden aus Ligninsulfosäure erhalten. Da Adler durch Farbreaktionen eine solche Struktur bestätigte, ist diese zum kleinen Teil frei in der Ligninsulfosäure vorhanden, darüber hinaus aber ein polymerer Anteil, der in weit größerer Menge beide Spaltprodukte ergibt. Daneben wurde in geringer Menge aus Ligninsulfosäure und Modellsubstanzen Formaldehyd erhalten. Methylierte Ligninsulfosäure gibt Veratrumaldehyd, Acetaldehyd und Vanillin. Letzteres dürfte überwiegend aus „inneren“ Einheiten stammen, da Veratrumaldehyd bei den gewählten Bedingungen nur zu 2% in Vanillin aufgespalten wird¹).

Das Verschwinden der Farbreaktionen des Holzes bzw. Nativlignins bei Methylierung mit Diazomethan, wird mit der Bildung von Pyrazolin-3-aldehyden erklärt, da in Modellversuchen mit Wittmann solche Anlagerungsprodukte an α,β -ungesättigte Aldehyde sichergestellt werden konnten.

K. — [VB 518]

¹) Vgl. z. B. J. Hlawa u. F. E. Brauns, Holzforschg. 7, 62 [1953].

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen und dgl. in dieser Zeitschrift berechtigt nicht zu der Annahme, daß solche Namen ohne weiteres von jedermann benutzt werden dürfen. Vielmehr handelt es sich häufig um gesetzlich geschützte eingetragene Warenzeichen, auch wenn sie nicht eigens mit „(W.Z.)“ gekennzeichnet sind.

Redaktion: (17a) Heidelberg, Ziegelhäuser Landstr. 35; Ruf 6975/76

Alle Rechte vorbehalten, insbesondere die der Übersetzung. Kein Teil dieser Zeitschrift darf in irgendeiner Form — durch Photokopie, Mikrofilm oder irgendein anderes Verfahren — ohne schriftliche Genehmigung des Verlages reproduziert werden. — All rights reserved (including those of translations into foreign languages). No part of this issue may be reproduced in any form, by photostat, microfilm, or any other means, without written permission from the publishers.