

Wasser, Alkohol und Äther gewaschen wurden. Zur Analyse wurde 3 Std. im Hochvakuum bei 20° getrocknet.

4,398 mg Subst. gaben 3,45 mg CO ₂ und 1,33 mg H ₂ O
4,700 mg Subst. gaben 0,517 cm ³ N ₂ (23°, 743 mm)
4,51 mg Subst. verbrauchten 1,36 cm ³ 0,02-n. J ₂ -Lösung
C ₆ H ₁₁ O ₇ N ₃ SCu Ber. C 21,65 H 3,33 N 12,63 S 9,63%
Gef. „ 21,40 „ 3,38 „ 12,40 „ 9,58%

Pyridin-4-hydroxamsäure¹⁾. Eine aus 7,1 g Hydroxylamin-hydrochlorid in 40 cm³ Methanol und 8,4 g KOH in 25 cm³ Methanol bereitete Lösung wurde mit 7,5 g Pyridin-4-carbonsäure-äthylester umgesetzt, wie dies analog für Benzhydroxamsäure beschrieben ist²⁾. Nach 2 Std. tritt Kristallisation ein. Man lässt 24 Std. reagieren, engt im Vakuum stark ein und filtriert das K-Pyridin-4-hydroxamat ab. Ausbeute 4,8 g. Dieses Salz wird mit 20 cm³ 1,25-n. Essigsäure versetzt und die entstandene Lösung im Vakuum eingeengt und eisgekühlt. Aus Essigester feine Nadeln, Smp. 168–170°. Ausbeute 2,8 g. Mit FeCl₃-Lösung blutrote Färbung.

3,695 mg Subst. gaben 7,098 mg CO ₂ und 1,420 mg H ₂ O
C ₆ H ₆ O ₂ N ₂ Ber. C 52,17 H 4,38% Gef. C 52,17 H 4,30%

Eine wässrige Lösung von Pyridin-4-hydroxamsäure gibt mit einer Kupfersulfatlösung in nahezu quantitativer Ausbeute grüngefärbte Nadeln eines Cu-Salzes.

Die Mikroanalysen verdanken wir dem Mikroanalytischen Laboratorium der *CIBA Aktiengesellschaft* (Dr. H. Gysel).

Zusammenfassung.

Eine Reihe von Verbindungen, die fähig sind, Metalle komplex zu binden, wird auf ihre tuberkulostatische Wirkung untersucht. Es zeigt sich, dass bei einigen in vitro und beim 5-Oxychinoxalin auch in vivo durch Cu⁺⁺ eine Steigerung der Aktivität zu erzielen ist.

Anstalt für anorganische Chemie
und Hygienische Anstalt der Universität Basel.

216. Über das Vorkommen von Vitamin B₁₂ in Mycobakterien.

Metallionen und biologische Wirkung, 8. Mitteilung³⁾

von V. Kocher und E. Sorkin.

(18. VI. 52.)

Im Zusammenhang mit Untersuchungen über die Wirkung von Metallionen auf Mikroorganismen in Gegenwart von Metallkomplexbildnern³⁾ interessierte es uns, einige Mycobakterien auf die Fähigkeit zur Synthese von Vitamin B₁₂ zu prüfen. Es war dies von besonderem Interesse, da wir gefunden hatten, dass die Wirkung des Oxins auf

¹⁾ T. Gadner, E. Wenis & F. A. Smith, loc. cit., beschrieben kürzlich das Hydrochlorid dieser Verbindung.

²⁾ Org. Synth. Coll. Vol. II, 67 (1947).

³⁾ 7. Mitteilung: E. Sorkin, W. Roth & H. Erlenmeyer, Helv. 35, 1736 (1952).

diese Bakterien durch Co⁺⁺ abgeschwächt wird¹⁾, und dass auch die verstärkende Wirkung, die Cu⁺⁺ auf diese Oxinwirkung ausüben, durch Co⁺⁺ kompetitiv aufgehoben wird²⁾. Es konnte auch gezeigt werden, dass diese Wirkungen der freien Co⁺⁺ nicht mit dem Vitamin B₁₂ erzielt werden können³⁾.

Es war daher interessant, festzustellen, ob die von uns benutzten Mycobakterien, *M. tuberculosis* Stamm *H 37 Rv*, und Stamm *H 2150*, Vitamin B₁₂ aufbauen können und dementsprechend Co⁺⁺ benötigen⁴⁾. Von anderen Bakterien dieser Reihe haben wir bei dieser Gelegenheit noch *M. smegmatis* und *M. phlei* geprüft.

Bereits von *Rickes* und Mitarb.⁵⁾ wurde der Nachweis erbracht, dass Vitamin B₁₂ durch ein *Mycobacterium*, *M. smegmatis*, synthetisiert wird, und *Hendlin & Ruger*⁶⁾ zeigten, dass die Menge des gebildeten Vitamin B₁₂ durch Zugabe von Co⁺⁺ zur Nährösung gesteigert werden kann. Wir haben in der Folge eine Reihe von Mycobakterien auf ihren Vitamin-B₁₂-Gehalt untersucht.

Die Isolierung erfolgte ähnlich der von *Schindler & Reichstein*⁷⁾ angegebenen Methode. Es zeigte sich jedoch, dass aus *Mycobacterium tuberculosis*, Stamm *H 37 Rv* und Stamm *H 2150*, nur nach vorheriger Extraktion mit kaltem Petroläther vitamin-B₁₂-haltige Fraktionen gewonnen werden konnten (siehe exp. Teil).

Experimenteller Teil.

Bakterien: Untersucht wurden *Mycobacterium tuberculosis*, Stamm *H 37 Rv*, sowie Stamm *H 2150*, ferner *Mycobacterium smegmatis* und *Mycobacterium phlei*.

Züchtung der Bakterien: Alle Organismen wurden bei 37° in 100 cm³-Kölbchen mit je 50 cm³ Nährösung gezüchtet. Züchtungsdauer: für den Stamm *H 37 Rv*, für *Mycobacterium smegmatis* und für *Mycobacterium phlei* 30 Tage, für den langsam wachsenden Stamm *H 2150* 40 Tage. Die Nährösung hatte folgende Zusammensetzung:

L-Asparagin	5,0 g	Natriumcarbonat (10 H ₂ O) . . .	2,0 g
Kaliumdihydrogenphosphat . . .	3,0 g	Magnesiumsulfat (7 H ₂ O) . . .	1,0 g
Ammoniumcitrat	5,0 g	Ammoniumeisen(III)-citrat . . .	0,05 g
Glycerin	50 cm ³	dest. Wasser ad 1000 cm ³	

Die Bakterien wurden teils ohne, teils mit Kobalt-Zusatz (pro Kultur, d. i. pro 50 cm³ Nährösung, 5 mg CoCl₂) kultiviert. Bei Co⁺⁺-Zusatz fanden wir (siehe Tab. 1) erhöhte Vitamin-B₁₂-Werte.

Vor der Isolierung des Vitamins wurden die Bakterien durch ein halbstündiges Erhitzen im Dampfbad abgetötet und durch Filtrieren von der Nährösung getrennt.

¹⁾ Bei *Staph. aureus* haben bereits früher *Rubbo, Albert & Gibson* diese Beziehungen zwischen Oxin und Co⁺⁺ eingehend untersucht. Brit. J. exptl. Path. **31**, 425 (1950).

²⁾ Ähnlich wie Co⁺⁺ verhält sich MoO₄²⁻, siehe *W. Roth, E. Sorkin & H. Erlenmeyer*, Schweiz. Zschr. Path. u. Bakt., im Druck (1952).

³⁾ *E. Sorkin, W. Roth, V. Kocher & H. Erlenmeyer*, Exper. **7**, 257 (1951).

⁴⁾ Den üblichen Nährösungen werden keine Co⁺⁺ zugefügt, und sie enthalten demnach solche nur als Verunreinigung.

⁵⁾ *E. L. Rickes, N. G. Brink, F. R. Koniuszy, T. R. Wood & K. Folkers*, Science **108**, 634 (1948).

⁶⁾ *D. Hendlin & M. L. Ruger*, Science **111**, 541 (1950); vgl. *C. Rosenblum & D. T. Woodbury*, Science **113**, 215 (1951).

⁷⁾ *O. Schindler & T. Reichstein*, Helv. **35**, 307 (1952).

Extraktion: a) *Bakterien:* 5 g feuchte Tuberkelbazillen¹⁾ wurden in 20 cm³ Petroläther suspendiert, 2–3 Min. geschüttelt und filtriert²⁾. Nach Wiederholen dieses Vorgangs wurden die Bakterien mit 30 cm³ 65-proz. Alkohol und 1 cm³ Eisessig versetzt und 2 Tage mechanisch geschüttelt. Die Bakterien wurden abfiltriert; das Filtrat wurde im Vakuum bei 30° Badtemperatur eingedampft. Zur Fermentation³⁾ wurde der Rückstand in 5 cm³ Wasser aufgenommen, 10 mg Papain (1:80)⁴⁾ und 3 mg Kaliumcyanid zugesetzt und das pH auf 5–6 eingestellt. Nach zweitägigem Stehen bei 55° wurde über Hyflo Super Cel abfiltriert und das noch saure Filtrat je viermal mit 50 cm³ Chloroform und 10 cm³ Phenol-Chloroform (Vol 1:4)-Gemisch extrahiert. Diese Auszüge wurden im Vakuum bei 30° Badtemperatur eingedampft. Der phenolhaltige Rückstand wurde in Äther aufgenommen und wiederholt mit Wasser behandelt. Die wässerigen Auszüge ergaben nach Waschen mit Äther und vorsichtigem Eindampfen im Vakuum einen leicht gefärbten Rückstand (250 mg), der mikrobiologisch geprüft wurde.

b) *Nährösung:* Zur Extraktion der Kulturfiltrate wurde mit Essigsäure auf pH 4 eingestellt, im Vakuum bei 40° auf 10 cm³ eingeengt und das verbleibende Gemisch über einem Hartfilter abgenutscht. Die Filtrate wurden direkt ohne enzymatischen Abbau der Chloroform- bzw. Chloroform-Phenol-Extraktion unterworfen.

Die Bestimmung des Vitamins B₁₂ erfolgte mikrobiologisch im Röhrchentest mit *Lactobacillus leichmannii* 313. Als Testsubstanz diente kristallisiertes Vitamin B₁₂. Mit Hilfe der papierchromatographisch-mikrobiologischen Methode⁵⁾ wurde der Beweis erbracht, dass die Aktivität nur dem Vitamin B₁₂ zugeschrieben werden kann, und dass keine Desoxyribonucleoside im Extrakt vorhanden waren.

Die angeführten Resultate (siehe Tab. 1) beziehen sich auf den Vitamin-B₁₂-Gehalt von 100 cm³ Kulturfiltrat bzw. derjenigen Bakterienmenge, welche auf 100 cm³ *Sauton*-Nährösung gewachsen war.

Tabelle 1.
Aktivität in γ Vitamin B₁₂ pro 100 cm³ Kultur.

	Ungeimpfte Nährösung (Kontrolle)	<i>M. tuberculosis</i>		<i>M. smeg- matis</i>	<i>M. phlei</i>
		H 37 Rv	H 2150		
Bakt. {	ohne Co ⁺⁺ -Zusatz .	inaktiv	inaktiv	0,07	0,3
	mit Co ⁺⁺ -Zusatz .	0,2	0,02	0,09	1,6
Nährl. {	ohne Co ⁺⁺ -Zusatz .	inaktiv	0,07	0,15	0,3
	mit Co ⁺⁺ -Zusatz .	inaktiv	1,0	0,2	0,7

Wir danken Herrn Prof. Dr. H. Erlenmeyer für sein dieser Arbeit entgegengebrachtes Interesse und Herrn Prof. Dr. F. Roulet für die bereitwillige Züchtung der Bakterien.

Zusammenfassung.

Es wird bei 4 Mycobakterienstämmen der Nachweis erbracht, dass sie Vitamin B₁₂ synthetisieren, und dass Zusatz von Co⁺⁺ zur Nährösung den Vitamin-B₁₂-Gehalt erhöht.

Anstalten für anorganische und organische Chemie
der Universität Basel.

¹⁾ Die analoge Extraktionsart gilt auch für die anderen Organismen, jedoch ist die Vorbehandlung mit Petroläther bei *Mycobacterium smegmatis* und *phlei* nicht notwendig.

²⁾ Die Petrolätherextrakte zeigten keine Vitamin-B₁₂-Aktivität.

³⁾ Siehe O. Schindler & T. Reichstein, loc. cit.

⁴⁾ Herkunft: AG. vorm. Siegfried, Zofingen.

⁵⁾ V. Kocher, R. Karrer & H. B. Müller, Z. Vitaminforschg. 21, 403 (1950).