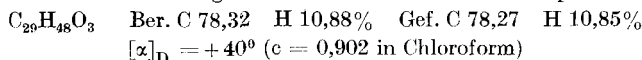


nachgewaschen. Das Filtrat wurde im Vakuum zur Trockene eingedampft, der kristallisierte Rückstand (86 mg) zur Analyse zweimal aus Methanol umgelöst und anschliessend im Hochvakuum 16 Std. bei 40° getrocknet. Feine Nadeln vom Smp. 116–117°.



Die Analysen wurden im Mikrolaboratorium der *CIBA Aktiengesellschaft* in Basel (Leitung Dr. *H. Gysel*) und in der mikroanalytischen Abteilung des *organisch-chemischen Laboratoriums der ETH*. (Leitung *W. Manser*) ausgeführt.

### Zusammenfassung.

Als Ergänzung zu unserer kürzlich veröffentlichten Arbeit „Ein neuer Weg zur Synthese von 11-Keto-Steroiden“ (l. c.) geben wir in der vorliegenden Mitteilung weitere Resultate bekannt, die in der Androstan- und der Cholestan-Reihe erzielt wurden. Die Endprodukte dieser Versuche sind das 3,11,17-Triketo-androstan (IX) und das 3 $\beta$ -Acetoxy-11-keto-cholestan (XVII).

Forschungslaboratorien der *CIBA Aktiengesellschaft*, Basel, Pharmazeutische Abteilung, und Organisch-chemisches Laboratorium der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

## 38. Isolierung von Vitamin B<sub>12</sub> aus Leberextrakt sowie aus Rückständen der Streptomycinfabrikation.

Versuche mit Vitamin B<sub>12</sub>. III. Mitteilung<sup>1)</sup>

von **O. Schindler** und **T. Reichstein**.

(14. XII. 51.)

Die Isolierung von Vitamin B<sub>12</sub> aus Leber ist von *Rickes* und Mitarb.<sup>2)</sup>, *Smith*<sup>3)</sup>, *Wijmenga* und Mitarb.<sup>4)</sup> und *Ellis* und Mitarb.<sup>5)</sup>, die Isolierung aus Rückständen der Streptomycin-Fabrikation und andern Gärlosungen von *Rickes* und Mitarb.<sup>6)</sup>, *Pierce* und Mitarb.<sup>7)</sup>,

<sup>1)</sup> 2. Mitt.: *O. Schindler*, *Helv.* **34**, 1356 (1951).

<sup>2)</sup> *E. L. Rickes*, *N. G. Brink*, *F. R. Koniuszy*, *Th. R. Wood* & *K. Folkers*, *Science* **107**, 396 (1948).

<sup>3)</sup> *E. L. Smith*, *Nature* **161**, 638 (1948); **162**, 144 (1948); *K. H. Fantes*, *J. E. Page*, *L. F. J. Parker* & *E. L. Smith*, *Proc. Royal Soc. London*, **136**, B, 592 (1949).

<sup>4)</sup> *H. G. Wijmenga*, *J. Lens* & *A. Middlebeek*, *Chem. Weekblad* **45**, 342 (1949).

<sup>5)</sup> *B. Ellis*, *V. Petrow* & *G. F. Snook*, *J. Pharm. Pharmacol.* **1**, 60 (1949).

<sup>6)</sup> *E. L. Rickes*, *N. G. Brink*, *F. R. Koniuszy*, *T. R. Wood* & *K. Folkers*, *Science* **108**, 634 (1948).

<sup>7)</sup> *J. V. Pierce*, *A. C. Page*, *E. L. R. Stokstad* & *T. H. Jukes*, *Am. Soc.* **71**, 2952 (1949).

*Smith* und Mitarb.<sup>1)</sup>, *Jackson* und Mitarb.<sup>2)</sup> und *Fricke* und Mitarb.<sup>3)</sup> beschrieben worden. Im folgenden soll über die Methode berichtet werden, die wir nach entsprechenden Vorversuchen zur Isolierung des kristallisierten Vitamins mit gutem Erfolg benützt haben<sup>4)</sup>.

### Isolierung aus Leber.

Als Ausgangsmaterial diente ein industriell gewonnenes Leberextrakt-Trockenpräparat (62,7 g) aus 500 kg frischer Rinderleber<sup>5)</sup>, das im wesentlichen nach der Methode von *Cohn* und Mitarb.<sup>6)</sup> bereitet worden war. Es enthielt, soweit damals festgestellt werden konnte, etwa 3,3—10  $\gamma$  Vitamin B<sub>12</sub> pro mg (total somit 188 bis 627 mg B<sub>12</sub>)<sup>7)</sup>. Dieses Material wurde zunächst der Einwirkung von Papain, das mit KCN aktiviert war, bei pH 5,5—6,5 unterworfen<sup>8)</sup>, wodurch die Ausbeute an kristallisiertem Vitamin wesentlich erhöht und die Aufarbeitung erleichtert wurde<sup>9)</sup>. Nach 2tägiger Fermentierung bei 40° und 60° wurde mit frisch vorbereitetem Pb(OH)<sub>2</sub> behandelt<sup>6)</sup> und das auf pH 6 angesäuerte Filtrat zur Entfernung von Ballaststoffen gründlich mit Chloroform ausgeschüttelt<sup>10)</sup>. Dann wurde mehrmals mit einem Gemisch von Phenol und Chloroform (1:4)<sup>11)</sup> ausgeschüttelt. Diese Auszüge waren bereits merklich rot gefärbt und enthielten das gesamte B<sub>12</sub>, das sich nach Abdestillieren des Chloroforms im Vakuum und Zusatz von Äther leicht in Wasser übertreiben liess. Zur Vorreinigung wurde die wässrige Lösung mit n-Butanol erschöpfend ausgeschüttelt, wobei butanollösliche Verunreinigungen abgetrennt wurden, während das B<sub>12</sub> im Wasser blieb. Der Eindampfrückstand der wässrigen Lösung wurde aus wenig Methanol mit viel Aceton gefällt, wobei sich die Acetonlösung praktisch frei von B<sub>12</sub> erwies. Das in

<sup>1)</sup> *E. L. Smith, K. H. Fantes & S. Ball*, Amer. Chem. Soc. Meeting, Spring (1950), p. 10 A.

<sup>2)</sup> *W. G. Jackson, G. B. Whitfield, W. H. De Vries, H. A. Nelson & J. S. Evans*, Am. Soc. **73**, 337 (1951).

<sup>3)</sup> *H. H. Fricke, B. Lanius, A. F. De Rose, M. Lapidus & D. F. Frost*, Fed. Proc. **9**, 173 (1950).

<sup>4)</sup> Die Versuche wurden in den Jahren 1948/49 ausgeführt.

<sup>5)</sup> Wir danken der Fa. *N. V. Organon*, Oss, für dieses Material.

<sup>6)</sup> *E. J. Cohn, G. R. Minot, G. A. Alles & W. T. Salter*, J. Biol. Chem. **77**, 325 (1928).

<sup>7)</sup> Nach mikrobiologischen Bestimmungen durch Herrn Dr. *V. Kocher*, Basel. Der Test erlaubte damals keine grössere Genauigkeit.

<sup>8)</sup> Nach Vorschlag der Herren Drs. *J. Lens* und *H. G. Wijmenga*, Oss. Nach späterer Mitteilung von Herrn Dr. *J. Lens* soll KCN allein denselben Zweck erfüllen. Wir haben trotzdem immer Papain mitverwendet.

<sup>9)</sup> Wie heute bekannt, werden verschiedene Vertreter der B<sub>12</sub>-Gruppe durch KCN in Vitamin B<sub>12</sub> (Cyanocobalamin) übergeführt. Da wir KCN bereits anfangs der Isolierung verwendeten, ist es auf Grund dieser Versuche unmöglich, zu sagen, ob das am Schluss isolierte B<sub>12</sub> ursprünglich als solches vorlag oder aus B<sub>12b</sub> etc. entstanden ist.

<sup>10)</sup> Aus dem Chloroform-Extrakt liess sich ein kristallisierter farbloser Stoff vom Smp. 156—158° isolieren, dessen Analysen auf die Formel C<sub>11</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub> passten.

<sup>11)</sup> Verhältnis der Volumteile. Dies gilt für alle folgenden Verhältniszahlen.

Aceton unlösliche Material wurde zur weiteren Reinigung in Methanol gelöst, durch eine mit Methanol bereitete und gut gewaschene Säule von alkalifreiem, aktiviertem  $\text{Al}_2\text{O}_3$  filtriert und so lange mit Methanol, zuletzt unter Zusatz von 20% Wasser, nachgewaschen bis die Eluate nicht mehr rot gefärbt waren. Die roten Filtrate wurden genau neutralisiert und im Vakuum eingedampft. Der Eindampfrückstand wurde in Wasser gelöst und diese wässrige Lösung wiederholt mit Phenol-Chloroform-(1:10) ausgeschüttelt. Die Aufarbeitung der roten Phenol-Chloroform-Lösung geschah gleich wie bei der ersten Phenol-Chloroform-Ausschüttelung und gab einen intensiv rot gefärbten Extrakt (797 mg), der aus Wasser-Aceton 67 mg kristallisiertes Vitamin  $\text{B}_{12}$  lieferte. Aus den Mutterlaugen und Nachbarfraktionen liessen sich nach Wiederholung der Reinigung an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  und Ausschütteln noch insgesamt 63 mg Kristalle gewinnen. Ausbeute: total 130 mg Rohkristalle.

Bei der Filtration durch  $\text{Al}_2\text{O}_3$  blieb ein grosser Teil am  $\text{Al}_2\text{O}_3$  haften, der erst mit Methanol-Wasser unter Zusatz von Essigsäure eluierbar war. Auch aus diesen Anteilen liess sich intensiv rot gefärbtes Material gewinnen, das anscheinend leicht saure Natur besitzt, das bisher aber nicht kristallisiert werden konnte<sup>1)</sup>.

#### Isolierung aus Streptomyces-Rückständen.

Als Ausgangsmaterial dienten zwei verschiedene, aus Rückständen der Streptomycin-Fabrikation gewonnene Präparate<sup>2)</sup>, deren Herstellung von den *Armour Laboratories*, Chicago, und der *Upjohn Company*, Kalamazoo (Michigan), gemeinsam ausgearbeitet wurde. Über die Gewinnung der zwei erhaltenen Konzentrate gab uns Herr Dr. *G. F. Cartland* von der *Upjohn Comp.* die folgende, von Herrn Dr. *W. G. Jackson* stammende, Beschreibung.

Präparat a) (Lot Nr. 78-HAN-13, zweimal je 100 g erhalten). Der Gäransatz (1000 Gallonen = ca. 3780 l) enthielt nach mikrobiologischer Bestimmung an *Lactobacillus lactis Dorner*<sup>3)</sup> insgesamt 1,3 g Vitamin  $\text{B}_{12}$ . Die Mischung wurde filtriert. Das Filtrat enthielt 0,11 g  $\text{B}_{12}$ , es wurde wie früher beschrieben<sup>4)</sup> zur Gewinnung von Streptomycin verwendet. Der Mycelkuchen (enthaltend 1,2 g  $\text{B}_{12}$ ) wurde unter leichtem Druck (10 lbs = ca. 0,7 Atü) mit 410 Gallonen (= ca. 1550 l) Wasser bei 104° gerührt, abgekühlt und filtriert. Das Filtrat enthielt 0,65 g  $\text{B}_{12}$ , es wurde mit NaOH auf pH = 8 gestellt und zur Adsorption des  $\text{B}_{12}$  mit 2% (72 lbs = ca. 32 kg) Darco G-60<sup>5)</sup> gerührt. Das abfiltrierte Kohle-Adsorbat wurde viermal bei 50° mit 50-proz. Aceton eluiert, das mit  $\text{NH}_3$  auf pH = 9,5 gebracht war. Die vereinigten Eluate (52 Gallonen = ca. 196 l) wurden im Vakuum auf 8,5 l eingengt. Dieses Konzentrat wurde filtriert und das Filtrat aus ge-

<sup>1)</sup> Die Verarbeitung dieser Teile wird im exper. Teil daher nicht beschrieben.

<sup>2)</sup> Wir danken den *Armour Laboratories*, Chicago, und insbesondere Herrn Dr. *S. B. Bradshaw* sowie der *Upjohn Comp.*, Kalamazoo, für dieses Material.

<sup>3)</sup> *M. S. Shorb*, *J. Biol. Chem.* **169**, 455 (1947); *J. Bact.* **53**, 669 (1947).

<sup>4)</sup> *M. J. Van der Brook*, *A. N. Wick*, *R. Harris* & *G. F. Cartland*, *J. Biol. Chem.* **165**, 463 (1946).

<sup>5)</sup> Aktivkohle der *Darco Corporation*, New York.

frorcnem Zustand getrocknet (freeze-dried). Erhalten wurden 2,8 kg graubraunes Pulver (Lot Nr. 78-HAN-13) mit 0,29 g B<sub>12</sub>, also ca. 0,18  $\gamma$  pro mg. Wir erhielten zweimal je 100 g davon.

Präparat b) (Lot Res. Nr. 9097-8,10, W-7938, 2 kg erhalten). Die ersten Stufen der Anreicherung dieses Materials geschahen wie bei a), dann wurde noch wie folgt mit Aceton fraktioniert, ähnlich wie bei der Gewinnung von B<sub>12b</sub> beschrieben<sup>1)</sup>. Das wässrige Konzentrat wurde mit der 19fachen Menge Aceton gefällt, die Fällung mit 75-proz. Aceton extrahiert, der Extrakt eingedampft und zum Schluss durch Verstäubung getrocknet (spray-dried). Wir erhielten davon 2 kg mit mikrobiol. (*L. lactis Dorn.*) bestimmtem Gehalt von 2 g B<sub>12</sub>.

Die Behandlung dieser beiden Proben geschah fast gleich wie beim Leberpräparat. Aus dem Chloroform-Extrakt liessen sich auch hier farblose Kristalle vom Smp. 155° isolieren, die zwar praktisch gleiche Analysenwerte gaben, aber nach Mischprobe mit dem analogen Nebenprodukt aus Leber nicht identisch waren. Die Ausbeute an kristallisiertem Vitamin B<sub>12</sub> betrug aus Probe a) 12,5 mg und aus Probe b) 1,8 g<sup>2)</sup>.

Nach Umkristallisieren aus Wasser-Aceton zeigten die aus Leber und aus Streptomyces-Rückständen gewonnenen Kristalle dieselbe Kristallform (siehe Fig. 1; Helv. **34**, 101 (1951)) und dasselbe Absorptionsspektrum (siehe Helv. **34**, 101, 1356 (1951)). Beim Trocknen über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> bei 0,01 Torr bei 100° wurde ein Gewichtsverlust von 12,18% bis 15,21% beobachtet. Die Analysen gaben allerdings niedrigere C-H- und N-Werte als sie von *Brink* und Mitarb.<sup>3)</sup> gefunden wurden. Das Präparat war methoxyfrei, gab aber bei der Methylimid-Bestimmung nach *Herzig & Meyer*<sup>4)</sup> einen Wert von 3,45% N-Methyl.

Über die bei den einzelnen Stufen erzielte Anreicherung gibt die folgende Tab. ungefähren Aufschluss. Die Aktivitäten der einzelnen Stufen sind nicht angegeben, da die Bestimmungen zur Zeit der Isolierungsversuche zu ungenau waren. Aus den Streptomyces-Rückständen ist, wie sich aus der Aktivität des Ausgangsmaterials ergibt, fast die gesamte Menge als kristallisiertes Vitamin erhalten worden<sup>5)</sup>.

Die Aufarbeitung von 2 kg Präparat b) geschah in 4 Portionen, wobei Mutterlaugen und an B<sub>12</sub> angereicherte Fraktionen jeweils bei der nächsten Portion mitverwendet wurden. Aus diesem Grunde ist in der letzten Kolonne der Tab. nur die End-Ausbeute an B<sub>12</sub> angegeben.

<sup>1)</sup> *W. G. Jackson, G. B. Whitfield, W. H. De Vries, H. A. Nelson & J. S. Evans* Am. Soc. **73**, 337 (1951).

<sup>2)</sup> Möglicherweise ist die fast quantitative Ausbeute nur vorgetäuscht. In den Streptomyceinrückständen könnte ein Teil des B<sub>12</sub> in Form von B<sub>12b</sub> oder ähnlichen Derivaten vorliegen, die bei der mikrobiologischen Bestimmung leicht zu tiefe Werte geben. Vgl. *J. M. Cooperman, R. Drucker & B. Tabenkin*, J. Biol. Chem. **191**, 135 (1951); *M. H. Soars & B. Hendlin*, J. of Bacteriol. **62**, 15 (1951).

<sup>3)</sup> *N. G. Brink, D. E. Wolf, E. Kaczka, E. L. Rickes, F. R. Koniuszy, T. R. Wood & K. Folkers*, Am. Soc. **71**, 1854 (1949).

<sup>4)</sup> *J. Herzig & H. Meyer*, B. **27**, 319 (1894).

<sup>5)</sup> Vgl. Fussnote <sup>2)</sup>.

|   | Leberextrakt   |   | Streptomyces-Konzentrat  |   |
|---|--|---|--|---|
|   | 63 g = 0,188<br>bis 0,627 g<br>B <sub>12</sub> <sup>1)</sup> |   | Präparat a<br>110 g =<br>0,011 g B <sub>12</sub> <sup>1)</sup> | Präparat b<br>2000 g =<br>2 g B <sub>12</sub> <sup>1)</sup> |
| 1. Fermentierung mit Papain-KCN . . . . .   |  |   |  |   |
| 2. Reinigung mit Pb(OH) <sub>2</sub> . . . . .  |  |   |  |   |
| 3. Ausschütteln mit Phenol-Chloroform-<br>(1:3) . . . . .   | 28,3   | g | 25   | g   |
| 4. Umfällen aus Methanol mit Aceton . . . . .   | 26,0   | g | 14,4   | g   |
| 5. Ausschütteln mit Phenol-Chloroform-<br>(1:4) . . . . .   | 18,2   | g | 6,7  | g   |
| 6. Filtration durch Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> . . . . .  | 5,67   | g | 0,98   | g   |
| 7. Ausschütteln mit Phenol-Chloroform-<br>(1:10) . . . . .  | 2,06   | g | 0,144  | g   |
| 8. Erste Kristallisation aus Wasser-<br>Aceton . . . . .  | 0,067  | g | 0,012  | g   |
| 9. Zweite und dritte Kristallisation nach<br>nochmaliger Behandlung der Mutter-<br>lauge nach Stufe 5 und 6 . . . . . | 0,063  | g |  |   |
| 10. Totalausbeute an Kristallen . . . . .   | 0,130  | g | 0,012  | g   |
|   |  |   |  | 1,8 g   |

Wir danken der *Haco-Gesellschaft AG.*, Gümligen, für die Unterstützung dieser Arbeit.

## Experimenteller Teil.

### A. Isolierung aus Leberextrakt.

Vorreinigung des Extraktes. 62,7 g Leberextrakt (entsprechend 500 kg frischer Rinderleber), dessen B<sub>12</sub>-Gehalt nach der mikrobiologischen Testierung zwischen 3,3–10  $\gamma$ /mg lag, wurden in 250 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst, mit der Lösung von 2,0 g Papain (1:80, bezogen von der *AG. vorm. B. Siegfried*, Zofingen) und 0,6 g KCN in 30 cm<sup>3</sup> Wasser versetzt und anschliessend das pH durch Zusatz von 2-n. Salzsäure auf 6 gestellt. Zur Fermentierung wurde der Ansatz mit etwas Toluol versetzt und zuerst 24 Std. auf 40° und anschliessend weitere 24 Std. auf 60° erwärmt. Alle 12 Std. wurde das pH kontrolliert und durch tropfenweisen Zusatz von 2-n. Salzsäure auf 6 gehalten. Nach dem Abkühlen auf 20° wurde mit dem frisch aus 70 g Pb(OAc)<sub>2</sub>, 3 H<sub>2</sub>O bereiteten, neutral gewaschenen Bleihydroxyd 15 Min. geschüttelt und anschliessend abfiltriert. Der Niederschlag wurde mit ca. 150 cm<sup>3</sup> warmem Wasser von 40° sorgfältig gewaschen. Das Filtrat reagierte gegen Lackmus schwach alkalisch und lieferte beim Ansäuern mit 2-n. Schwefelsäure bis pH 4 einen feinen Niederschlag, der durch Filtrieren durch eine Schicht Kieselgur (Hyflo Super Cel) abgetrennt wurde.

Ausschütteln der vorgereinigten Lösung. Das klare, deutlich rot gefärbte Filtrat der Bleifällung wurde viermal mit je 50 cm<sup>3</sup> Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroform-Auszüge passierten einen zweiten Scheidetrichter mit ca. 100 cm<sup>3</sup> Wasser und wurden dann über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Nach dem Eindampfen hinterblieben 388 mg Chloroformextrakt (siehe unten).

Die wässrige Lösung wurde nun zweimal mit je 150 cm<sup>3</sup> und viermal mit je 100 cm<sup>3</sup> Phenol-Chloroform-(1:4)-Gemisch<sup>2)</sup> ausgeschüttelt, worauf ihr alle rot gefärbten Anteile entzogen waren. Sie wurde dann verworfen. Die Phenol-Chloroform-Auszüge passierten der Reihe nach dasselbe Waschwasser wie die Chloroformauszüge. Sie wurden dann baldmöglichst im Vakuum bei maximal 20° vom Chloroform befreit.

<sup>1)</sup> Mikrobiolog. bestimmt an *Lactobac. lactis* *Dorner*.

<sup>2)</sup> Verhältnis der Volumteile, dasselbe gilt für spätere Verhältniszahlen.

Die verbleibende Phenollösung wurde sofort mit 1,2 l frisch dest. Äther versetzt und die entstandene trübe Suspension sechsmal mit je 50 cm<sup>3</sup> Wasser ausgeschüttelt, wobei die rote Farbe ins Wasser überging. Die phenolhaltigen Ätherauszüge wurden verworfen. Die wässrigen Auszüge passierten der Reihe nach noch vier weitere Scheidetrichter mit 500 cm<sup>3</sup> Äther, 100 cm<sup>3</sup>, 75 cm<sup>3</sup>, und 50 cm<sup>3</sup> mit wassergesättigtem n-Butanol, in denen sie energisch geschüttelt wurden. Die getrockneten Butanolauszüge hinterliessen beim Eindampfen 3,5 g öliges Material, das nicht weiter untersucht wurde. Die schwach saure, rotbraune, wässrige Lösung wurde im Vakuum bis zum Sirup (28,3 g) eingedampft. Dieser wurde in 70 cm<sup>3</sup> Methanol gelöst und unter Rühren langsam mit 750 cm<sup>3</sup> Aceton versetzt, wobei ein orange gefärbter Niederschlag ausfiel, der mit 250 cm<sup>3</sup> Aceton gewaschen wurde. Die eingedampfte Acetonlösung hinterliess 2,08 g gelbbraunen, schaumigen Rückstand, der sich mikrobiologisch als unwirksam erwies und nicht weiter untersucht wurde. Die in Aceton unlöslichen Teile wurden in 80 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst und das Vitamin B<sub>12</sub> daraus durch siebenmaliges Ausschütteln mit je 50 cm<sup>3</sup> Phenol-Chloroform-(1:5) wieder in die organische Schicht getrieben. Nach dem Abdestillieren des Chloroforms im Vakuum bei 20° wurde die zurückgebliebene Phenol-Lösung sofort mit der siebenfachen Menge Äther verdünnt und die ausgefallenen Substanzen durch Ausschütteln mit Wasser in Lösung gebracht. Die schwach lackmussaure wässrige Lösung hinterliess beim Eindampfen im Vakuum 18,25 g Rückstand. (Im folgenden wird bei Ausschüttelungen mit Phenol-Chloroform-Mischungen die hier beschriebene Art der Rückgewinnung der ausschüttelbaren Anteile als „übliche Aufarbeitung“ bezeichnet.)

Chromatographie. 18,25 g Phenol-Chloroform-(1:5)-lösliches Material wurden in ca. 100 cm<sup>3</sup> Methanol gelöst und durch eine Säule aus 250 g alkalifreiem aktiviertem Aluminiumoxyd<sup>1)</sup>, das vorher mit ca. 1,5 l Methanol gewaschen worden war, filtriert. Durch Nachwaschen mit Methanol, 80-proz. wässrigem Methanol und 80-proz. wässrigem Methanol mit 2% Essigsäure wurden die vier folgenden Fraktionen erhalten:

1. 900 cm<sup>3</sup> farblose Methanol-Eluate hinterliessen nach Neutralisation mit verd. Essigsäure und Eindampfen im Vakuum 0,395 g gelbbraunes Öl (verworfen).

2. 3 l rote Methanol-Eluate hinterliessen nach Neutralisation mit verd. Essigsäure und Eindampfen im Vakuum 1,925 g violettrotes Harz.

3. 1,1 l rote Methanol:Wasser-(4:1)-Eluate hinterliessen nach Neutralisation mit verd. Essigsäure und Eindampfen im Vakuum 3,763 g orangerotes Harz.

4. 500 cm<sup>3</sup> rotbraune Eluate, erhalten mit Methanol-Wasser-(4:1) unter Zusatz von 2% Essigsäure, mit 2-n. NaOH neutralisiert, im Vakuum eingedampft, Rückstand 7,0 g.

Die 2. Fraktion wurde in 100 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst und achtmal mit 100 cm<sup>3</sup> Phenol-Chloroform-(1:10) ausgeschüttelt. Die organische Schicht passierte noch 6 weitere Scheidetrichter mit je 80 cm<sup>3</sup> Wasser. Während der erste Phenol-Chloroform-Auszug den letzten Scheidetrichter farblos verliess, hatten die übrigen 7 Auszüge die roten Substanzen bis auf Spuren aufgenommen. Die übliche Aufarbeitung lieferte 797 mg violettrotes Harz, das zur Kristallisation in 25 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst und mit 160 cm<sup>3</sup> Aceton bis zur beginnenden Trübung versetzt wurde. Nach 3tägigem Stehen bei 0° wurde das auskristallisierte B<sub>12</sub> abgenutscht, mit Aceton gewaschen und trocken gesaugt; Ausbeute 67 mg.

Die 3. Fraktion wurde in 100 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst und in der gleichen Art wie die zweite Fraktion sechsmal mit 100 cm<sup>3</sup> Phenol-Chloroform-(1:10) ausgeschüttelt. Die sechsmal mit je 80 cm<sup>3</sup> Wasser gewaschenen organischen Auszüge lieferten nach der üblichen Aufarbeitung 1,259 g Rückstand. Zur weiteren Anreicherung an B<sub>12</sub> wurden diese in methanolischer Lösung durch eine Säule aus 25 g aktiviertem Aluminiumoxyd filtriert. 500 cm<sup>3</sup> Methanol eluierten dabei 345 mg, die aus 11 cm<sup>3</sup> Wasser und 76 cm<sup>3</sup> Aceton 15 mg kristallisiertes B<sub>12</sub> lieferten. Eine weitere mit 300 cm<sup>3</sup> Methanol-Wasser-(4:1) eluierte Fraktion gab noch 700 mg orangerotes Harz, das aus Wasser-Aceton nicht zur Kristallisation zu bringen war.

<sup>1)</sup> J. v. Eeuw, A. Lardon & T. Reichstein, Helv. 27, 1292 (1944), Fussnote 2); reagiert bei 180°.

Die noch intensiv rot gefärbten Mutterlaugen der zweiten und dritten Fraktion wurden vereinigt (1,172 g) und in methanolischer Lösung durch 35 g Aluminiumoxyd filtriert. Die mit Methanol eluierbaren Anteile wogen 420 mg. Sie wurden in 135 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst und 12mal mit je 30 cm<sup>3</sup> Phenol-Chloroform-(1:10) ausgeschüttelt. Die noch dreimal mit 30 cm<sup>3</sup> und dreimal mit 25 cm<sup>3</sup> Wasser gewaschenen Phenol-Chloroform-Lösungen lieferten nach der üblichen Aufarbeitung 282 mg Rückstand. Zur Kristallisation wurden diese in 10 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst und mit 72 cm<sup>3</sup> Aceton bis zur beginnenden Trübung versetzt. Man liess 36 Std. bei 0° stehen und nutschte dann das auskristallisierte B<sub>12</sub> ab. Nach dem Waschen mit Aceton und Trocknen betrug die aus dieser Fraktion erhaltene Ausbeute 44 mg.

Die eingedampfte rote Mutterlauge (240 mg) wurde in 1 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst, mit 50 cm<sup>3</sup> wässriger, bei 20° gesättigter (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung versetzt und die entstandene Suspension durch eine mit gesättigter (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung bereitete Säule aus 5 g alkali-freiem Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> filtriert. Als Eluierungsmittel dienten wässrige Ammoniumsulfatlösungen fallender Konzentration die vor dem Aufbringen auf die Säule zur Lösung der noch ungelösten, im Kolben haftenden Substanzreste benützt wurden. Während mit den ersten 50 cm<sup>3</sup> gesättigter Ammoniumsulfatlösung keine roten Substanzen eluiert wurden, waren die folgenden mit 100 cm<sup>3</sup> halbgesättigter Lösung erhaltenen Eluate rot. Durch Ausschütteln mit Phenol-Chloroform-(1:5) und übliche Aufarbeitung wurden daraus 170 mg orangerotes Material erhalten, das aber aus Wasser-Aceton keine Kristalle gab. Die restlichen noch auf der Säule verbliebenen roten Anteile wurden mit 60 cm<sup>3</sup> viertelgesättigter Ammoniumsulfatlösung abgelöst. Die rote Substanz wurde der Lösung durch Ausschütteln mit Phenol-Chloroform-(1:4) entzogen. Übliche Aufarbeitung gab 25 mg rotes Material, das in 0,75 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst und mit Aceton bis zur Trübung versetzt wurde. Es kristallisierten dann noch 4 mg B<sub>12</sub> aus.

Die 130 mg Rohkristalle gaben nach zweimaligem Umkristallisieren aus Wasser-Aceton 107 mg analysenreines, lufttrockenes Material.

#### B. Isolierung aus einem Extrakt von Streptomyces-Rückständen.

Fermentierung und Vorreinigung des rohen Extraktes. 110 g Präparat a, (siehe oben), das nach der mikrobiologischen Testierung total 11 mg Vitamin B<sub>12</sub> enthielt, wurden in 300 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst. Die gegen Lackmus alkalische, gegen Phenolphthalein neutrale Lösung wurde mit 2-n. Schwefelsäure auf pH 6 gestellt und dann die mit 900 mg KCN aktivierte, trübe Lösung von 2,8 g Papain (1:80, bezogen von der *AG. vorm. B. Siegfried*, Zofingen) in 30 cm<sup>3</sup> Wasser zugegeben. Da das pH dabei gegen den Neutralpunkt stieg, wurde es durch tropfenweisen Zusatz von verdünnter Schwefelsäure wieder auf 6 zurückgestellt. Zur Fermentierung wurde der Ansatz zuerst 24 Std. auf 40° und nachher 16 Std. auf 60° erwärmt, wobei das pH unverändert blieb. Die abgekühlte Lösung wurde mit dem frisch bereiteten Bleihydroxyd aus 60 g Bleidiacetat-trihydrat 1 ½ Std. auf der Maschine geschüttelt und anschliessend durch ein mit gewaschenem Kieselgur (Hyflo Super Cel) gedichtetes Filter genutscht. Das Filtrat reagierte gegen Lackmus alkalisch, gegen Phenolphthalein neutral. Nach Einstellen des pH auf 4 mit verdünnter Schwefelsäure entstand eine leichte Trübung, von der durch Filtrieren durch ein mit Kieselgur (Hyflo Super Cel) gedichtetes Filter getrennt wurde.

Ausschütteln von B<sub>12</sub> aus vorgereinigter wässriger Lösung. Die klare saure Lösung wurde sechsmal mit je 70 cm<sup>3</sup> Chloroform ausgeschüttelt. Die mit wenig Wasser gewaschenen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrockneten Chloroform-Auszüge hinterliessen 3,0 g rotbraunes Öl. Aus Aceton wurden daraus 500 mg farblose Blättchen vom Smp. 155–157° erhalten (siehe unten).

Die mit Chloroform extrahierte wässrige Phase wurde fünfmal mit je 120 cm<sup>3</sup> Phenol-Chloroform-(3:5) ausgeschüttelt. Wegen Emulsionsbildung war es dabei nötig, nach jedem Schütteln die gesamte Lösung zu zentrifugieren. Die Phenol-Chloroform-Auszüge wurden mit dem Waschwasser des Chloroforms gewaschen und durch ein Faltenfilter filtriert. Das Chloroform wurde im Vakuum bei 40–50° Badtemperatur abdestilliert

und das zurückgebliebene Phenol im Scheidetrichter baldmöglichst mit 1,5 l Äther versetzt, wobei eine reichliche Menge dunkelbraunes Harz ausfiel. Beim Durchschütteln mit 50–80 cm<sup>3</sup> Wasser ging die Hauptmenge des Niederschlages wieder in Lösung. Die wässrige Phase passierte dann einen zweiten Scheidetrichter mit 200 cm<sup>3</sup> Äther. Sie enthielt dann noch ein braunes, flockiges Produkt, von dem durch ein Faltenfilter abgetrennt wurde. Das klare Filtrat wurde anschliessend noch viermal mit je 100 cm<sup>3</sup> mit Wasser gesättigtem n-Butanol ausgezogen. Äther und Butanol wurden der Reihe nach noch sechsmal mit je 50 cm<sup>3</sup> Wasser ausgeschüttelt. Die ausgeschüttelten phenolhaltigen Ätherlösungen wurden verworfen; die Butanolauszüge hinterliessen nach dem Eindampfen im Vakuum 4,4 g braunes Öl, das nicht weiter untersucht wurde. Die vereinigten wässrigen Lösungen reagierten gegen Lackmus schwach sauer und wurden im Vakuum bei 40–50° Badtemperatur zum dicken Sirup (25 g) eingedampft. Dieser wurde einmal mit 100 cm<sup>3</sup> und zweimal mit 50 cm<sup>3</sup> Methanol kurz aufgekocht und das Ungelöste nach dem Abkühlen abgenutscht (4,4 g). Die zuerst klaren methanolischen Filtrate schieden beim Stehen wenig grauen Schlamm ab, der durch ein mit gewaschenem Kieselgur (Hyflo Super Cel) gedichtetes Filter abgenutscht wurde. Die rotbraune methanolische Lösung wurde im Vakuum eingedampft. Der Rückstand (17,65 g) wurde in 20 cm<sup>3</sup> Methanol gelöst und in dünnem Strahle 200 cm<sup>3</sup> Aceton zufließen gelassen. Der dabei ausgefallene Niederschlag wurde nach dem Abdekantieren der überstehenden klaren Lösung mit 100 cm<sup>3</sup> Aceton gewaschen und wog nach dem Trocknen 14,45 g. Die Acetonlösung hinterliess nach dem Eindampfen im Vakuum 4,3 g Rückstand (verworfen).

Die deutlich rötlich gefärbte, in Aceton unlösliche Fällung wurde in 40 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst und diese Lösung sechsmal mit je 15 cm<sup>3</sup> Phenol-Chloroform-(1,5:8,5) ausgeschüttelt. Die organische Schicht passierte noch 2 weitere Scheidetrichter mit je 12 cm<sup>3</sup> Wasser. Die in den wässrigen Phasen verbliebenen 7,1 g Material wurden verworfen. Die Phenol-Chloroform-Lösungen gaben nach üblicher Aufarbeitung 6,7 g orangefarbenes Material.

Chromatographie. Die genannten 6,7 g mit Phenol-Chloroform-(1,5:8,5) ausgeschütteltes Material wurden wie folgt an Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> chromatographiert: 135 g aktiviertes alkalifreies Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> wurden in Methanol aufgeschwemmt und ins Rohr eingefüllt (Höhe der Säule 11,1 cm; Durchmesser 4,0 cm) und mit 1 l Methanol gewaschen. Dann wurde die Substanz in methanolischer Lösung auf die Säule gegeben und mit Methanol eluiert. Unter einer braunen Zone entwickelte sich ein rotviolettes Band, das mit Methanol langsam heruntergewaschen wurde. Sobald die Eluate rot abzutropfen begannen (nach 700 cm<sup>3</sup>) wurde die Vorlage gewechselt. Die ersten 700 cm<sup>3</sup> gaben nach Einstellen des pH auf 5–6 mit verd. Essigsäure und Eindampfen im Vakuum 670 mg braunes Öl. Es folgten 1,5 l rote Methanol-Eluate, die analog behandelt 200 mg rotes Material hinterliessen. Anschliessend wurden die restlichen auf der Säule gebliebenen roten Anteile mit 500 cm<sup>3</sup> Methanol-Wasser-(80:20) abgelöst. Eindampfen dieser neutralen, orange gefärbten Methanol-Wasser-Eluate im Vakuum gab noch 780 mg rotes Material. Durch Nachwaschen der Säule mit 500 cm<sup>3</sup> Wasser wurden noch 2,13 g eines bräunlich gefärbten Produktes abgelöst.

Aufarbeitung der roten Eluate. Die intensiv rot gefärbten Methanol- und Methanol-Wasser-Eluate wurden vereinigt (980 mg), in 30 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst und sechsmal mit je 30 cm<sup>3</sup> Phenol-Chloroform-(1:9) ausgeschüttelt. Die organischen Lösungen passierten noch 3 Scheidetrichter mit je 20 cm<sup>3</sup> und 3 Scheidetrichter mit je 15 cm<sup>3</sup> Wasser. Die erste Ausschüttelung verliess den letzten Scheidetrichter gelbbraun gefärbt und wurde gesondert aufgefangen und verworfen. Die nächsten 5 Ausschüttelungen, die die gesamte rote Farbe enthielten, wurden vereinigt und im Vakuum vom Chloroform befreit. Die übliche Aufarbeitung gab 144 mg rotviolettes Harz, das zur Kristallisation in 3 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst und mit 25 cm<sup>3</sup> Aceton versetzt wurde. Ein dabei ausfallendes farbloses, amorphes Produkt wurde auszentrifugiert, wobei wenig rote Substanz mitgerissen wurde. In der abgegossenen klaren Lösung begann nach Impfen mit Vitamin B<sub>12</sub> aus Leber sofort die Kristallisation in roten, zu Büscheln angeordneten Prismen. Sie wurde durch 16stündiges Stehen im Exsiccator über CaCl<sub>2</sub> und etwas Aceton beendet. Die nur noch leicht orangefarbene Lösung wurde abgegossen und die Kristalle mit Aceton nachgewaschen.



Ausbeute 12,5 mg B<sub>12</sub>. Die analog durchgeführte Aufarbeitung von 2 kg Präparat b (siehe oben) mit einem mikrobiologisch bestimmten Gehalt von insgesamt 2 g Vitamin B<sub>12</sub> gab insgesamt 2,675 g rohe Kristalle und daraus 1,80 g analysenreines Material.

Zur Analyse wurde eine zweimal aus Wasser-Aceton umkristallisierte und an der Luft ohne Vakuum vorgetrocknete Probe aus Leber 3 Std. bei 100° und 0,01 Torr über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet.

|  |  |
|--|--|
| 3,584 mg Subst. gaben 0,545 mg Gewichtsverlust = 15,21%  |  |
| 3,039 mg Subst. gaben 1,82 mg H <sub>2</sub> O, 6,02 mg CO <sub>2</sub> und 0,400 mg Rückstand (S. W.)                           |  |
| 2,355 mg Subst. gaben 0,282 cm <sup>3</sup> N <sub>2</sub> (740 mm, 17°) (S. W.)   |  |
| 4,541 mg Subst. verbrauchten 0,02 cm <sup>3</sup> 0,02-n. Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (Zeisel-Vieböck) (S. W.) |  |
| 3,860 mg Subst. verbr. 2,66 cm <sup>3</sup> 0,02-n. Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (Herzig-Meyer) (S. W.)         |  |
| 3,300 mg Subst. gaben 5,99 mg (NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , 12 MoO <sub>3</sub> (S. W.)                      |  |
| 1,893 mg Subst. gaben 3,63 mg (NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , 12 MoO <sub>3</sub> (S. W.)                      |  |
| C <sub>63</sub> H <sub>90</sub> O <sub>13</sub> N <sub>14</sub> PCo <sup>1)</sup>  | Ber. C 56,40 H 6,76 N 14,62 P 2,31%        |
| (1341,32)  | Gef. „ 54,05 „ 6,70 „ 13,72 „ 2,64 (2,79)% |
|  | N-Methyl 3,45; Methoxyl 0%                 |

Zur Analyse wurde eine zweimal aus Wasser-Aceton umkristallisierte und an der Luft ohne Vakuum vorgetrocknete Probe des Extraktes a aus Streptomyces-Rückständen 9 Std. bei 100° und 0,01 Torr über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

|   |  |
|---|--|
| 3,250 mg Subst. gaben 0,396 mg Gewichtsverlust = 12,18%   |  |
| 2,854 mg Subst. gaben 5,72 mg CO <sub>2</sub> , 1,66 mg H <sub>2</sub> O und 0,333 mg Rückstand (S. W.)                                       |  |
| 3,675 mg Subst. verbr. 0,46 cm <sup>3</sup> 0,02-n. Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (Zeisel-Vieböck) und                        |  |
| 2,04 cm <sup>3</sup> 0,02-n. Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (Herzig-Meyer) (S. W.)   |  |
| 0,107 (0,100) mg lufttrockene Subst. gaben nach feuchter Veraschung und kolorimetrischer Bestimmung <sup>2)</sup> des Co 3,8 (3,7) ± 0,5 γ Co |  |
| C <sub>65</sub> H <sub>90</sub> O <sub>13</sub> N <sub>14</sub> PCo <sup>1)</sup>   | Ber. C 56,40 H 6,76 Co 4,39%             |
| (1341,32)   | Gef. „ 54,69 „ 6,51 „ 4,2% <sup>3)</sup> |
|   | N-Methyl 2,77; Methoxyl 1,75%            |

#### Untersuchung der Chloroformextrakte.

A. *Leberextrakt*. Die beschriebenen 388 mg Chloroformextrakt gaben aus Aceton, dann aus Essigester 18 mg farblose Blättchen vom Smp. 156—159°, die sich bei 0,01 Torr und 120° (Badtemperatur) im Molekularkolben unzersetzt sublimieren liessen.

Zur Analyse wurde 24 Std. bei 20° und 0,01 Torr über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet; kein Gewichtsverlust.

|   |                              |
|---|------------------------------|
| 4,095 mg Subst. gaben 9,392 mg CO <sub>2</sub> und 3,048 mg H <sub>2</sub> O (A.P.) |                              |
| 3,026 mg Subst. gaben 0,375 cm <sup>3</sup> N <sub>2</sub> (20°; 732 Torr) (A.P.)   |                              |
| C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub> N <sub>2</sub>                       | Ber. C 62,83 H 8,63 N 13,33% |
| (210,27)  | Gef. „ 62,59 „ 8,33 „ 13,91% |

B. *Extrakt aus Streptomyces-Rückständen*. Das zunächst ölige Material (3,0 g) erstarrte nach einigen Tagen kristallin. Es wurde mit Aceton bei –15° angerieben, die Kristalle abgenutscht und mit Aceton von –15° nachgewaschen. Die Kristalle wurden im Molekularkolben bei 115—125° (Badtemperatur) und 0,01 Torr sublimiert. Das Destillat (560 mg) wurde noch zweimal aus Aceton umkristallisiert, wobei der Smp. auf 154—156° stieg; Mischprobe mit entsprechender Fraktion aus Leberextrakt 130—140°.

<sup>1)</sup> N. G. Brink, D. E. Wolf, E. Kaczka, E. L. Rickes, F. R. Koniuszy, T. R. Wood & K. Folkers, Am. Soc. **71**, 1854 (1949).

<sup>2)</sup> K. J. McNaught, Analyst **67**, 97 (1942).

<sup>3)</sup> Auf wasserfreies Material berechnet.

Probe auf Schwefel und Halogen negativ; *Lassaigne*-Probe auf N positiv.  $[\alpha]_D^{17} = -175,4^{\circ} \pm 1,5^{\circ}$  ( $c = 1,4650$  in Chloroform)<sup>1)</sup>.

14,855 mg Subst. zu 1,0140 cm<sup>3</sup>;  $l = 1$  dm;  $\alpha_D^{17} = -2,57^{\circ} \pm 0,02^{\circ}$

Zur Analyse wurde 24 Std. bei 20° und 0,01 Torr über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet; Gewichtsverlust 0,33%.

4,172 mg Subst. gaben 9,567 mg CO<sub>2</sub> und 3,195 mg H<sub>2</sub>O (*A.P.*)

2,892 mg Subst. gaben 0,343 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (19°; 737 Torr) (*A.P.*)

|   |               |         |           |
|---|---------------|---------|-----------|
| C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub> N <sub>2</sub> | Ber. C 62,83  | H 8,63  | N 13,33%  |
| (210,27)  | Gef. ,, 62,58 | ,, 8,57 | ,, 13,44% |

Die Mikroanalysen wurden teils bei Frau Dr. *M. Sobotka* und Herrn Dr. *E. Wiesenberg*, Graz (*S.W.*), teils bei Herrn *A. Peisker*, Brugg (*A.P.*), ausgeführt.

### Zusammenfassung.

Es wird eine Isolierungsmethode für Vitamin B<sub>12</sub> aus einem Leberextrakt-Trockenpräparat und aus einem Konzentrat aus Nebenprodukten der Streptomycinfabrikation beschrieben. Die wesentlichen Extraktionsstufen zur Gewinnung des Vitamins bestehen im Ausschütteln aus wässriger Lösung mit Phenol-Chloroform-Mischungen verschiedener Konzentration und in der Adsorption aus Methanolischer Lösung an Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Pharmazeutische Anstalt und Organisch-chemische Anstalt  
der Universität Basel.

## 39. Triphenylmethanfarbstoffe aus Thiodiphenylamin und Phenoxazin

von **R. Wizinger** und **S. Chatterjee**.

(14. XII. 51.)

Am 18. Dezember 1883 wurde der Badischen Anilin- und Soda-Fabrik ein Patent<sup>2)</sup> erteilt, welches in der Geschichte der Farbenchemie einen bedeutenden Platz einnimmt. Es handelt sich um ein Verfahren „zur Darstellung von Farbstoffen der Rosanilinreihe durch Condensation von tertiären alkylierten Amidoderivaten des Benzophenons mit sekundären und tertiären aromatischen Aminen“. Erfinder waren *A. Kern* und *H. Caro*. Nach diesem Verfahren werden heute noch die klassisch gewordenen Triphenylmethanfarbstoffe Kristallviolett, Nachtblau und verschiedene Viktoriablaumarken fabriziert. In der Patentschrift wird u. a. auch erwähnt, dass bei der

<sup>1)</sup> Das Lactam des L-Leucyl-L-prolins (*E. Fischer & G. Reif*, *A.* **363**, 126 (1908)) zeigt Smp. 160°;  $[\alpha]_D^{20} = -143,4^{\circ}$  (in Alkohol).

<sup>2)</sup> D.R.P. 27789; Frdl. I, 80.