

Es sei abschliessend erwähnt, dass nach weiteren Versuchen das flüchtige Bromoxyd BrO_2 von *Zintl & Rienäcker*¹⁾, das in NaOBr -Lösungen vorkommen soll, mit der Bildung von N_2O aus Ammoniak nichts zu tun haben dürfte.

Bei keiner der voranstehend beschriebenen Oxydationen konnte die Bildung anderer Stickoxyde als N_2O mit Sicherheit beobachtet werden.

Zusammenfassung.

Es wird gezeigt, dass entgegen der in der Literatur vertretenen Ansicht Ammoniumsalze durch Hypobromitlösungen nicht zu reinem Stickstoff oxydiert werden. Das entwickelte Gas enthält vielmehr 1,5 bis 3% N_2O . Bei Zugabe von Nitriten steigt die N_2O -Menge auf ein Mehrfaches an, während Zusätze von Nitrat-, Azid- und Hydrazinium-Ionen unwirksam sind. Analoge Verhältnisse findet man bei der Oxydation von Ammoniumsalzen mit Hypochloritlösungen.

Physikalisch-chemisches Institut der Universität Zürich.

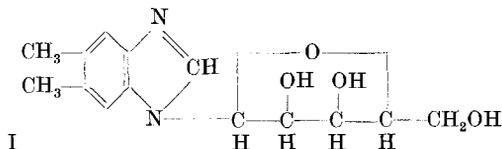
10. Beitrag zur Kenntnis des Vitamins B_{12} .

1. Mitteilung

von **H. Schmid, A. Ebnöther** und **P. Karrer**.

(22. XI. 52.)

Die bisher aus Vitamin B_{12} isolierten kleineren Spaltprodukte sind 1- α -D-Ribofuranosido-5,6-dimethylbenzimidazol (I)²⁾ und ein Phosphorsäureester dieser Substanz (II)³⁾, ferner β -Amino-propanol III⁴⁾ sowie Cyanwasserstoffsäure (IV)⁵⁾. Alle diese Substanzen wurden nach der Hydrolyse des Vitamins B_{12} mittels Säuren erhalten, IV auch nach Oxydation der Verbindung mit KMnO_4 in schwefelsaurer Lösung.



¹⁾ *E. Zintl & G. Rienäcker*, B. **63**, 1098 (1930).

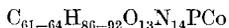
²⁾ *Folkers* u. Mitarbeiter, Am. Soc. **72**, 1866, 3084, 4442 (1950); Am. Soc. **71**, 2951 (1949). *J. Pharm. Pharmacol.* **1**, 734 (1949), *ibid.* **1**, 957 (1949). — *Todd et al.*, Soc. **1950**, 2845.

³⁾ *Todd et al.*, Soc. **1950**, 2845.

⁴⁾ *Folkers et al.*, Am. Soc. **72**, 2820 (1950). — *E. Chargaff, C. Levine, Ch. Green & J. Kream*, Exper. **6**, 229 (1950).

⁵⁾ *Folkers et al.*, Science **112**, 354 (1950).

Vitamin B₁₂ wird die ungefähre Bruttoformel



(Mol.-Gew. 1490 \pm 150) zuerteilt. In den vorgenannten Spaltstücken sind, wenn β -Amino-propanol zweimal in der Vitamin-B₁₂-Molekel vorkommt¹⁾, nur 21 C- neben 5 N-Atomen erfasst. Es ist daher offensichtlich, dass noch der grösste Teil des Kohlenstoff-Gerüsts der Aufklärung harrt.

Bei der katalytischen Hydrierung wässriger Lösungen von B₁₂ mit PtO₂ (760 mm, 24^h) nehmen diese braune Farbe an²⁾, färben sich aber nach Zutritt von Luft wieder rot²⁾. Aus solchen Lösungen wurde Vitamin B_{12a} isoliert²⁾, das an Stelle des Cyanwasserstoffrestes wahrscheinlich eine Hydroxylgruppe enthält.

Wir haben Versuche unternommen, Vitamin B₁₂ in n. Salzsäure, teils bei Zimmertemperatur, teils bei 100° mit PtO₂ als Katalysator zu hydrieren. Der gereinigte Wasserstoff wurde über die stark gerührte Lösung des Vitamins geleitet. Wie bei der Hydrierung in Wasser, so verschwindet auch bei jener in Salzsäure die rote Farbe nach einiger Zeit, die Lösung wird bräunlich, die rote Farbe kehrt aber nach Zutritt der Luft nicht mehr zurück. Daraus ist zu ersehen, dass hier ein tieferer Eingriff in die B₁₂-Molekel erfolgt ist als bei katalytischer Reduktion der Substanz in Wasser.

Machte man die in der Hitze 2 Std. reduzierte salzsaure Lösung der Verbindung mit Borax alkalisch und destillierte ab, so liessen sich im Destillat im Mittel 5 Mol NH₃ titrimetrisch bestimmen oder als NH₄Cl isolieren (5,0 Mol bzw. 5,4 Mol bzw. 4,8 Mol, bezogen auf ein Mol.-Gew. von 1500 für B₁₂). Dem Ammoniak waren kleine Mengen Methylamin beigemischt.

In anderen Versuchen haben wir B₁₂ in einem Gemisch von verd. Salzsäure und Butanol 2 Std. gekocht. Nachher wurden Butanol- und wässrige Phase getrennt. In letzterer liessen sich 4,3 Mol NH₃ sowie β -Amino-propanol nachweisen. Der Rückstand des Butanol-extraktes, nochmals in n. Salzsäure mit PtO₂ und Wasserstoff in der Siedehitze hydriert (2 Std.), lieferte weitere 2,2 Mol Ammoniak und sehr wenig Methylamin. Beide Verbindungen wurden als Hydrochloride isoliert und identifiziert. Das Methylamin stammt, wie besondere Versuche mit Vitamin B_{12a} zeigten, sehr wahrscheinlich aus der Reduktion der im B₁₂ vorhandenen Cyanwasserstoffsäure, da es bei der Reduktion von B_{12a} nicht auftrat.

Aus diesen Versuchen ergibt sich, dass unter den angegebenen Reaktionsbedingungen 5–6 Mol NH₃ aus B₁₂ freigesetzt werden können. Ob NH₃ als solches am Aufbau des Cobaltkomplexes teil hat oder während der in Säure ausgeführten Hydrierung hydro-

¹⁾ *Chargaff et al.*, *Exper.* **6**, 229 (1950).

²⁾ *Folkers et al.*, *Am. Soc.* **71**, 1514 (1949). — *Science* **112**, 354 (1950).

lytisch abgespalten wird (z. B. aus Amidbindungen), ist noch unentschieden. Zu den 5 früher in Spaltstücken von B₁₂ nachgewiesenen Stickstoffatomen (2 im Dimethyl-benzimidazol, 2 (?) im Amino-propanol und 1 in HCN) kommen jetzt 5 bis 6 weitere, die als NH₃ freigesetzt werden können.

Um festzustellen, ob unter den beschriebenen Reduktionsbedingungen auch aus anderen Kobalt-Koordinationsverbindungen Ammoniak und ähnliche Basen abgespalten werden, haben wir eine Reihe solcher Komplexsalze derselben Behandlung unterworfen¹⁾. Es zeigte sich, dass sich bei manchen dieser Salze der reduktive Aufschluss schon bei Zimmertemperatur abspielt, in anderen Fällen erst beim Erwärmen. Einige Salze werden allerdings schon durch Kochen mit Salzsäure allein (ohne gleichzeitige katalytische Hydrierung) zersetzt. Die Möglichkeit des reduktiven Aufschlusses von Komplexsalzen des dreiwertigen Kobalts dürfte darauf beruhen, dass diese im allgemeinen stabiler sind als jene, die sich vom zweiwertigen Kobalt ableiten²⁾.

Die als Modelle verwendeten und reduktiv aufgespaltenen Kobaltkomplexsalze waren folgende³⁾:

[Co(NH ₃) ₆ Cl ₃] ⁴⁾	Freigesetztes NH ₃ , bestimmt nach <i>Kjeldahl</i> : 68% d. Th.
[Co en ₃]Br ₃ ⁴⁾	Freigesetztes en, isoliert als Dipikrat (Smp. 233°): 96% d. Th.
$\left[\begin{array}{c} \text{NO}_2 \\ \text{Co} \\ (\text{NH}_3)_5 \end{array} \right] \text{Cl}_2$ ⁴⁾	Freigesetztes NH ₃ , bestimmt nach <i>Kjeldahl</i> , 69% d. Th.
$\left[\begin{array}{c} \text{Cl}_2 \\ \text{Co} \\ 1\text{-pn}_2 \end{array} \right] \text{Cl, HCl}$ ⁴⁾	Freigesetztes 1-pn, isoliert als Pikrat (Smp. 237°): 83% d. Th.
$\left[\begin{array}{c} \text{CO}_3 \\ \text{Co} \\ (\text{NH}_3)_5 \end{array} \right] \text{NO}_3$ ⁵⁾	Freigesetztes NH ₃ , isoliert als NH ₄ Cl: 79% d. Th.
[Co(C ₂ O ₄) ₃]K ₃ , 3 H ₂ O ⁴⁾	Freigesetzte Oxalsäure, bestimmt als Calciumoxalat: 96% d. Th.
$\left[\begin{array}{c} \text{Py} \\ \text{Co} \\ \text{en}_2\text{Cl} \end{array} \right] \text{Cl}_2$ ⁴⁾	Freigesetztes en, isoliert als Dipikrat (Smp. 233°): 95% d. Th.
$\left[\begin{array}{c} (\text{NO}_2)_2 \\ \text{Co} \\ (\text{NH}_3)_4 \end{array} \right] \text{Cl}$ ⁴⁾	Freigesetztes NH ₃ , bestimmt nach <i>Kjeldahl</i> : 83% d. Th.

¹⁾ Diese Versuche wurden von Frl. *E. Sproge* ausgeführt.

²⁾ *G. Schwarzenbach* (Helv. **32**, 839 (1949)) hat einige Co^{III}-Komplexsalze mittels Wasserstoff und Palladium-Kohle hydriert, aber unter Bedingungen, die nicht zum Zerfall des Komplexes führten.

³⁾ Die Reduktionen wurden in 2-proz. reiner Salzsäure mit reinstem Wasserstoff und 20–30% PtO₂-Katalysator (berechnet auf angewandte Substanz) unter kräftigem Rühren ausgeführt. Reaktionsdauer ca. 2½ Std. Temperatur: Zimmertemperatur oder 70–80°.

⁴⁾ Reduktive Aufspaltung bei Zimmertemperatur.

⁵⁾ Reduktive Aufspaltung bei 70°.

Bei der katalytischen Hydrierung des Vitamins B_{12} in kochender n. Salzsäure wird auch etwas Kobalt als $CoCl_2$ freigesetzt. Es bleibt aber der grössere Teil des Kobalts komplex gebunden in einem amorphen, braunen Rückstand, der in Äthanol und Butanol löslich ist.

Wir untersuchten hierauf die Einwirkung von Chlor auf Vitamin B_{12} . Dieses, sowie B_{12}^a werden durch Zusatz einer Chlorlösung in Chloroform sehr schnell entfärbt, wobei eine violette Zwischenstufe durchschritten wird. Mit Brom, Jod sowie verschiedenen Säurechloriden und Anhydriden gelangen ähnliche Reaktionen nicht. Unter Einhaltung bestimmter Bedingungen, die im experimentellen Teil beschrieben sind, liess sich aus B_{12} das violette Reaktionsprodukt in chromatographisch einheitlicher, mikrokristalliner Form fassen. Sein UV.-Spektrum zeigt Absorptionsmaxima bei $585\text{ m}\mu$, und bei $555\text{ m}\mu$ (vgl. Fig. 1). Die Analyse ergab einen Chlorgehalt von $3,8\%$. Versetzt man die violette, wässrige Lösung dieses „chlorierten B_{12} “ mit überschüssigem Kaliumcyanid, so schlägt die Farbe nach intensiv blau um (Absorptionsspektrum Fig. 1)¹⁾.

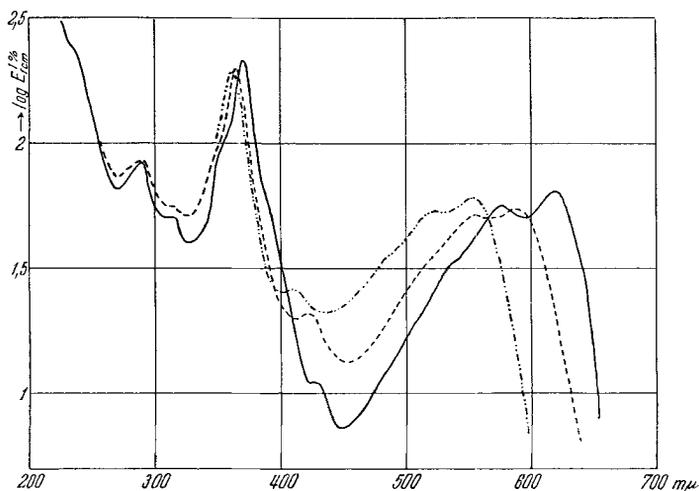


Fig. 1.

- B₁₂ in Phosphatpuffer 7,07.
- B₁₂ chloriert, in Phosphatpuffer 7,07.
- Gleiche Lösung wie oben und einige Kriställchen KCN.

Da die Hauptmenge der noch unbekanntten Bausteine des Vitamins B_{12} in dem von Phosphorsäure, β -Aminopropanol und 5,6-Dimethyl-1- α -D-ribosyl-benzimidazol befreiten Hydrolysenprodukt enthalten sein müssen, wurden weitere Untersuchungen diesem Pro-

¹⁾ Vgl. dazu die Verschiebung der Absorptionsmaxima beim Übergang von Vitamin B_{12} in Dicyanocobalamin. *G. O. Rudkin, & R. J. Taylor, Anal. Chem.* **24**, 1155 (1952). — *E. L. Smith, S. Ball & D. N. Ireland, Biochem. J.* **52**, 395 (1952).

dukt gewidmet. Dessen Darstellung erfolgte entsprechend den Angaben von *J. G. Buchanan, A. W. Johnson, J. A. Mills & A. K. Todd*¹⁾ durch Verkochen von B_{12} mit Butanol-Salzsäure. Das Hydrolysenprodukt wird im folgenden als HB_{12} bezeichnet.

HB_{12} ist ein Säuregemisch, das Kobalt sehr fest komplex gebunden enthält. Wir versuchten es mit Methanol und HCl zu verestern und das entstandene Estergemisch chromatographisch zu trennen (Adsorptionsmittel $BaSO_4$ und Aluminiumoxyd)²⁾. Wie im experimentellen Teil beschrieben wird, liessen sich zahlreiche Fraktionen chromatographisch abtrennen, aber keine zeigte Neigung zur Kristallisation. Das einzig sichere Ergebnis dieser Versuche ist daher die Erkenntnis, dass HB_{12} uneinheitlich ist und durch Veresterung ein Gemisch verschiedener Ester liefert.

Interessanter waren die Ergebnisse des Abbaus von HB_{12} mit Kaliumpermanganat. Das sorgfältig von Butanol befreite Hydrolysenprodukt HB_{12} aus 1,0 g Vitamin B_{12} hat man in schwach sodalkalischer Lösung mit 5-proz. wässriger Kaliumpermanganatlösung zuerst bei 20° und dann bei 50–55° bis zur Stabilisation oxydiert, wozu 58 ml Permanganatlösung benötigt wurden. Nach der Aufarbeitung erhielt man ein Säuregemisch, das man in eine wasserdampf-flüchtige und in eine nicht flüchtige Fraktion zerlegte.

In der ersteren waren Essigsäure und n-Buttersäure enthalten. Die beiden Säuren hat man papierchromatographisch, die n. Buttersäure zudem als kristallisiertes p-Toluidid durch Smp. und Misch-Smp. identifiziert. n. Buttersäure stellt aber kein natives Abbauprodukt dar; sie entstammt den im HB_{12} -Produkt vorliegenden n-Butylestergruppierungen.

Aus der mit Wasserdampf nicht flüchtigen Säurefraktion haben wir bisher 8 Säuren in kristallisierter, papierchromatographisch einheitlicher Form isolieren können. Da wir bisher nur relativ wenig Vitamin B_{12} für den oxydativen Abbau einsetzen konnten, waren die Mengen der isolierten Säuren klein und einige sind aus diesem Grunde konstitutionell noch nicht aufgeklärt. Die nachfolgenden Säuren wurden durch Äquivalentgewichtsbestimmungen, durch Papierchromatographie in verschiedenen Lösungsmitteln sowie durch Smp. und Misch-Smp. eindeutig identifiziert: Oxalsäure, Bernsteinsäure, Methylbernsteinsäure und Dimethylmalonsäure. Dimethylmalonsäure hat man decarboxyliert, wonach sich Isobuttersäure papierchromatographisch nachweisen liess.

Die nachfolgenden Säuren konnten ihrer geringen Mengen wegen bisher noch nicht identifiziert werden:

¹⁾ Soc. 1950, 2845.

²⁾ Das Estergemisch zersetzt sich beim Chromatographieren an Cellulosepulver (Lösungsmittel Butanol oder Hexanol), an $CaSO_4$ und teilweise an Al_2O_3 .

- Säure A: Monocarbonsäure, Smp. 140—143°. Äqu.-Gew. 221; $pK = 4,7^1$; $RF = 0,70^2$).
- Säure B: Dicarbonsäure, Smp. 152—154°. Äqu.-Gew. 78; $pK_1 = 3,6$; $pK_2 = 6,2^1$; $RF = 0,65$. Diese Säure bildet bei der Destillation bei 130° (Luftbadtemperatur) unter 0,03 mm Druck vermutlich ein Anhydrid.
- Säure C: Dicarbonsäure, Smp. 104—105°. Äqu.-Gew. ca. 125—130; $pK_1 = 3,4$ und $pK_2 = 6,4^3$; $RF = 0,21$.
- Säure D: Smp. 145—147° (Zersetzung); $RF = 0,30$. Die Säure stellt wahrscheinlich eine substituierte Malonsäure dar.

Das erste Ergebnis der oxydativen Abbau-Versuche der Vitamin B₁₂-Fraktion HB₁₂ besteht somit darin, dass bei diesem Abbau Säuren entstehen, wie sie üblicherweise aus Terpenen und Camphern bei der Oxydation erhalten werden. Insbesondere Methylbernsteinsäure und Dimethylmalonsäure weisen darauf hin, dass der Komplex HB₁₂ zum mindesten teilweise aus Isoprenresten aufgebaut ist (Dimethylmalonsäure ist bekanntlich z. B. ein charakteristisches Abbauprodukt von Verbindungen, welche einen Jonon- oder Jonon-ähnlichen Ring enthalten).

Die spätere Konstitutionsaufklärung der Säuren A, B, C und D wird voraussichtlich weitere Einblicke in das Aufbauprinzip der oxydierten Vitamin B₁₂-Fraktion erlauben. Dann werden wir auch die Trennung des komplizierten Säuregemisches, wie wir sie ausgeführt haben, ausführlich beschreiben.

Die vorliegende Untersuchung ist uns dadurch ermöglicht worden, dass die Firma *E. R. Squibb & Sons*, New Brunswick, N.J., dem einen von uns (*P. K.*) Vitamin B₁₂ in freundlicher Weise zur Verfügung stellte. Wir danken Herrn Prof. Dr. *O. Wintersteiner* und der Firma *E. R. Squibb & Sons* für die Überlassung dieser wertvollen Substanz aufs beste.

Im weiteren sind wir den *Arbeitsbeschaffungskrediten des Bundes* für die finanzielle Unterstützung der Untersuchung zu Dank verpflichtet.

Experimenteller Teil.

Versuche zur katalytischen Reduktion von B₁₂. Bekanntlich lässt sich B₁₂ in wässriger Lösung mit Platinoxid oder Palladium-Tierkohle und Wasserstoff zu einer braun gefärbten Verbindung reduzieren, die an der Luft in B_{12a} übergeht. Wurde der verwendete Wasserstoff durch eine alkalische Pyrogallolösung durchgeschickt, so beobachtete man im Papierchromatogramm des Hydrierungsproduktes (Lösungsmittel: n-Butanol-Eisessig-Wasser = 80 : 15 : 39) neben dem roten Fleck des B_{12a} ($RF = 0,36$) einen gelben Fleck mit $RF = 0,44$. Die Hydrierungen hat man in der Weise ausgeführt, dass z. B. über eine magnetisch gerührte Lösung von 1 mg B₁₂ mit 1 mg PtO₂ in 2—3 ml Wasser 3—8 Std. Wasserstoff geleitet wurde. Als man den Wasserstoff durch Überleiten über glühendes Kupfer reinigte, trat der gelbe Fleck höchstens in Spuren auf. Wurde dem Wasserstoff aber wenig Kohlenmonoxyd zugesetzt, so konnte der gelbe Fleck wieder

¹) Titration in Wasser.

²) Als Lösungsmittel diente die organische, durch ein Faltenfilter filtrierte Phase eines äquilibrierten Gemisches aus 50 ml Eukalyptol, 50 ml Propanol, 20 ml Ameisensäure und 20 ml Wasser (*R. J. Cheftel, R. Munier & M. Macheboeuf*, Bl. Soc. chim. biol. **34**, 380 (1952)). Die Papierchromatogramme wurden aufsteigend während 15 Std. an Whatman-Papier Nr. 1 ausgeführt. Bernsteinsäure hatte dabei den RF -Wert = 0,38; Methylbernsteinsäure $RF = 0,60$; Milchsäure $RF = 0,32$.

³) Titration in 43-proz. wässrigem Methylcellosolve.

beobachtet werden. Beim Zumischen von viel Kohlenmonoxyd beobachtete man im Papierchromatogramm neben dem gelben Fleck noch drei rote Flecken, während mit wenig Kohlenmonoxyd nur ein roter Fleck (B_{12a}) auftrat.

Versuche, die Ausbeute an der gelben Verbindung durch lange Hydrierdauer, durch den Zusatz von Metallsalzen (wie Cu'' , Co''' , Co'' u. a. m.) zu erhöhen, führten nicht zum Ziel. Die gelbe Substanz zeigte nach papierchromatographischer Reinigung bei pH 7,0 ein flaches, wenig charakteristisches Absorptionsspektrum mit dem langwelligen Maximum bei 445–450 $m\mu$. Auf Zusatz von Kaliumcyanid wurde es erhöht und auf 480–485 $m\mu$ verschoben.

Quantitative Bestimmung der unter verschiedenen Bedingungen bei der katalytischen Hydrierung entstehenden, flüchtigen Basen. Ia) 15,051 mg B_{12} in 3 ml 1-n. Salzsäure wurden mit 8,1 mg PtO_2 unter Einleitung von Wasserstoff bis zur Braunfärbung bei Zimmertemperatur gerührt. Anschliessend hat man nach Zusatz von 4 g Borax nach *Kjeldahl* destilliert. In einem Blindversuch mit eingewogener Ammoniumchloridquantität fand man die berechnete Menge Ammoniak. Gef. 0,102 mg als NH_3 berechnete, flüchtige Base, was bei einem MG für B_{12} von 1500 0,6 Mol NH_3 entspricht.

Ib) 13,831 mg B_{12} , 3 ml 1-n. HCl und 8 mg PtO_2 wurden 5 Std. unter den Bedingungen des Versuches Ia) hydriert. Nach Zugabe von 5 g Borax wurde wie oben destilliert. Gef. 0,121 mg als NH_3 berechnete, flüchtige Base, entsprechend 0,77 Mol NH_3 .

IIa) 16,772 mg B_{12} wurden in 3 ml 1-n. HCl mit 8 mg PtO_2 bei 20° durch Einleiten von Wasserstoff bis zur Braunfärbung hydriert. Anschliessend hat man unter weiterem Durchleiten von Wasserstoff 1½ Std. auf 100° erhitzt. Die Lösung war dann fast farblos. Nach Zugabe von 3,5 g Borax wurden die flüchtigen Basen abdestilliert und titriert: Gef. 0,953 mg als NH_3 berechnete, flüchtige Base, entsprechend 5,0 Mol NH_3 .

IIf) 15,176 mg B_{12} wurden wie unter IIa) hydriert. Nach der Zugabe von 5 g Borax haben wir die flüchtigen Basen abdestilliert. Gef. 0,936 mg als NH_3 berechnete, flüchtige Base, entsprechend 5,4 Mol NH_3 .

IIc) 15,60 mg B_{12} wurden wie unter IIf) behandelt: Gef. 0,839 mg als NH_3 berechnete, flüchtige Base, entsprechend 4,8 Mol NH_3 .

III. 10,78 mg B_{12} hat man mit 6,3 ml Wasser, 0,7 ml konz. Salzsäure und 2 ml Butanol 2 Std. unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Erkalten wurde vom Butanol abgetrennt und die wässrige Phase zweimal mit je 2 ml Butanol ausgekocht. Die vereinigten, rot gefärbten Butanolauszüge hat man dreimal mit wenig 1-n. Salzsäure, zweimal mit wenig Wasser gewaschen und im Vakuum bei 30° eingedampft.

Die mit den Waschwässern vereinigte wässrige Phase, die nur noch sehr schwach rötlich gefärbt war, hat man im Vakuum eingedampft. Dieses Produkt lieferte nach Zusatz von 5 g Borax 0,527 mg NH_3 (4,3 Mole). Im Papierchromatogramm des Eindampfungsrückstandes eines zweiten Versuches trat mit Ninhydrin nur ein Fleck mit dem gleichen RF-Wert wie β -Aminopropanol auf.

Die eingedampften Butanolauszüge wurden in 3 ml Alkohol gelöst und nach der Zugabe von 3 ml 1-n. HCl mit 10 mg PtO_2 bei 20° bis zum Auftreten der Braunfärbung hydriert. Hierauf haben wir noch 8 mg PtO_2 zugesetzt und weitere 2 Std. bei 100° hydriert. Die fast farblose Lösung lieferte nach der Zugabe von 5 g Borax 0,277 mg als NH_3 berechnete, flüchtige Base (2,27 Mol). Die Lösung eines weiteren analogen Versuchs zeigte im Papierchromatogramm nur einen Ninhydrin-Fleck mit RF = 0,44. Denselben RF-Wert besitzt unter gleichen Bedingungen Methylamin (Lösungsmittel: Eisessig/n-Butanol 6:20, mit Wasser gesättigt).

Bei einem grösseren Ansatz mit Vitamin B_{12} , das unter den Bedingungen des Ansatzes III der hydrierenden Hydrolyse unterworfen worden war, haben wir Ammoniumchlorid und Methylaminhydrochlorid präparativ isoliert und durch Analysen, Smp. und Misch-Smp. eindeutig identifiziert. Daneben liess sich auch $CoCl_2$ isolieren. Das uneinheitliche übrige Reaktionsprodukt, eine braun gefärbte Polycarbonsäure, die noch Co enthielt, konnte trotz vieler Bemühungen nicht in reine Verbindungen zerlegt werden.

Einwirkung von Chlor auf Vitamin B₁₂. Es wurde festgestellt, dass eine methanolische Lösung von B₁₂ sowie B_{12a} durch Chlor entfärbt wird, wobei eine violette Zwischenstufe durchschritten wird.

Präparative Versuche: a) 11 mg B₁₂, gelöst in wenig absolutem Methanol, hat man bei 20° so lange mit einer Lösung von Chlor in Tetrachlorkohlenstoff (0,564 mg Cl₂/ml) versetzt, bis die Reaktionslösung nur mehr schwach braun gefärbt war. Anschliessend wurde die Flüssigkeit im Vakuum eingedampft und der Rückstand bei 20° im Hochvakuum getrocknet.

Gef. Cl 30,0 NH₃ 4,4%¹⁾

b) 50 mg B₁₂ in 50 ml absolutem Methanol wurden unter Rühren bei 0° tropfenweise mit obiger Chlorlösung versetzt. Der Reaktionsverlauf wurde spektrophotometrisch verfolgt, indem nach jeder Chlorzugabe die Extinktion von 0,25 ml Reaktionslösung nach der Zugabe von 3 ml Methanol bei 555 m μ und 585 m μ bestimmt wurde. Die Chlorzugabe bewirkte zunächst ein Ansteigen der Absorption bei 585 m μ und ein Abfallen bei 555 m μ . Nach der Zugabe von 20 ml Chlorlösung erreichte das Absorpt.-Max. λ 585 m μ ein Maximum, das beim weiteren Zufügen von Chlor, ebenso wie Max. λ 555 m μ , zu fallen begann. Nach dem Zutropfen von 21,5 ml Chlorlösung wurde die Reaktion abgebrochen, die Lösung im Vakuum bei 20° auf wenige ml eingengt und durch Aluminiumoxyd (Brockmann, 80 \times 12 mm) filtriert. Die erste, relativ schwach gefärbte, violette Farbzone, die die Säule passierte, haben wir verworfen; die Hauptmenge des violetten Farbstoffs (Max. λ 585 m μ /Max. λ 555 m μ > 0,95) erschien im Filtrat. Man dampfte dieses im Vakuum zur Trockene ein und chromatographierte in wässrigem Butanol an einer in üblicher Weise vorbehandelten Cellulosesäule (13,5 \times 150 mm). Im Filtrat fing man Fraktionen à 1,7 ml auf. Die Extinktion bei 585 m μ stieg bis Fraktion 8 etwas an, fiel dann wieder ab und erreichte bei Fraktion 20 ihren höchsten Wert. Weitere kleine Zonen folgten nach. Die Fraktionen 13—24 (Max. λ 585 m μ /Max. λ 555 m μ = 1,0—1,1) wurden vereinigt und nochmals an Cellulose (13,5 \times 182 mm) in wässrigem Butanol verteilt. Die Fraktionen mit den höchsten Extinktionen und den besten Max. λ 585/Max. λ 555-Verhältnissen (1,06—1,08) wurden vereinigt, im Vakuum eingengt, mit Äther verdünnt und mit Wasser ausgeschüttelt. Die wässrige, rotviolette Lösung hat man mit Chloroform-Phenol 4 : 1 ausgeschüttelt, die organische Phase mit wenig Wasser gewaschen, im Vakuum vom Chloroform befreit, mit Äther verdünnt und mit Wasser ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde nach dem Waschen mit Äther im Vakuum (20°) eingedampft, der Rückstand in Methanol aufgenommen, die Lösung filtriert, eingedampft (11,4 mg), der Rückstand in 0,5 ml Wasser gelöst und die Lösung bei 4° während 3 Tagen allmählich mit 12 ml Aceton versetzt. Das ausgeschiedene, mikrokristalline Produkt wog 6,96 mg. Aus der Mutterlauge gewann man noch 2,94 mg Substanz. Zur Analyse haben wir die Verbindung bei 60° im Hochvakuum zur Konstanz getrocknet.

Gef. Cl 3,8%

Die violette, wässrige Lösung des chlorierten B₁₂ färbte sich auf Zusatz von überschüssigem Kaliumcyanid intensiv blau. Beim Eindampfen der Lösung trat aber wieder die ursprüngliche violette Farbe auf. Betreffs Absorptionsspektren siehe Fig. 1.

Auch B_{12a} liess sich in ähnlicher Weise wie B₁₂ chlorieren. Versuche, die chlorierte Verbindung, die gegenüber dem Stoff aus B₁₂ kürzerwellig absorbierte, zu isolieren, führten wegen Zersetzlichkeit nicht zum Ziel.

Versuche, den nach saurer Hydrolyse von B₁₂ erhalten gebliebenen Kobaltkomplex nach der Veresterung zu fraktionieren. Das für die nachfolgenden Versuche verwendete, von Phosphorsäure, β -Amino-propanol und 5,6-Dimethyl-1- α -D-ribofuranosyl-benzimidazol befreite Hydrolysenprodukt des Vitamins B₁₂, das wir HB₁₂ nennen, haben wir nach den Angaben von J. G. Buchanan, A. W. Johnson, J. A. Mills & A. K. Todd²⁾ durch Verkothen von B₁₂ mit Butanol-Salzsäure bereitet.

¹⁾ Eine Probe wurde mit 5 g Borax versetzt und das freiwerdende Ammoniak nach Kjeldahl destilliert und bestimmt.

²⁾ Soc. 1950, 2845.

Das aus 400 mg B_{12} gewonnene Hydrolysenprodukt wurde in 100 ml absolutem Methanol gelöst und die Flüssigkeit unter Einleiten von trockenem Salzsäuregas 6 Std. zum Sieden erwärmt. Hierauf haben wir die Lösung im Vakuum zur Trockene eingedampft und den Trockenrückstand (Gef. OCH_3 10,9%) nochmals in gleicher Weise mit Methanol-Salzsäure umgesetzt. Nach dem Eindampfen im Vakuum wurde die zurückgebliebene feste Substanz mit kaltem Aceton und mit wenig kaltem Methanol ausgezogen, die Extrakte filtriert und die vereinigten Auszüge zur Trockene gebracht. Der feste Rückstand wurde nun erschöpfend mit heissem Aceton extrahiert. In das Aceton gingen 300 mg Substanz (Gef. OCH_3 10,8; Cl 11,0%). Den geringen, in Aceton unlöslichen Teil, welcher in Methanol löslich war, haben wir nicht weiter untersucht.

Die 300 mg Substanz hat man in Acetonlösung an Bariumsulfat ($3,2 \times 15$ cm) chromatographiert. Man eluierte mit 600 ml Aceton (Fraktion I: 180 mg), hierauf erschöpfend mit Aceton-Methanol-Gemisch 1:1 (Fraktion II: 110 mg) und schliesslich mit Wasser, wobei nur noch wenig Substanz eluiert wurde (Fraktion III).

Fraktion I wurde mit Benzol ausgekocht, wobei 140 mg (Fraktion IA in Lösung gingen. Es hinterblieben 42 mg Aceton-löslicher Anteil (Fraktion IB).

Fraktion IA haben wir in benzolischer Lösung an 20 g neutralem Aluminiumoxyd (bei 105° getrocknet) chromatographiert. Benzol eluierte keine Substanz. Benzol-Aceton-Gemisch 4:1 eluierte wenig braunes Öl und eine kleine rote Zone. Diese Fraktion hat man verworfen. Mit Benzol-Aceton 1:1 wurde eine rasch wandernde rote Zone herausgewaschen: Fraktion IA₁. Mit Aceton allein wanderten langsam zwei nahe beieinander gelegene rote Zonen ins Filtrat: Fraktion IA₂ und Fraktion IA₃. Methanol eluierte nur noch wenig orange-braune Substanz, die verworfen wurde. Danach war die Säule immer noch rot angefärbt.

Die Fraktion IA₁ hat man nochmals an 8 g neutralem Aluminiumoxyd chromatographiert. Mit Benzol-Aceton-Gemisch 4:1 erschien zunächst eine braune, dann eine langgezogene rote Zone im Filtrat: Fraktion IA₁₁. Nach dreimaligem Umfällen aus Benzol-Petroläther erhielt man 10 mg eines roten Pulvers, das nach dem Trocknen bei 20° folgende Analysenwerte zeigte:

Gef. C 55,4 H 6,73 OCH_3 18,6 N 7,93% Rückstand 6,9%

Die mit reinem Aceton eluierbare Substanz hat man mit Fraktion IA₂ vereinigt. Fraktion IA₂ hat man an 25 g Bariumsulfat chromatographiert. Mit Benzol-Aceton-Gemischen, die 5–10% Aceton enthielten, liess sich eine kleine rote Zone eluieren. Gemische mit 15–20% Acetongehalt wuschen die rote Hauptzone durch die Säule: Fraktion IA₂₁. Nach öfterem Umfällen aus Benzol-Petroläther erhielt man sie als rotes Pulver mit 15,6% OCH_3 .

Fraktion IA₃ hat man an 25 g Bariumsulfat chromatographiert. Benzol + 10% Aceton eluieren nur wenig Substanz. Mit Benzol + 20% Aceton kam eine Zone heraus, die nach dreimaligem Umfällen aus Benzol-Petroläther 15,7% OCH_3 gab: Fraktion IA₃₁. Mit Benzol + 30% Aceton folgte eine weitere Zone, die nach gleicher Behandlung 14,7% OCH_3 , 6,14% Cl besass: Fraktion IA₃₂. Spektren von Fraktion IA₃₁ und Fraktion IA₃₂ siehe Fig. 2.

Auch Fraktion IB hat man an 40 g Bariumsulfat chromatographiert und dabei die folgenden Resultate erhalten. Zur Analyse wurden die Substanzen stets noch mehrmals aus Benzol-Petroläther umgefällt und im Hochvakuum getrocknet:

Benzol + 15% Aceton: wenig rote Substanz

Benzol + 25% Aceton: rotes Pulver. Gef. OCH_3 15,5 N 6,87 Cl 6,35%

Benzol + 25% Aceton: rotes Pulver. Gef. OCH_3 15,6%

Benzol + 40% Aceton rotes: Pulver. Gef. OCH_3 14,7%

Durch Aceton wurde nurmehr sehr wenig Substanz eluiert. Das Methanol-Eluat hat man mit Fraktion II vereinigt.

Fraktion II wurde in Aceton an 75 g Bariumsulfat chromatographiert. Die Hauptmenge haben wir aus der Säule mit reinem Aceton eluiert und fraktioniert gefällt. Man löste in Aceton und setzte Benzol zu; es fiel Fraktion IIA aus, die nach zweimaligem

Umfällen aus Aceton-Äther 10,6% OCH_3 , 7,9% N und 9,04% Cl besass. Spektrum siehe Fig. 2. In der Mutterlauge wurde das Aceton weggedampft; dabei schied sich als amorphes, rotes Pulver die Fraktion IIB aus, die nochmals aus Aceton-Benzol und Aceton-Äther umgefällt wurde: 10,7% OCH_3 (Fraktion IIB₁).

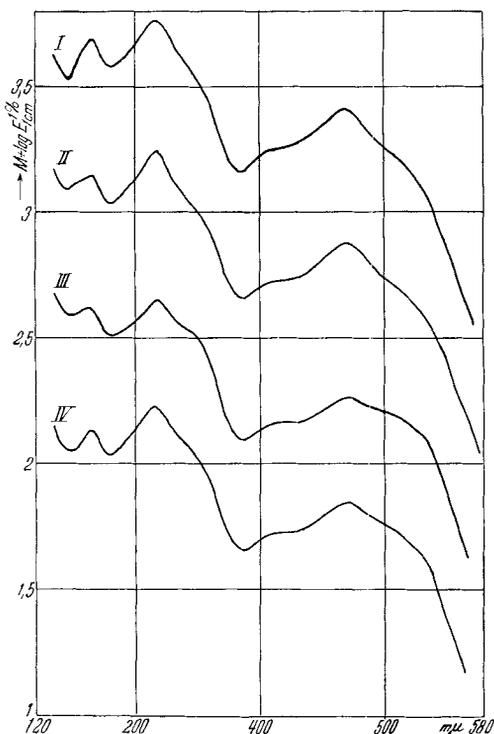


Fig. 2.

Methylester des B_{12} -Hydrolysenproduktes.

I Fr. IA ₃₁ M = 1,5 in Alkohol	III Fr. IIA M = 0,5 in Alkohol
II Fr. IA ₃₂ M = 1 in Alkohol	IV Fr. IIC ₁ M = 0 in Alkohol

Die Mutterlauge von Fraktion IIB gab nach dem Eindampfen ein in Benzol lösliches rotes Pulver; seine benzolische Lösung schied auf Zusatz von Äther eine Fraktion IIC₁ aus, die nach dem Umfällen aus Benzol-Äther folgende Analyse zeigte:

OCH_3 12,7 N 7,7 Cl 3,48% (Spektrum siehe Fig. 2)

Aus der Mutterlauge von Fraktion IIC₁ wurde mit Petroläther eine weitere Fraktion gefällt, die 11,9% OCH_3 enthielt.

Zusammenfassung:

Vitamin B_{12} wurde in einem Gemisch von verdünnter Salzsäure und Butanol mit Wasserstoff und PtO_2 hydriert, wobei unter den angegebenen Reaktionsbedingungen 5–6 Mol NH_3 (pro Mol B_{12}), β -Amino-propanol sowie kleine Mengen von Methylamin freigesetzt wurden. Letzteres stammt wahrscheinlich aus der Reduktion des im B_{12} vorhandenen Cyanwasserstoffs. An zahlreichen Kobalt-Koor-

dinationsverbindungen liess sich zeigen, dass auch solche unter den gewählten Bedingungen reaktiv aufgespalten werden.

Bei der Einwirkung von Chlor auf Vitamin B₁₂ wird dieses in eine farblose Chlorverbindung übergeführt. Hierbei wird eine violette Zwischenstufe durchschritten, welche sich in chromatographisch einheitlicher Form isolieren liess.

Versuche, das bei der sauren Hydrolyse aus B₁₂ entstandene, von H₃PO₄, β -Amino-propanol und 5, 6-Dimethyl-1- α -D-ribosylbenzimidazol befreite Hydrolysenprodukt als Methylester zu reinigen, führten zu der Erkenntnis, dass ein kompliziertes Estergemisch vorliegt.

Die Oxydation des vorgenannten Hydrolysenproduktes mit Kaliumpermanganat bei 50° ergab ein Säuregemisch, aus dem bisher 8 Säuren in reinem Zustand isoliert worden sind. 4 von diesen wurden als Oxalsäure, Bernsteinsäure, Methylbernsteinsäure und Dimethylmalonsäure identifiziert. 4 weitere Säuren, A, B, C und D, haben wir durch verschiedene Eigenschaften und Konstanten vorläufig charakterisiert.

Das Ergebnis dieser oxydativen Abbauprobe lässt erkennen, dass beim Abbau von Vitamin B₁₂ Säuren entstehen, wie man sie auch aus Terpenen und Camphern bei der Oxydation erhält (Methylbernsteinsäure, Dimethylmalonsäure). Daraus kann geschlossen werden, dass ein Teil der B₁₂-Molekel aus Isoprenresten aufgebaut ist.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

11. Über neue 3,5-Dioxo-pyrazolidine

von J. Büchi, J. Ammann¹⁾, R. Lieberherr† und E. Eichenberger.

(25. XI. 52.)

A. Einleitung.

Die Entwicklung der Arzneimittel aus der Gruppe der von Knorr²⁾ entdeckten Pyrazolone war in den letzten Jahrzehnten zu einem gewissen Stillstand gekommen. Seit der Einführung des 4-Dimethylamino-antipyrins oder Pyramidons (I)³⁾, das noch heute als das beste Arzneimittel dieser Stoffklasse gelten kann, wurde immer wieder versucht, die geringe Löslichkeit dieser Substanz zu verbessern, da für die moderne perorale Stosstherapie nur Produkte mit guter Wasserlöslichkeit in Frage kommen. Wohl wurden im Verlauf der Zeit verschiedene Pyrazolon-Derivate mit verbesserter Wasserlöslichkeit entwickelt, doch genügten deren pharmakologische Eigenschaften nicht, um die klinische Bedeutung des Pyramidons zu erreichen.

¹⁾ Jürg Ammann, „Synthesen in der Pyrazol-3,5-dion-Reihe“, Diss. ETH., 1952.

²⁾ Knorr, B. 16, 2597 (1883); B. 17, 549 (1884).

³⁾ Höchst, D.R.P. 71 261 (1892).