

Eine schnelle papierchromatographische Trennung von Vitamin B₁₂

Die in der Literatur veröffentlichten Verfahren sehen zur papierchromatographischen Trennung von Vitamin B₁₂ und seinen Derivaten die Verwendung von *sec.*-Butanol vor¹. Zur Erhöhung der Trennungsfähigkeit setzen einzelne Verfasser dem wasser-gesättigten *sec.*-Butanol andere Chemikalien zu, wie z.B. Eisessig², Ammoniak³, Kaliumperchlorat⁴, usw. Durch diese Kombinationen gelang es das Vitamin B₁₂ innerhalb 24–72 Stunden von der verwandten Verbindungen zu trennen.

Durch unsere Versuche sollte ein Verfahren ausgearbeitet werden, mit welchem das Vitamin B₁₂ schon innerhalb 1–2 Stunden von seinen Verunreinigungen – in erster Linie vom Faktor III – getrennt werden kann, da die Fabrikationskontrolle in einem Grossbetrieb der Neuzeit keineswegs mehrere Tage in Anspruch nehmen darf.

Als Ausgangspunkt unserer Versuche diente die aus den präparativen Untersuchungen bekannte Tatsache, dass die einzelnen Derivate in einem Gemisch von Wasser und Phenol–Chloroform (1:6) je ein anderes Verteilungsverhältnis besitzen^{5,6}. Als Vorversuch wurde das Vitamin B₁₂ und der Faktor III in diesem Solvens chromatographiert. Der erwartete Unterschied zwischen den beiden Stoffen stellte sich zwar ein, jedoch bei verhältnismässig hohem R_F -Wert, wobei einerseits Schwanzbildung, andererseits ein sog. "Geist-Fleck" beobachtet wurde. Letzterer konnte durch Erhöhung der in der stehenden Phase vorhandenen Wassermenge, durch Benetzung des Papierstreifens beseitigt werden. Die Verminderung des R_F -Wertes und die Verdichtung der Flecke ist in Anwesenheit von *n*-Butanol, als dritte Komponente gelungen.

Fig. 1. zeigt die Veränderung der R_F -Werte des Vitamins B₁₂ und Faktors III, im Falle der steigenden Menge von *n*-Butanol. Als optimales Verhältnis von Butanol–Phenol fanden wir 2.5.

Anstelle der wässerigen Impregnierung des Papierstreifens kann – um der etwaigen Zersetzung des B₁₂ vorzubeugen – eine verdünnte (0.5 %ige) KCN-Lösung angewendet werden, die infolge der Bildung von Dicyanokobalamin-Komplexen eine Farbe-Veränderung verursacht, während die Stellung der Flecke unverändert bleibt. Auch das Chromatogramm verändert sich nicht, wenn der pH-Wert des wässerigen Impregniermittels zwischen 3 und 9 liegt.

Die R_F -Werte hängen in starkem Masse vom Feuchtigkeitsgehalt des Papiers ab. Durch Verlängerung der Trocknungszeit nach der Impregnierung nimmt im Anfang zugleich auch der Frontabstand und der Unterschied zwischen den beiden Flecken zu (Tabelle I); nach einer Trocknungszeit von 20 Minuten wird jedoch der Vitamin B₁₂-Fleck ziemlich diffus. Unseren Erfahrungen nach beträgt die optimale Trocknungszeit bei Zimmertemperatur 15 Minuten.

Die nach der beschriebenen Technik angefertigten Chromatogramme ergeben schöne runde Flecke, die zur densitometrischen Bewertung geeignet sind⁷.

TABELLE I

Trocknungszeit (Minuten)	Frontabstand (cm)	R_F		d^*
		B_{12}	Faktor III	
5	4.6	0.69	0.28	1.8
10	6.4	0.53	0.13	2.6
15	7.7	0.57	0.10	3.7
20	10.4	0.64	0.07	6.1
25	9.0	0.55	0.07	4.4
30	9.1	0.51	0.06	4.0

* d bedeutet den Abstand zwischen den Mittelpunkten der beiden Flecke in cm. Laufzeit: 2 Stunden.

Das Chromatographieren wurde wie folgt durchgeführt:

Der Papierstreifen (9 × 35 cm; Schleicher-Schüll 2043b) wurde manchmal durch die wässrige Phase des Lösungsmittelgemisches – oder destilliertes Wasser – durchgezogen, zwischen Filterpapier abgetränkt und nachdem 15 Minuten lang bei

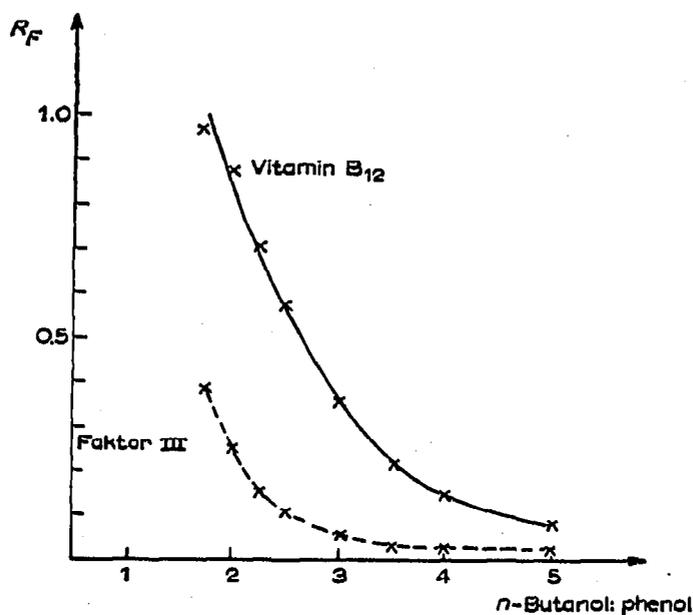


Fig. 1.

Zimmertemperatur zum Trocknen aufgehängt. Aus der konzentrierten wässrigen Lösung der zu prüfenden Probe* wurde die gewünschte Menge auf den zuvor bezeichneten Startpunkt (6 cm vom unteren Rand des Papiers) aufgetropft und der Papierstreifen sofort danach in das Chromatographiergefäß eingelegt.

Als Entwicklungsmittel wurde die untere organische Phase einer Mischung von Chloroform-Phenol-*n*-Butanol-Wasser im Verhältnis von 30:5:12.5:50 verwendet,

* Falls nur verdünnte Lösung zur Verfügung steht, tropft man den zu prüfenden Stoff auf einen trockenen Papierstreifen mehrmals nacheinander auf und lässt das Lösungsmittel bei jeder Gelegenheit verdampfen; danach impregniert man das Papier vorsichtig, mit gleichmässiger Spritzung.

die mindestens 3 Stunden vor der Chromatographie in das Gefäß eingebracht wurde. Bei aufsteigender Chromatographie trennte sich B₁₂ bereits innerhalb von 1-1 1/2 Stunden vollkommen vom Faktor III und den anderen Begleitstoffen.

Die experimentell gefundenen R_F -Werte einiger Vitamin B₁₂ Derivate sind folgende:

Vitamin B ₁₂	0.57
Faktor III	0.10
Faktor E	0.84
Faktor B	0.14

*Analytisches Laboratorium der Firma Gedeon Richter A. G.,
Budapest (Ungarn)*

J. BAYER

¹ E. L. SMITH, *Biochem. J.*, 52 (1952) 384.

² J. JANICKI UND J. SKUPIN, *Acta Biochim. Polon.*, 5 (1958) 235.

³ S. K. KON, *Biochem. Soc. Symposia, Cambridge, Engl.*, No. 13 (1955) 17.

⁴ W. FRIEDRICH UND K. BERNHAUER, *Z. Naturforsch.*, 10b (1955) 6.

⁵ *Ung. Pat.*, 143.549.

⁶ B. MOLNÁR, *Magyar. Kém. Lapja*, 14 (1959) 381.

⁷ J. BAYER, *Acta Pharm. Hung.*, 31B (1961) 51.

Eingegangen den 10. Oktober 1961

J. Chromatog., 8 (1962) 123-125

A simple inexpensive set-up for the detection of ultraviolet absorbing substances*

Several kinds of equipment for the detection of substances absorbing in the short wave ultraviolet range have been described¹⁻⁸. Low pressure mercury discharge lamps combined with a suitable filter are commercially available (Mineralight, Chromatolite, etc.). The advantage of the set-up to be described here lies in the simplicity of its construction, low cost and some geometric properties facilitating its use.

The set-up contains a fluorescent screen and short wave U.V. source. The screen is made of a thin layer of a fluorescent substance. Among the various materials tried, the best results were achieved with magnesium tungstate (bluish fluorescence) and a halophosphate luminophor containing Ca, Mn, and Sb chloro- and fluorophosphates and exhibiting pink fluorescence. While the former has the advantage of a brighter fluorescence, the latter has a more specific excitation spectrum which does not respond to long-wave U.V. radiation.

In order to obtain a uniform thin layer it has been found advantageous to spray the fluorescent substances by means of a chromatographic atomizer upon a wet

* Presented in part at the Conference on Paper Chromatography organized in Prague by the Czechoslovak Chemical Society, Chromatography Group, June 21, 1961.

J. Chromatog., 8 (1962) 125-126