

11. Eine kristallisierte Säure aus Vitamin B₁₂, die noch biologische Aktivität besitzt.

Versuche mit Vitamin B₁₂, 1. Mitteilung

von O. Schindler.

(4. XII. 50.)

Neben Vitamin B₁₂ aus Leber¹⁾ und aus *Streptomyces griseus*-Kulturen²⁾ wurden bisher zum Teil aus Leber³⁾, zum Teil aus Kulturen von *Streptomyces aureofaciens*⁴⁾ noch andere Formen dieses Vitamins isoliert, die sich teilweise im Spektrum und in der mikrobiologischen Aktivität unterscheiden⁵⁾. So besitzt B₁₂ in wässriger Lösung im Rotvioletten ein Maximum bei 550 m μ , während dieses Maximum bei Vitamin B_{12b} nach 525 m μ verschoben ist⁴⁾. An der gleichen Stelle liegt auch das entsprechende Maximum von B_{12a}, das durch Hydrierung und Rückoxydation von B₁₂ erhalten wird⁶⁾. Die mikrobiologische Aktivität, gemessen an *Lactobac. Leichmannii*, wurde für B_{12a} mit 0,2⁷⁾ angegeben, während mit *Lactobac. lactis Dorner* die Werte bei 1 liegen, wenn B₁₂ gleich 1 gesetzt wird.

Das hier verwendete Vitamin B₁₂ wurde teilweise aus Leberextrakt⁸⁾, teilweise aus einem angereicherten Nebenprodukt der Streptomycinfabrikation⁹⁾ gewonnen nach einem Verfahren, das später beschrieben werden soll, und das gestattet, praktisch die gesamte mikrobiologisch bestimmbare Aktivität als kristallisiertes Vitamin zu fassen. Das nach diesem Verfahren erhaltene Präparat dürfte vollständig dem kürzlich von Veer und Mitarbeitern¹⁰⁾ sowie Brink und

¹⁾ E. L. Rickes, N. G. Brink, F. R. Koniuszy, T. R. Wood & K. Folkers, Science **107**, 396 (1948).

²⁾ E. L. Rickes, N. G. Brink, F. R. Koniuszy, T. R. Wood & K. Folkers, Science **108**, 634 (1948).

³⁾ E. Lester Smith, Nature **161**, 638 (1948); E. Lester Smith & L. F. J. Parker, Biochem. J. **43**, VIII (1948).

⁴⁾ J. V. Pierce, A. C. Page, E. L. R. Stokstad & T. H. Jukes, Am. Soc. **71**, 2952 (1949); H. Lichtman, J. Watson, V. Ginsberg, J. V. Pierce, E. L. R. Stokstad & T. H. Jukes, Proc. Soc. Exper. Biol. Med. **72**, 643 (1949).

⁵⁾ Vgl. auch die Übersichtsreferate von K. Folkers, Chem. Eng. News **28**, 1634 (1950); E. Lester Smith, J. of Pharmacy a. Pharmacol. **2**, 409 (1950).

⁶⁾ E. Kaczka, D. E. Wolf & K. Folkers, Am. Soc. **71**, 1515 (1949).

⁷⁾ D. Henlin & H. B. Woodruff, Abstracts Americ. Chemic. Soc. 116th Meeting, Atlantic City, 33A (1949).

⁸⁾ Wir danken der N. V. Organon, Oss, für die Überlassung des wertvollen Ausgangsmaterials.

⁹⁾ Wir sind den Armour Laboratories, Chicago, für die grosszügige Überlassung dieses Materials dankbar.

¹⁰⁾ W. L. C. Veer, J. H. Edelhausen, H. C. Wijmenga & J. Lens, Biochim. Biophys. Acta **6**, 225 (1950).

Mitarbeitern¹⁾ beschriebenen CN-Komplex entsprechen. Es wurde zuletzt durch mehrfaches Kristallisieren aus Wasser-Aceton gereinigt (vgl. Fig. 1). Das Spektrum des kristallisierten Produktes in methanolischer oder wässriger Lösung (vgl. Fig. 2) war identisch mit dem beschriebenen²⁾, obwohl die Analysen etwas tiefere CH-Werte ergaben.

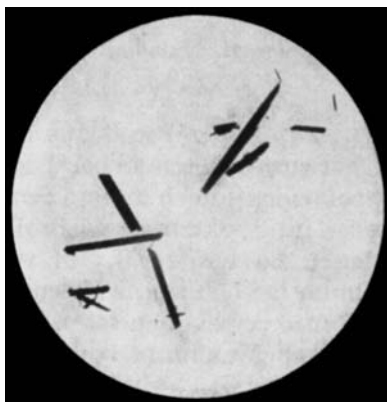


Fig. 1.

Vitamin B₁₂ (aus Wasser-Aceton krist.). 93 ×
Photo E. Schulz, Basel.

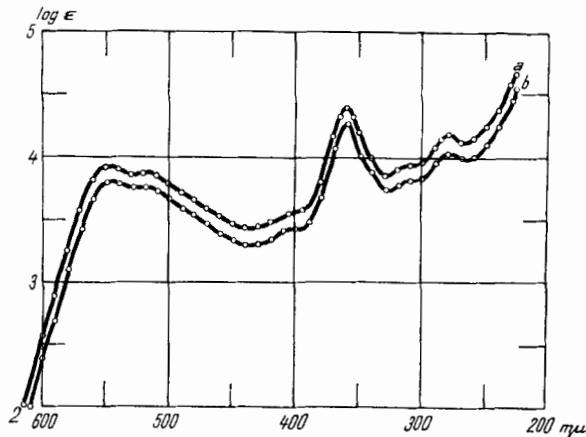


Fig. 2.

Absorptionsspektren in methanolischer Lösung von

- a) Vitamin B₁₂ (berechnet auf Mol.-Gew. 1500, woraus sich $\log. \epsilon = 4,39$ bei 361 m μ ergibt; setzt man als vermutliches Mol.-Gew. für B₁₂ den Wert 1300 ein, so erniedrigt sich das Maximum bei 361 m μ auf $\log. \epsilon = 4,33$; die beiden Kurven fallen dann fast zusammen;
- b) kristallisierte Säure aus Wasserstoffperoxyd-Abbau von Vitamin B₁₂ (berechnet auf Mol.-Gew. 1130; $\log. \epsilon = 4,27$ bei 361 m μ).

¹⁾ N. G. Brink, F. A. Kuehl & K. Folkers, Science **112**, 354 (1950).

²⁾ N. G. Brink, D. E. Wolf, E. Kaczka, E. L. Rickes, F. R. Koniuszy, T. R. Wood & K. Folkers, Am. Soc. **71**, 1854 (1949).

Zur Aufnahme des Spektrums wurde ein ungetrocknetes Produkt mit 12,2% Kristallwasser verwendet.

Bisher sind von chemischen Umsetzungen hauptsächlich drastische Eingriffe beschrieben worden, wobei die Isolierung kleiner¹⁾ und mittelgrosser²⁾ Spaltstücke gelang. Ausserdem sind Hydrierungen beschrieben worden, so die Bereitung von Vitamin B_{12a}, das durch Rückoxydation des mit Pt und H₂ hydrierten Vitamins erhalten wird³⁾.

Hier soll über eine Beobachtung berichtet werden, die vor einiger Zeit bei Versuchen gemacht wurde, Vitamin B₁₂ möglichst schonend abzubauen. Es wurde dabei gefunden, dass B₁₂ durch Einwirkung von H₂O₂ in leicht alkalischer Lösung in saure Produkte übergeführt werden kann. Bei 16stündiger Einwirkung waren neben 40% Neutralteilen etwa 60% in Säuren verwandelt, die sich aus Phenol-Chloroform-Gemisch mit Kaliumcarbonat-Lösung ausschütteln lassen.

Aus dem bei der Reaktion erhaltenen Neutralteil liessen sich aus Wasser-Aceton Kristalle gewinnen, die, soweit ersichtlich, dieselbe äussere Kristallform und dasselbe Spektrum zeigten wie B₁₂, aber bei der mikrobiologischen Prüfung an *Lactobac. Leichmannii* nur $\frac{1}{3}$ — $\frac{4}{5}$, an *Lactobac. lactis* $\frac{1}{10}$ — $\frac{1}{3}$ der Wirksamkeit von B₁₂ zeigten⁴⁾. Bei erneuter Oxydation dieses Neutralteiles (es wurde die Mutterlauge der Kristalle verwendet) wurde wiederum der grössere Teil in saure Stoffe verwandelt, so dass praktisch das gesamte eingesetzte Vitamin in Säure übergeführt war.

Das Gemisch der sauren Produkte wurde durch fraktioniertes Ausschütteln aus Phenol-Chloroform-Gemisch mit KHCO₃-K₂CO₃-Puffer und anschliessend mit 2-proz. K₂CO₃-Lösung bei 0° in stark und schwach saure Anteile zerlegt. Die ersteren kristallisierten nicht, während aus den schwachen Säuren eine kristallisierte, rote Säure erhalten werden konnte. Die Ausbeute betrug etwa 10% des total eingesetzten Materials. Die Kristalle, kurze Prismen oder Körner, unterschieden sich in der äusseren Form merklich von den flachen, langen Nadeln des Ausgangsmaterials, zeigten aber praktisch dasselbe Spektrum (vgl. Fig. 2). Nur die molare Extinktion war geringer, wenn man als Molgewicht der Säure den titrimetrisch ermittelten Wert 1130 und für B₁₂ den Wert 1500 einsetzte. Bemerkenswerterweise zeigte diese Säure noch beträchtliche mikrobiologische Wirksamkeit, und zwar an *Lactobac. lactis* 0,1—0,5; an *Lactobac. Leichmannii* 0,2—0,5 und an *Euglena gracilis* im Licht 0,2, im Vergleich mit Vitamin B₁₂ = 1⁴⁾.

¹⁾ B. Ellis, V. Petrow & G. F. Snook, J. Pharmacy a. Pharmacol. **1**, 735, 950 (1949).

²⁾ N. G. Brink & K. Folkers, Am. Soc. **71**, 2951 (1949); E. R. Holiday & V. Petrow, J. Pharmacy a. Pharmacol. **1**, 734 (1949); J. G. Buchanan, A. W. Johnson, J. A. Millis & A. R. Todd, Chemistry a. Industry **1950**, 426.

³⁾ E. Kaczka, D. E. Wolf & K. Folkers, Am. Soc. **71**, 1515 (1949).

⁴⁾ Zur Zeit, als die Bestimmung ausgeführt wurde, konnte keine grössere Genauigkeit erreicht werden.

Das Produkt war noch Co- und P-haltig. Die völlige Einheitlichkeit dieser Säure kann natürlich noch nicht als bewiesen gelten, auch ist es nicht ausgeschlossen, dass die Kristalle noch Spuren von neutralen Beimengungen enthalten. Nach der im experimentellen Teil beschriebenen Trennung dürfte es aber ausgeschlossen sein, dass die relativ hohe Aktivität lediglich von beigemischtem B_{12} herrührt. Dagegen spricht auch die Titrationskurve (siehe unten).

Da sowohl Vitamin B_{12} als auch die Säure gegen Alkali relativ empfindlich sind, muss die Trennung zwischen neutralen und sauren Anteilen rasch durchgeführt werden. Aus dem gleichen Grund haben wir die verdünnte Natronlauge bei der Oxydation mit Wasserstoff-superoxyd in einem zweiten Versuch durch verdünnte Pottaschelösung ersetzt, wobei sich die Ausbeute an kristallisierter Säure auf 15% steigern liess.

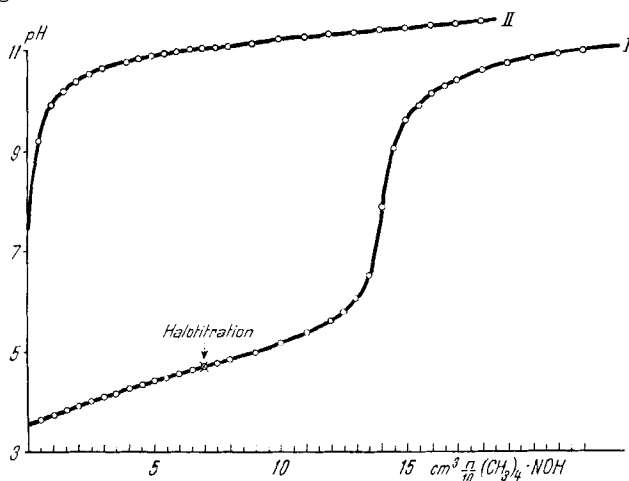


Fig. 3.

Titration mit 0,1-n. $(CH_3)_4NOH$ in Wasser:

I. kristallisierte Säure aus Wasserstoffperoxyd-Abbau von Vitamin B_{12} ; II. Vitamin B_{12} .

Die potentiometrische Titration der kristallisierten Säure¹⁾ ergab die in Figur 3 wiedergegebene Kurve; als Vergleich ist die Titration des als Ausgangsmaterial benutzten Vitamins B_{12} wiedergegeben. Wie daraus ersichtlich ist, handelt es sich um eine echte Säure von der Stärke einer Carbonsäure, deren Äquivalentgewicht $1130 \pm 3\%$ beträgt. Das pK der Säure beträgt entsprechend dem Halbtitrationswert 4,7.

Die Entstehung einer Säure durch H_2O_2 in leicht alkalischer Lösung kann prinzipiell entweder durch oxydative Einwirkung oder durch katalytische Beschleunigung einer Verseifung bedingt sein.

¹⁾ Wir verdanken die Ausführung der Titration Herrn Dr. O. Häfliger vom Organisch-chemischen Labor der ETH. Zürich.

Zur Prüfung dieser Frage wurde Vitamin B₁₂ unter denselben Bedingungen mit stark verdünnter NaOH ohne H₂O₂ behandelt. Nach 24stündiger Einwirkung waren nur 10% des eingesetzten Ausgangsmaterials in Produkte mit sauren Eigenschaften übergeführt, hingegen konnten nach 7 Tagen 90% als Säuren erhalten werden. Aus dem so erhaltenen Säuregemisch liess sich ein Teil (10%) in Kristallen erhalten, die auf ein Mol.-Gew. von 1500 berechnet, dasselbe Spektrum zeigten wie B₁₂, die aber im mikrobiologischen Test unwirksam waren. Die genannte Frage liess sich auf dem Wege somit nicht sicher entscheiden. Es ist möglich, dass in Gegenwart von H₂O₂ die Bildung einer Säure aus einer Amid- oder Nitril-Gruppe so beschleunigt wird, dass sie ohne zu grosse weitere Eingriffe an der Molekel beendet ist, während mit Lauge allein diese Reaktion längere Zeit benötigt, so dass durch weitere Reaktionen die biologische Aktivität ganz verloren geht.

Wir haben versucht, das Wasserstoffsuperoxyd durch Kaliumpersulfat zu ersetzen. Die Reaktion in neutralem Medium lieferte keine Säure, sondern nur einen aus Wasser-Aceton kristallisierbaren Neutralkörper. Das Spektrum dieses Produktes (die log ϵ -Werte wurden auf das Mol.-Gew. 1500 berechnet) war mit demjenigen von B₁₂ identisch; die mikrobiologische Aktivität an *Lactobac. Leichmannii* war auf $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{10}$ der Wirksamkeit von B₁₂ gesunken.

Für zahlreiche Ratschläge bin ich Herrn Prof. Dr. T. Reichstein, Basel, unter dessen Leitung diese Arbeit ausgeführt wurde, zu Dank verpflichtet. Ausserdem danke ich der *Haco-Gesellschaft AG.*, Gümligen, für die Unterstützung der Arbeit.

Die Spektren wurden von Herrn P. Zoller in der Organ.-chem. Anstalt Basel mit einem Beckman-Spektrophotometer, Modell DU, ausgemessen; die mikrobiologischen Testierungen verdanken wir z. T. Herrn Prof. Dr. W. H. Schopfer, Universität Bern, z. T. Herrn Dr. V. Kocher, Mikrobiologisches Labor St. Jakob, Basel.

Experimenteller Teil.

(Die mikrobiologischen Aktivitäten beziehen sich auf kristallisiertes Vitamin B₁₂ als Standard = 1 und sind im Röhrentest bestimmt.)

Oxydation von Vitamin B₁₂ mit H₂O₂ in wässriger NaOH. 10 mg B₁₂ wurden in 3 cm³ Wasser gelöst, mit 3 cm³ Perhydrol und 0.27 cm³ 2-n. NaOH versetzt. Die gegen Phenolphthalein schwach alkalische Lösung blieb 16 Stunden bei 20° im Dunkeln stehen, wobei die rote Farbe des Vitamins unverändert blieb.

Im Scheidetrichter wurde hierauf tropfenweise mit 2-n. Schwefelsäure gegen Kongo sauer gestellt und 3mal mit 5 cm³ eines Gemisches aus 1 Vol.-Teil Phenol mit 4 Vol.-Teilen Chloroform ausgeschüttelt. Die organische Schicht passierte noch 6 weitere Scheidetrichter, die der Reihe nach enthielten: 1. 4 cm³ einer Mischung von 10 cm³ 5-proz. KHCO₃-Lösung mit 1.1 cm³ 10-proz. K₂CO₃-Lösung vom pH 7.5; 2. 4 cm³ der gleichen Mischung wie 1; 3. 4 cm³ 2-proz. K₂CO₃-Lösung; 4. 4 cm³ Wasser; 5. 2 cm³ 2-proz. K₂CO₃-Lösung; 6. 2 cm³ Wasser. Sämtliche Lösungen waren auf 0° abgekühlt und das Ausschütteln wurde so beschleunigt, dass die Temperatur nicht über 5° stieg. Während die ersten 4 organischen Auszüge den letzten Scheidetrichter rot gefärbt verliessen, waren die letzten 3 Ausschüttelungen farblos. Ebenso war die saure wässrige Lösung farblos geworden, während die sauren, roten Anteile der Reaktionsprodukte in den Scheidetrichtern 1—6 zurückgehalten wurden.

Aus den vereinigten 8, die Neutralteile enthaltenden Chloroform-Phenol-Auszügen wurde das Chloroform im Vakuum bei 30° Badtemperatur abdestilliert und das zurückgebliebene Phenol mit 100 cm³ Äther verdünnt. Die dabei ausgefallenen roten Flocken wurden durch 6maliges Ausschütteln mit je 4 cm³ Wasser gelöst. Die wässerigen Auszüge wurden mit 30 cm³ Äther gewaschen und im Vakuum eingedampft, wobei ein intensiv roter Rückstand von 3,0 mg erhalten wurde. Aus Wasser-Aceton gab dieser bei 0° 1,5 mg Nadeln. Das Spektrum (Fig. 2; bei der Berechnung der log ϵ -Werte wurde das Mol.-Gew. als 1500 angenommen) ist identisch mit dem des Vitamins B₁₂; mikrobiologische Aktivität: *Lactobac. lactis* *Dorner* 0,1—0,3; *Lactobac. Leichmannii* 0,3—0,8.

Die alkalischen Lösungen der ersten beiden Scheidetrichter (Nr. 1 und Nr. 2) wurden vereinigt, mit 2-n. Schwefelsäure tropfenweise kongosauer gestellt und anschliessend 4mal mit 4 cm³ des Gemisches aus 1 Vol.-Teil Phenol mit 4 Vol.-Teilen Chloroform ausgeschüttelt. Die organischen Auszüge wurden noch 3mal mit 2 cm³ Wasser gewaschen und hatten praktisch alle rot gefärbten Säuren der wässerigen Lösung entzogen. Das Chloroform wurde im Vakuum abdestilliert und das Phenol mit 30 cm³ Äther verdünnt. Durch Ausschütteln mit 6mal 2 cm³ Wasser wurden die ausgefallenen roten Flocken gelöst. Nachdem die vereinigten wässerigen Auszüge mit 10 cm³ Äther gewaschen waren, wurden sie im Vakuum eingedampft, wobei sie 4,8 mg „starke Säuren“ hinterliessen, die aus Wasser-Aceton nicht zur Kristallisation zu bringen waren.

Die Pottasche-alkalischen Lösungen der Scheidetrichter Nr. 3 und 5 sowie die im Laufe des Ausschüttelns phenolphthalein-alkalisch gewordenen Waschwasser der Scheidetrichter Nr. 4 und 6 wurden vereinigt, mit so viel 2-n. Schwefelsäure versetzt, dass die Lösung gegen Kongo gerade sauer reagierte und dann in der gleichen Art mit Phenol-Chloroform-Gemisch ausgeschüttelt wie die Lösungen der Scheidetrichter Nr. 1 und 2. Es wurden so 2 mg rot gefärbte „schwache Säuren“ erhalten. Diese wurden in 0,5 cm³ Wasser gelöst und mit Aceton bis zur Trübung versetzt. Nachdem die ersten amorph ausgefallenen Anteile durch Zentrifugieren abgetrennt waren, wurde die Lösung auf 0° gestellt, wobei sie nach 7 Tagen 1 mg rote prismenförmige Körner lieferte, die aus Wasser-Aceton umkristallisiert wurden. Spektrum siehe Figur 2, potentiometrische Titration gegen Tetramethyl-ammoniumhydroxyd siehe Figur 3. Mikrobiologische Aktivität: *Lactobac. lactis* *Dorner* 0,1—0,5; *Lactobac. Leichmannii* 0,2—0,4; *Euglena gracilis* 0,18.

Oxydation von Vitamin B₁₂ mit H₂O₂ in wässriger K₂CO₃-Lösung. 3 cm³ Perhydrol wurden mit 3 cm³ Wasser und 0,55 cm³ 10-proz. K₂CO₃-Lösung vermischt und darin 10 mg B₁₂ gelöst. Nach 18 Stunden Stehen bei 20° wurde die alkalische Lösung 8mal mit 4 cm³ eines Gemisches von 1 Vol.-Teil Phenol mit 4 Vol.-Teilen Chloroform ausgeschüttelt. Die organischen Auszüge wurden der Reihe nach 1mal mit 2 cm³ 10-proz. K₂CO₃-Lösung und 1mal mit 3 cm³ Wasser gewaschen, wobei die letzten 3 organischen Ausschüttelungen den letzten Scheidetrichter farblos verliessen. Aus den vereinigten roten Ausschüttelungen wurde das Chloroform im Vakuum abdestilliert. Durch Verdünnen mit 70 cm³ Äther wurden die in Phenol gelösten Neutralstoffe ausgefällt, der Niederschlag wurde durch Ausschütteln mit kleinen Portionen Wasser gesammelt. Durch Eindampfen der wässerigen Lösung im Vakuum wurden 4 mg Rückstand erhalten, die aus Wasser-Aceton 2 mg nadelförmige Kristalle lieferten. Die rot gefärbte Pottaschelösung wurde mit dem Waschwasser vereinigt und mit 2-n. Schwefelsäure gegen Kongo sauer gestellt. Durch 6maliges Ausschütteln mit je 3 cm³ einer Mischung aus 1 Vol.-Teil Phenol mit 4 Vol.-Teilen Chloroform wurden der wässerigen Lösung alle rot gefärbten sauren Produkte entzogen. Die gleiche Aufarbeitung der organischen Auszüge wie bei der ersten Oxydationsmethode lieferte 5 mg roten, sauren Rückstand, der aus Wasser-Aceton 1,5 mg prismatische Kristalle von den gleichen Eigenschaften wie die kristallisierte Säure aus der laugealkalischen Oxydation lieferte.

Nachoxydation mit Wasserstoffperoxyd des bei der Oxydation erhaltenen Neutralproduktes. 1 cm³ Perhydrol wurde mit 1 cm³ Wasser verdünnt und durch Zugabe von 0,1 cm³ 2-n. NaOH die Lösung gegen Phenolphthalein alkalisch gestellt. Darin wurden 3 mg eingedampfte Mutterlaugen des bei der Reaktion von B₁₂ mit

H₂O₂ angefallenen Neutralproduktes gelöst. Nach 10stündigem Stehen bei 20° wurde 0,1 cm³ 10-proz. K₂CO₃-Lösung zugegeben und die alkalische Lösung 4mal mit 3 cm³ einer Mischung aus 1 Vol.-Teil Phenol mit 4 Vol.-Teilen Chloroform ausgeschüttelt. Die organische Schicht passierte einen zweiten Scheidetrichter mit 0,5 cm³ Wasser. Das Chloroform wurde im Vakuum verjagt und das zurückgebliebene Phenol mit ca. 20 cm³ Äther verdünnt. Die Ätherlösung wurde 6mal mit 1 cm³ Wasser ausgeschüttelt. Durch Eindampfen der wässrigen Lösung wurden 0,5 mg rot gefärbte Neutralteile erhalten.

Die intensiv rot gefärbte alkalische Lösung und das mit ihr vereinigte Waschwasser wurden durch tropfenweisen Zusatz von 2-n. Schwefelsäure kongosauer gestellt. Durch Ausschütteln der sauren Lösung mit Phenol-Chloroform (1:4)¹⁾ wurden die in der alkalischen Lösung verbliebenen roten Anteile herausgelöst. Die gleiche Aufarbeitung der Phenol-Chloroform-Lösung wie oben lieferte 1,5 mg rot gefärbte saure Produkte. Aus Wasser-Aceton bei 0° wurden nach 3 Tagen 0,151 mg Prismen erhalten, deren Absorptionsspektrum in Methanol mit dem von B₁₂ (vgl. Fig. 2) identisch war; mikrobiologische Wirksamkeit an *Lactobac. lactis* *Dorner* 0,05–0,1.

Abbau von Vitamin B₁₂ mit Natronlauge. 5 mg Vitamin B₁₂ wurden in 2 cm³ 0,1-n. NaOH gelöst und im Dunkeln bei 20° 7 Tage stehengelassen. Die in der Farbe unveränderte Lösung wurde mit 2 cm³ Wasser verdünnt und die alkalische Lösung 4mal mit 5 cm³ einer Mischung aus 1 Vol.-Teil Phenol mit 4 Vol.-Teilen Chloroform ausgeschüttelt. Die organische Schicht passierte einen zweiten Scheidetrichter mit 1 cm³ Wasser. Während die beiden ersten Ausschüttelungen rote, neutrale Produkte herauslösten, waren die beiden letzten farblos. Das Chloroform wurde im Vakuum verdampft und die zurückgebliebene Phenollösung mit 15 cm³ Äther verdünnt. Durch Ausschütteln der Ätherlösung mit kleinen Portionen Wasser und Eindampfen der wässrigen Lösung wurden 0,5 mg rot gefärbte neutrale Produkte erhalten, die nicht kristallisiert werden konnten.

Die alkalische Lösung wurde mit dem Waschwasser vereinigt, mit 2-n. Schwefelsäure gegen Kongo sauer gestellt und diese saure Lösung wiederholt mit Phenol-Chloroform-(1:4)-Gemisch ausgeschüttelt. Die wässrige Lösung wurde dabei farblos. Die Aufarbeitung der Phenol-Chloroform-Lösung gestaltete sich gleich wie bei der Aufarbeitung der Neutralteile; es wurden so 4,5 mg saure Produkte erhalten, die aus Wasser-Aceton nach 2 Wochen bei 0° 0,669 mg prismenförmige Kristalle lieferten. Das Absorptionsspektrum in methanolischer Lösung (berechnet auf das Mol.-Gew. von 1500) war mit demjenigen von B₁₂ identisch. Mikrobiologische Aktivität an *Lactobac. lactis* *Dorner* 0,0001.

Reaktion von Vitamin B₁₂ mit Kaliumpersulfat. 7,5 mg Vitamin B₁₂ wurden in 2 cm³ Wasser gelöst und die mit 10-proz. KHCO₃-Lösung gegen Lackmus neutralisierte Lösung von 40 mg K₂S₂O₈ in 2 cm³ Wasser zugegeben. Nach 48 Stunden wurde die bei 20° im Dunkeln aufbewahrte rotviolette Lösung mit 0,1 cm³ 25-proz. K₂CO₃-Lösung versetzt und 5mal mit 3 cm³ Phenol-Chloroform-(1:4)-Gemisch ausgeschüttelt. Die wässrige Lösung wurde dabei farblos, während die organische Schicht rotviolett gefärbt war. Das Chloroform wurde im Vakuum abdestilliert und die phenolische Lösung mit 20 cm³ Äther verdünnt; durch 6maliges Ausschütteln mit 1 cm³ Wasser wurden die ausgefallenen roten Flocken gelöst. Durch Eindampfen der wässrigen Lösung wurden 8 mg Rückstand erhalten, der aus Wasser-Aceton nach 18 Stunden 2,5 mg nadelförmige Kristalle gab. Diese wurden aus Wasser-Aceton umkristallisiert. Das Absorptionsspektrum in methanolischer Lösung war gleich wie bei B₁₂ (log ϵ -Werte auf das Mol.-Gew. 1500 berechnet); mikrobiologische Aktivität an *Lactobac. Leichmannii* 0,1–0,3.

Zusammenfassung.

Die Oxydation von Vitamin B₁₂ mit Wasserstoffsuperoxyd in schwach alkalischer Lösung lieferte neben einem kristallisierten Neutralkörper eine kristallisierte Säure. Beide zeigten Absorptions-

¹⁾ Verhältnis der Volumteile.

spektren, die mit dem von B_{12} identisch sind; sie besaßen auch beide noch erhebliche mikrobiologische Aktivität, die etwa 20—40% derjenigen von Vitamin B_{12} betrug. Auch beim Abbau mit 0,1-n. NaOH entstand in geringer Ausbeute eine kristallisierte, aber mikrobiologisch inaktive Säure, die noch das unveränderte Spektrum besaß.

Pharmazeutische Anstalt der Universität Basel.

12. Nachweis und Trennung digitaloider Glykoside und Aglykone durch Chromatographie auf imprägniertem Filterpapier.

Glykoside und Aglykone, 70. Mitteilung¹⁾

von O. Schindler und T. Reichstein.

(4. XII. 50.)

Die Isolierung, Trennung, Identifizierung und Reinheitsprüfung digitaloider Glykoside und Aglykone mit den üblichen präparativen Methoden benötigt relativ viel Substanz und Zeitaufwand. Wir prüften daher die Möglichkeit, für diesen Zweck die Papierchromatographie nutzbar zu machen. Für den Nachweis der Glykoside und Aglykone in Digitalis-Blättern und Extrakten haben kürzlich *Svensen & Jensen*²⁾ diese Methode als brauchbar befunden³⁾. Die Papierchromatographie wurde zuerst zum Nachweis von Aminosäuren⁴⁾, später von Zuckern⁵⁾, Purin- und Pyrimidinderivaten⁶⁾ und vielen anderen Stoffgruppen⁷⁾, in letzter Zeit auch bei Steroiden⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾, benutzt. Sie hat teilweise sehr grosse Dienste geleistet, da sie rasch arbeitet, oft mit sehr geringen Substanzmengen auskommt und wenig Hilfsmittel benötigt. Im folgenden wird die Ausführungsform be-

¹⁾ 69. Mitteilung, *H. J. Huber, F. Blindenbacher, K. Mohr, P. Speiser & T. Reichstein*, *Helv.* **34**, 46 (1951).

²⁾ *A. B. Svensen & K. B. Jensen*, *Pharmac. acta Helv.* **25**, 241 (1950).

³⁾ Papierchromatographie von Flavanol-Glykosiden wurde schon von *S. H. Wender & T. B. Gage*, *Science* **109**, 287 (1949) und *E. C. Bate-Smith & R. G. Westall*, *Biochim. et Biophys. Acta* **4**, 427 (1950) beschrieben.

⁴⁾ *R. Consden, A. H. Gordon & A. J. P. Martin*, *Biochem. J.* **38**, 224 (1944); vgl. ⁷⁾.

⁵⁾ *S. M. Partridge*, *Nature* **158**, 270 (1946); *Biochem. J.* **42**, 238 (1948); *M. A. Jermyn & F. A. Isherwood*, *Biochem. J.* **44**, 402 (1949).

⁶⁾ *E. Vischer & E. Chargaff*, *J. Biol. Chem.* **176**, 703 (1948); *E. Chargaff, E. Vischer, R. Doniger, C. Green & F. Misani*, *J. Biol. Chem.* **177**, 405 (1949).

⁷⁾ Chromatographic Analysis, Discussions of the Faraday Society No. 7 (*Gurney & Jackson*, London und Edinburgh 1949).

⁸⁾ *A. Zaffaroni, R. B. Burton & E. H. Kentmann*, *J. Biol. Chem.* **177**, 109 (1949); *Science* **111**, 6 (1950).

⁹⁾ *A. L. Haskins, A. J. Sherman & W. M. Allen*, *J. Biol. Chem.* **182**, 429 (1950).

¹⁰⁾ *D. Kritchevsky & M. Calvin*, *Am. Soc.* **72**, 4330 (1950).