

CHEMISCH WEEKBLAD

ORGAAN VAN DE NEDERLANDSE CHEMISCHE VERENIGING

INHOUD

	Bladz.		Bladz.
Verhandelingen, Overzichten, Verslagen	33	Verenigingsnieuws	45
Dr. H. G. Wijmenga en Dr. W. L. C. Veer, Enige gegevens over de chemie van het vitamine B ₁₂ en van verwante verbindingen.		Mededelingen van het Secretariaat. — Secties. — Chemische Kringen.	
Octrooien.	40	Mededelingen van verwante verenigingen	47
Openbaar gemaakte Octrooiaanvragen per 15 November 1951.		Mededelingen van verschillende aard	47
Handel en Economie.	42	Wij ontvingen.	47
Dr. E. L. Krugers Dagneaux, Benzeenproductie uit aardolie.		Vraag en aanbod	48
Boekbesprekingen	43	Aangeboden betrekkingen	48
Allerlei nieuws op chemisch en aanverwant gebied.	45	Gevraagde betrekkingen	48
Personalia.	45	Verbetering	48
		Agenda van vergaderingen	48

Verhandelingen, Overzichten, VerslagenEnige gegevens over de chemie van het vitamine B₁₂ en van verwante verbindingen

door H. G. Wijmenga en W. L. C. Veer

577.16 B₁₂ [547]

A survey is given on the chemistry of vitamin B₁₂ and related substances, covering the literature until mid-1951.

1. Inleiding.

Gaarne wordt hiermede voldaan aan een verzoek van de Redactie van dit Weekblad een samenvattend overzicht te geven van hetgeen tot dusver bekend is geworden van de chemie van het vitamine B₁₂.

De pogingen tot de structuurbepaling van dit vitamine hebben belangwekkende aspecten en inzichten opgeleverd. Voorts is dit chemisch onderzoek karakteristiek voor de snelle voortgang van de wetenschap in deze tijd. In April 1948, twee en twintig jaren na de invoering van de levertherapie bij pernicieuze anaemie door Minot en Murphy (zie Tausk¹), verscheen een mededeling van de Amerikaanse onderzoekers Rickes, Brink, Koniuszy, Wood en Folkers²) over de isolering van het kristallijne, rood gekleurde vitamine B₁₂, het anti-perniciosaprinциpe uit de lever.

Enige weken later kondigden de Engelsen Lester Smith en Parker³) aan dat ook zij erin geslaagd waren het kristallijne vitamine te isoleren, nadat aanvankelijk amorphe fracties waren verkregen (Lester Smith⁴). Kort daarop gelukte de isolering aan een Nederlandse groep onderzoekers (Wijmenga, Lens en Middelbeek⁵), Juni 1948) en aan andere Engelse chemici (Ellis, Petrow en Snook⁶). Hoewel sinds de eerste aankondiging van Rickes c.s. nauwelijks drie jaren verlopen zijn, is de chemische literatuur

reeds zo uitgebreid dat het geven van een samenvattend overzicht voor de niet op dit gebied werkzame chemicus gerechtvaardigd is.

Ook de biochemische en klinische literatuur over dit onderwerp is dusdanig uitgegroeid dat het zelfs voor de „insider” reeds vrijwel onmogelijk is geheel „bij” te blijven.

Hoewel vitamine B₁₂ thans veel gemakkelijker toegankelijk is dan aanvankelijk, en o.a. bereid kan worden uit cultures van *Streptomyces griseus* (Rickes, Brink, Koniuszy, Wood en Folkers⁷)), moet het nog steeds tot de kostbare stoffen gerekend worden. Het onderzoek wordt daardoor zeer bemoeilijkt, aangezien slechts kleine hoeveelheden in het onderzoek kunnen worden betrokken. Dit is de reden waarom chemische publicaties tot dusver voornamelijk afkomstig zijn van op dit gebied werkzame industriële laboratoria. Een blik op de literatuurlijst toont voorts dat veelal verscheidene onderzoekers samenwerken. Ook hier heeft „team work” snelle vorderingen mogelijk gemaakt.

2. Algemene en analytische gegevens.

Vitamine B₁₂ kristalliseert uit water-aceton mengsels in de vorm van rode, naaldvormige kristallen met de volgende brekingsindices: $n_D = 1.616$; $n_B = 1.652$ en $n_F = 1.664$. Het geeft geen scherp

smeltpunt: bij 210—220° C worden de kristallen zwart en ze smelten beneden 300° C niet. Vitamine B₁₂ vertoont in waterige oplossing een optische rotatie van $[\alpha]_{553}^{23} = -59 \pm 9^\circ$ (Brink c.s.⁸) en een karakteristiek absorptiespectrum met hoofdmaxima bij 548, 361 en 278 m μ . Het onderzoek van Barer, Cole en Thompson⁹) over het infra-rood spectrum van vitamine B₁₂ leverde geen duidelijke aanwijzingen voor de structuur op, maar wel werd geconcludeerd dat geen poly-amide structuur aanwezig is. Door Pierce c.s.¹⁰) werd erop gewezen dat het infra-rood spectrum een band bij 2140 cm⁻¹ vertoont.

Reeds spoedig werd vastgesteld dat vitamine B₁₂ cobalt en phosphor bevat¹¹)¹²), en hiermee was voor het eerst een organische natuurstof geïsoleerd die gekarakteriseerd is door de aanwezigheid van het „sporelement” cobalt.

Chalet, Rosenblum en Woodbury¹³)¹⁴) slaagden erin met ⁶⁰Co „gemerkt” kristallijn vitamine B₁₂ te isoleren (uit een ⁶⁰CoSO₄ bevattend cultuurmedium van *Streptomyces griseus*), zodat een vorm van dit vitamine beschikbaar gekomen is, die ongetwijfeld van veel nut zal zijn voor het onderzoek over de biochemie van het vitamine B₁₂.

Uit een recente publicatie van Anderson en Delabarre¹⁵) blijkt dat men ook door bombarderen van vitamine B₁₂ met neutronen het cobalt in het molecuul kan overvoeren in ⁶⁰Co. De eerste publicaties over de uitscheiding van het „gemerkte” vitamine, na injectie of na orale toediening aan ratten, zijn inmiddels reeds verschenen¹⁶)¹⁷).

Op grond van het cobaltgehalte (ongeveer 4 %), en aannemende dat slechts één atoom Co per molecuul B₁₂ aanwezig is, kon een molecuulgewicht van ongeveer 1600 worden berekend, terwijl de eerste röntgenografische onderzoeken van Dorothea Crowfoot op 1550—1750 wezen¹⁸); in een latere publicatie werden door Hodgkin, Porter en Spiller¹⁹) de grenzen van 1360 tot 1575 voor het molecuulgewicht het waarschijnlijk geacht; bovendien werden door laatstgenoemden nog een aantal kristallografische gegevens verzameld. Met Brink c.s.⁸) neemt men op het ogenblik vrij algemeen de elementairformule C₆₁₋₆₄H₈₆₋₉₂O₁₃N₁₄PCo aan, waarmee een M.G. van ca. 1300 overeenkomt.

Vitamine B₁₂ is diamagnetisch. Grün en Menassé²⁰), evenals Wallmann, Cunningham en Calvin²¹) stelden dit vast en concludeerden dat het cobalt driewaardig is, en octaëdrisch door 6 covalent gebonden groepen omgeven is (d²sp³-binding). Diehl, Vander Haar en Sealock²²) bevestigden de resultaten van deze onderzoekers, maar wezen erop dat men de mogelijkheid van een tweewaardig cobalt, gebonden met moleculaire zuurstof, niet mag uitsluiten.

3. Hydrolyse van vitamine B₁₂.

Een eerste inzicht in de structuur van het vitamine B₁₂ werd verkregen door hydrolyse met zoutzuur. Het is vermeldenswaard dat de rode kleur van de oplossing hierbij slechts weinig verandert, niettegenstaande er, zoals is gebleken, verschillende brokstukken ontstaan. Bij dit onderzoek is, evenals bij andere op het vitamine B₁₂-gebied, de oorspronkelijke door Consden, Gordon en Martin²³) ontwikkelde verdelingschromatografie op papier („papierchromatografie”) van groot nut gebleken. Zo waren Ellis, Petrow en Snook²⁴) in staat met behulp van deze methode het bij de hydrolyse vrijgemaakte fosfaat te bepalen. Zij kwamen hierbij tot de conclusie dat het molecuul per atoom Co één atoom P bevat. Dit

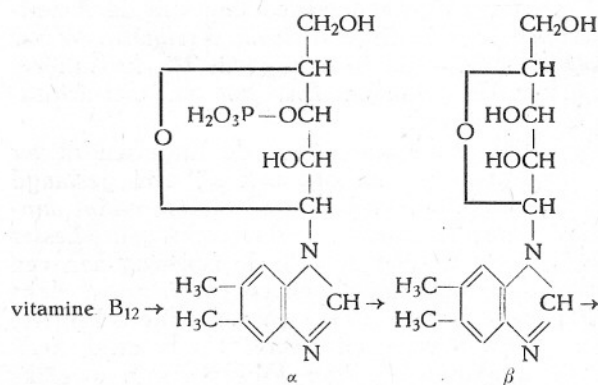
kon bevestigd worden door Lester Smith²⁵), die oorspronkelijk de verhouding Co : P = 1 : 3 had gevonden¹²).

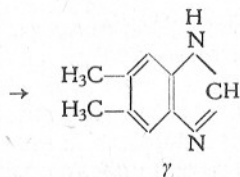
Bij de zure hydrolyse ontstaat bovendien een stof die met ninhydrine blauw wordt gekleurd⁶). Aanvankelijk werd het door Ellis c.s.²⁶)²⁷) zeer waarschijnlijk geacht dat deze verbinding identiek was met 2-amino-propanol-1. Bij oxydatie met KMnO₄ ontstond echter geen alanine²⁸). Het bleek Wolf c.s.²⁹), en later ook Cooley, Ellis en Petrow³⁰) dat de stof identiek is met D_g-1-amino-propanol-2. Een onderzoek van Chergaff c.s.³¹) maakt aannemelijk dat bij de zure hydrolyse twee moleculen amino-propanol per molecuul vitamine B₁₂ in vrijheid worden gesteld.

Een ander brokstuk dat in het hydrolysaat kon worden aangetoond was het 5,6-dimethyl-benzimidazol. Zowel Folkers als Petrow deelden dit op het „1st International Congress of Biochemistry” (Augustus 1949 te Cambridge) mede. Brink en Folkers³²) waren erin geslaagd deze verbinding te isoleren en konden dientengevolge de identiteit ervan bewijzen door vergelijking (smeltpunt, mengsmeltpunt, reacties) met een synthetisch bereid preparaat.

Petrow c.s.³³) hadden daarentegen waargenomen dat het papier waarmee een papierchromatografie van het hydrolysaat was uitgevoerd, bij bestraling met U.V.-licht, behalve de normaal zichtbare rode vlekken, drie extra vlekken vertoonde. De stoffen die voor laatstgenoemde vlekken verantwoordelijk waren, noemden zij de α -, β - en γ -component. De γ -component bleek het 5,6-dimethyl-benzimidazol te zijn, terwijl de overige componenten op grond van hun eigenschappen op plaats 1 (aan de N) gesubstitueerde 5,6-dimethyl-benzimidazolen zouden zijn. Op grond van spectrophotometrische metingen maakten zij waarschijnlijk dat één benzimidazolbrokstuk per molecuul B₁₂ aanwezig is³⁴).

Brink, Holly, Shunk, Peel, Cahill en Folkers³⁵) slaagden erin het 1- α -D-ribofuranosido-5,6-dimethyl-benzimidazol als hydrolyseproduct te isoleren, welke verbinding het door Petrow c.s. β -component genoemde brokstuk moest zijn. De α -component, die bij korte hydrolyse met 6 N HCl bij kamertemperatuur ontstaat (Cooley c.s.³⁶) werd door Buchanan, Johnson, Mills en Todd³⁷) als bariumzout verkregen na hydrolyse met N HCl bij 100° C. De α -component bleek bij hydrolyse met 6 N HCl bij 100° verder te splitsen in fosfaat en β -component, terwijl eerst bij 150° C onder druk uit deze laatstgenoemde stof het 5,6-dimethyl-benzimidazol ontstaat. Uit deze onderzoeken kon dus de volgende reactieketen worden vastgesteld:





Het staat nog niet vast of de fosphaatrest aan C2' of aan C3' van de suiker gebonden is; *Beaven* c.s. nemen een 3'-binding aan ³⁸⁾.

Chargaff c.s. ³¹⁾ bevestigden de vondst van *Ellis* en medewerkers ²⁷⁾ dat bij zure hydrolyse van vitamine B₁₂ ammoniak ontstaat; zij konden geen purines, pyrimidines of desoxyribose aantonen ³¹⁾.

4. De vitamines B_{12a} en B_{12b}.

De meest recente ontwikkeling van de kennis van de chemische aard van vitamine B₁₂ is voortgesproten uit onderzoeken van andere factoren van de vitamine B₁₂-groep, zodat een bespreking van een aantal van deze stoffen op deze plaats noodzakelijk is.

Kaczka, Wolf en Folkers ³⁹⁾ verkregen bij hydriering van vitamine B₁₂ met platina oxyde als katalysator een eveneens in rode naalden kristalliserende stof, die door hen vitamine B_{12a} werd genoemd. Het absorptiespectrum vertoonde maxima bij 530, 415, 352.5 en 315 mμ, terwijl een brede band van 270 tot 277 mμ aanwezig was. De brekingsindices waren verschillend van die van vitamine B₁₂, namelijk $n_\alpha = 1.580$; $n_\beta = 1.640$ en $n_\gamma = 1.654$.

Pierce c.s. ⁴⁰⁾ isoleerden uit lever en uit het cultuurmedium van *Streptomyces aureofaciens* een door hen vitamine B_{12b} genoemde stof. Deze verbinding vertoonde een absorptiespectrum met maxima bij 525, 351 en 274 mμ. Bij het uitvoeren van een katalytische reductie van vitamine B₁₂ (volgens *Kaczka* c.s.) verkregen *Brockman* c.s. ⁴²⁾, medewerkers van dezelfde groep van onderzoekers als *Pierce* c.s., niet het verwachte vitamine B_{12a} doch vitamine B_{12b}.

Later bleek uit onderzoeken van *Wijmenga* c.s. ⁴³⁾ ⁴⁴⁾, uit die van *Pilgrim* ⁴⁵⁾ en van *Folkers* c.s. ⁴⁶⁾ ⁴⁷⁾ dat de beide vitamines naar alle waarschijnlijkheid identiek zijn. De verschillen in de opgegeven maxima der absorptiespectra zijn volgens *Kaczka* c.s. ⁴⁷⁾ te wijten aan de veranderingen die met de tijd in het absorptiespectrum optreden. Afhankelijk van de voorbehandeling van het kristallijne vitamine B_{12a} (B_{12b}) en van de pH van de oplossing, kan de top bij 315 mμ al dan niet optreden, terwijl de andere maxima ook zeer gevoelig zijn voor veranderingen in de pH. Verder merkten zij op dat men voor de brekingsindex n_α van vitamine B_{12a} zeer uiteenlopende waarden kan vinden, afhankelijk van het feit of men de gemeten kristallen al dan niet goed heeft voorgedroogd. In plaats van 1.580 (zie boven) vonden zij namelijk na twee uren drogen bij 100° C een waarde van 1.604. *Brockman* c.s. ⁴²⁾ hadden er ook reeds op gewezen dat de toppen in het absorptiespectrum van vitamine B_{12b} bij toevoeging van NaOH verschuiven, en wel van resp. 525 naar 536 en van 351 naar 357 mμ.

Eerst vrij kort geleden werd bekend dat het vitamine B_{12b} ook geïsoleerd kan worden uit een andere bron; *Jackson* c.s. ⁴⁸⁾ konden het isoleren uit cultuurmedia van de neomycinebereiding.

Door *Fricke* c.s. ⁴⁹⁾ werd geconstateerd dat een vitamine B₁₂-oplossing bij behandeling met natrium-

bisulfiet van kleur verandert. Het bleek hen dat deze oplossing na het verwijderen van het bisulfiet een absorptiespectrum vertoonde dat volledig overeenstemde met dat van vitamine B_{12b}. Een andere wijze van omzetting van vitamine B₁₂ in vitamine B_{12b}, namelijk door een langdurige hydrolyse in zwak-zuur milieu, werd medegedeeld door *Brockman* c.s. ⁵⁰⁾.

5. Vitamine B₁₂ is een cyaancomplex.

Veer c.s. ⁵¹⁾ stelden vast dat de laatstgenoemde omzetting van vitamine B₁₂ in B_{12b}, in een zure oplossing, zich in het donker niet (of slechts zeer langzaam) voltrekt, maar dat in diffuus daglicht of door belichting met een kwiklamp een snelle verandering van het B₁₂-spectrum tot dat van vitamine B_{12b} optreedt. Zij konden aantonen dat deze omzetting o.a. kan plaatsvinden onder invloed van de straling in het golflengtegebied van ca. 365 mμ. Op grond van het gedrag van deze bestraalde oplossingen bij plaatsen in het donker, waarbij bleek dat, afhankelijk van de pH, de plaats van de maxima min of meer naar die van het vitamine B₁₂ verschuift, namen zij aan dat er bij de zojuist beschreven reacties sprake is van een evenwichtsreactie. Doordat zij tevens vaststelden dat de omzetting van vitamine B_{12b} tot vitamine B₁₂ zeer selectief kan worden bewerkstelligd door cyaan-ionen, kwamen zij tot de conclusie dat het vitamine B₁₂ zeer waarschijnlijk een cyaancomplex is.

Vrijwel gelijktijdig met de laatstvermelde publicatie verschenen soortgelijke resultaten van Amerikaanse zijde in druk, namelijk van *Brink, Kuehl en Folkers* ⁵²⁾ en van *Kaczka, Wolf, Kuehl en Folkers* ⁵³⁾. Deze onderzoekers kwamen onder meer tot dezelfde conclusies omtrent het cyaangehalte van vitamine B₁₂. Kort daarop leverden ook de Nederlandse onderzoekers het definitieve bewijs langs een enigszins andere weg dan de Amerikanen. *Wijmenga en Hurenkamp* ⁵⁴⁾ gebruikten namelijk voor het aantonen en voor de quantitative bepaling van CN in vitamine B₁₂ de door *Veer* c.s. ⁵¹⁾ vermelde invloed van belichten in zuur milieu, waarbij HCN in vrijheid wordt gesteld, dat door een stikstofstroom quantitatief kan worden uitgedreven en daarna bepaald. *Brink* c.s. ⁵²⁾ constateerden de aanwezigheid van CN, doordat zij bij een oxydatieve afbraak met KMnO₄ de reuk van HCN waarnamen. Hun eerste CN-bepalingen werden daarom ook verricht door het verhitten van vitamine B₁₂ in zoutzure of oxaalzure oplossing. *Boxer en Rickards* ⁵⁵⁾ ⁵⁶⁾ werkten evenwel onafhankelijk van de Nederlandse onderzoekers een quantitative bepaling van CN in vitamine B₁₂ uit, die eveneens op de vrijmaking van HCN in zuur milieu berust. Zij constateerden dat ook licht met een golflengte van 550 mμ de splitsing teweegbrengt, zodat zij een lichtbron voor het bestralen van de te onderzoeken oplossing gebruikten, die licht van deze golflengte gaf. Door toepassing en verbetering van de HCN-bepaling van *Epstein* ⁵⁷⁾ waren zij in staat hoeveelheden van zelfs 0.5 γ vitamine B₁₂ op het CN-gehalte te onderzoeken.

De resultaten van de CN-bepalingen van de beide groepen van onderzoekers, resp. 1.75 en 1.90 %, wijzen overduidelijk op de aanwezigheid van 1 CN-groep per atoom Co, waaruit een molecuulgewicht van watervrij vitamine B₁₂ van resp. 1262 en 1370 berekend kan worden. De aanwezigheid van cyaan in het vitamine B₁₂-molecule is volledig in overeenstemming met de reeds boven genoemde 2140 cm⁻¹

(= 4.67 μ) band in het infra-rood spectrum, want voor een $C\equiv N$ -groep zal men in het gebied van 4.3 tot 5.3 μ een absorptieband mogen verwachten⁵⁸⁾.

Boxer c.s.⁵⁹⁾ hebben gebruik gemaakt van de vondst van de aanwezigheid van CN in het vitamine B_{12} door een tweede soort „gemarkt” vitamine B_{12} te bereiden. Door behandeling van vitamine B_{12a} met $K^{14}CN$ verkregen zij vitamine B_{12} met ^{14}CN .

6. Nieuwe nomenclatuur en andere factoren van de vitamine B_{12} -groep.

Kaczka c.s.⁵³⁾ stelden in hun publicatie een nieuwe nomenclatuur voor het vitamine B_{12} voor, waarbij zij het vitamine B_{12} -molecule, zonder de CN-groep, *cobalamine* noemden. Vitamine B_{12} is dan het *cyano-cobalamine*, omdat het cyaan-ion in het cobalt-coördinatie-complex is opgenomen. De stoffen die ontstaan zijn doordat het CN-ion vervangen is door een ander negatief ion kunnen eenvoudig van een naam voorzien worden: zo noemden zij het vitamine B_{12a} , dat in waterige oplossing alkalisch reageert en dus waarschijnlijk een OH-groep in plaats van CN' bevat, *hydroxo-cobalamine*. Tevens slaagden zij erin het *chloro-*, het *sulfato-* en het *cyanato-cobalamine* te verkrijgen. De naam van het product, dat ontstaat door inwerking van H_2S op vitamine B_{12} , kon nog niet worden vastgesteld daar niet vaststaat welke groep in de plaats van het CN is gekomen. Omdat uit latere onderzoeken van Kaczka c.s.⁶⁰⁾ ⁶¹⁾ gebleken is dat de OH-groep in het hydroxo-cobalamine zeer gemakkelijk te vervangen is door Cl' , Br' en andere anionen — namelijk door de waterige oplossing met een weinig van het desbetreffende zuur te verdunnen en daarna de stof door toevoeging van aceton tot kristalliseren te brengen — is het zeer waarschijnlijk dat men bij de bereiding van vitamine B_{12b} volgens de methode van Veer c.s.⁵¹⁾ of volgens de door Wijmenga⁴⁴⁾ beschreven modificatie van deze werkwijze verschillende cobalaminen kan verkrijgen, afhankelijk van de keuze van het verdunde zuur dat men als oplosmiddel van het vitamine B_{12} tijdens de belichting gebruikt.

Het cyanato-cobalamine, dat uit het hydroxo-, het chloro- of het bromo-cobalamine kan ontstaan door behandeling met cyanaationen⁶¹⁾, is door Buhs, Newstead en Trenner⁶²⁾ uitvoerig onderzocht. Zij wijzen erop dat men bij het vaststellen van de identiteit van een verbinding uit de groep der cobalaminen zeer voorzichtig moet zijn met zijn conclusies, en dat men zoveel mogelijk gegevens moet verzamelen vóór men een conclusie trekt. De absorptiespectra van de bekende cobalaminen gelijken namelijk zeer veel op elkaar en zijn ook zeer gevoelig voor veranderingen in de pH van de oplossing. Hulpmiddelen bij het onderzoek over de identiteit van een stof kunnen o.a. papierchromatografie en de bepaling van de brekingsindices zijn, maar tevens verdient het aanbeveling de verdelingscoëfficiënt tussen bepaalde oplosmiddelen (bijv. water en benzylalcohol, of water en een mengsel van één deel phenol met 7 delen CCl_4) te bepalen, omdat deze getallen voor de meeste tot nu toe bekende cobalaminen zeer uiteenlopen⁵³⁾ ⁶¹⁾.

Alle zojuist besproken cobalaminen gaan door behandeling met KCN in het cyano-cobalamine over.

Door Anslow c.s.⁶³⁾ zijn naast de vitamines B_{12} en B_{12a} nog twee andere factoren uit de cultuurmedia

van *Streptomyces griseus* geïsoleerd, te weten de vitamines B_{12c} en B_{12d} . Zij toonden de verschillen onder meer aan door de verschillen in R_F -waarden bij papierchromatografie en door de verdelingscoëfficiënten tussen water en benzylalcohol. Uit een latere publicatie van Lester Smith c.s.⁶⁴⁾ blijkt dat deze twee laatstgenoemde stoffen tijdens het door hen gebruikte fabricageproces ten koste van de opbrengst aan vitamine B_{12b} ontstaan door de inwerking van HNO_2 . Er is dan ook alle reden met Lester Smith aan te nemen dat in het vitamine B_{12c} de cyaan-groep in het molecule is vervangen door een nitrietgroep. Aangezien het vitamine B_{12c} bij destillatie met zuur het vitamine B_{12d} levert dat zich onderscheidt van het hydroxo-cobalamine door o.a. een andere loop-snelheid bij papierchromatografie, neemt Lester Smith aan dat nog een andere wijziging tijdens de behandeling met HNO_2 in het vitamine B_{12} -molecule heeft plaats gevonden dan alleen de vervanging van CN door NO_2 . Hoewel hij aangeeft dat het vitamine B_{12d} alkalisch reageert, is het wel merkwaardig dat de beide vitamines B_{12c} en B_{12d} door behandeling met KCN weer overgaan in het vitamine B_{12} . Men zal nadere gegevens moeten afwachten om met zekerheid te kunnen beslissen of hier bij het vitamine B_{12c} toch niet gewoon sprake is van het nitrito-cobalamine. In dit geval zou namelijk door de keuze van het zuur bij de destillatie ter bereiding van het vitamine B_{12d} een ander basisch-reagerend cobalamine kunnen zijn ontstaan dan het hydroxo-cobalamine.

Ook Wijmenga⁴⁴⁾ slaagde erin een aantal aan vitamine B_{12} verwante factoren in kristallijne vorm te isoleren. In de groep der cobalaminen hoort de door hem met de codeletters WAB aangeduide factor thuis, aangezien deze verbinding door behandeling met KCN overgaat in het cyano-cobalamine. De factor WAB bleek bij papierchromatografie uit de vitamines B_{12a} en B_{12b} te ontstaan. De loopsnelheid van deze factor is groter dan die van vitamine B_{12} , en het absorptiespectrum vertoont maxima bij 530, 412 en 354 $m\mu$, terwijl in het gebied van 270 tot 280 $m\mu$ een brede bocht aanwezig is. Het is nog niet bekend welke groep of ion het CN vervangen heeft. Tevens werden door hem een tweetal andere factoren geïsoleerd die *niet* in de groep der cobalaminen geplaatst kunnen worden, om welke reden ze in § 8 apart besproken zullen worden.

Cooley en medewerkers⁶⁵⁾ hebben door behandeling van hydroxo-cobalamine met vloeibare ammoniak een product verkregen dat zij in analogie met de nomenclatuur in de porphyrine-chemie *ammonia-cobalichrome* noemen. Onder cobalichromes verstaan zij die derivaten van hydroxo-cobalamine waarin de OH-groep vervangen is door een basische groep, dus in dit voorbeeld door NH_3 . Dezelfde onderzoekers vonden dat men een histidine-cobalichrome kan bereiden door vitamine B_{12} met histidine in waterige oplossing tezamen te brengen. Door papierchromatografie kon de vorming van een dergelijk product bewezen worden.

Schindler⁶⁶⁾ bestudeerde naast de reductie van cyano-cobalamine met $NaHSO_3$ en $Na_2S_2O_4$, waarbij stoffen geïsoleerd werden met het vitamine B_{12a} -spectrum, bovendien de reductie met zinkstof in waterige NH_4Cl -oplossing. Door volledige uitsluiting van zuurstof gelukte het hem, via een bruin gekleurd tussenstadium, een blauw gekleurde oplossing te verkrijgen, die een totaal ander spectrum vertoonde dan in de vitamine B_{12} -groep meestal gevonden wordt.

Zodra evenwel lucht toegelaten wordt slaat de blauwe kleur in rood om. Het spectrum van de uit deze rode oplossing verkregen kristallen is weer ongeveer gelijk aan dat van vitamine B_{12a}. Schindler neemt aan dat het blauwe tussenproduct een reductieproduct van vitamine B₁₂ is, waarbij het cobalt tweewaardig is geworden. Door toevoeging van zuurstof zou dan direct weer oxydatie tot de driewaardige vorm optreden.

Alle in deze paragraaf besproken verbindingen kunnen door behandeling met KCN weer overgevoerd worden in het cyano-cobalamine.

7. Aard van de bouw van vitamine B₁₂.

Nu in enige van de vorige paragrafen de verschillende brokstukken van het vitamine B₁₂ besproken zijn, zal in de volgende alinea's een uiteenzetting gegeven worden over hetgeen men momenteel omtrent de bouw van het vitamine B₁₂ waarschijnlijk acht.

In verband met de werking van het cyano-cobalamine bij pernicioze anaemie, vraagt men zich onwillekeurig af of vitamine B₁₂ soms een porphyrine-structuur heeft. Reeds in het begin van het onderzoek werd door Brink c.s.⁸⁾ vastgesteld dat de pyrolyseproducten van vitamine B₁₂ een positieve denne-spaanreactie vertonen en dat ook in het destillaat, verkregen bij verhitting van vitamine B₁₂ met vaste NaOH, neerslagen ontstaan met o.a. p-dimethylaminobenzaldehyd in aethanol en HCl, en met mercurichloride. Daar zowel pyrolyse als alkalismelt zeer rigoreuze behandelingen zijn, behoeven deze positieve pyrroolreacties niet representatief te zijn voor de aanwezigheid van pyrrool-bevattende groepen in het vitamine B₁₂, terwijl tevens ook andere stoffen dan porphyrienen pyrroolen kunnen afsplitsen. Toch is het verleidelijk aan enkele analogieën tussen de vitamine B₁₂-groep en de porphyrienen te denken, nl.:

- reversibele photodissociatie, zoals men die heeft leren kennen bij bijv. CO-haemoglobine, komt, zoals boven reeds besproken werd, ook voor bij vitamine B₁₂;
- stabiliteit van complexen t.o.v. die van de „parent compound”: CNO-methaemoglobine is stabiel dan methaemoglobine, zoals Bader c.s.⁶⁷⁾ aantoonde; vitamine B₁₂ is stabiel dan vitamine B_{12b}, en andere cobalaminen, waarop Trenner c.s.⁶⁸⁾ en Lens c.s.⁶⁹⁾ wezen;
- mogelijkheid van verschillende cyaancomplexen: Keilin⁷⁰⁾ toonde aan dat van haem een monocyaan- en een dicyaanhaem kunnen worden afgeleid; op analoge wijze geeft vitamine B_{12b} met overmaat KCN een paarsblauw complex dat extra CN-groepen bevat (Beaven c.s.³⁸⁾; Wijmenga c.s.⁴³⁾);

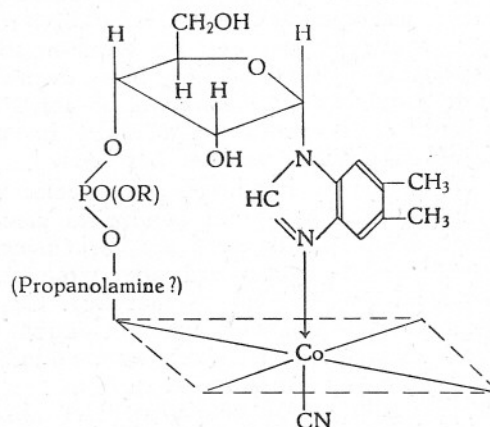
Conn, Norman en Wartman⁷¹⁾ bestudeerden door polarografische metingen de reactie tussen cyano-cobalamine en CN-ionen, en kwamen tot de conclusie dat complexen gevormd worden met één en met twee extra CN-groepen. Diehl c.s.⁷²⁾ 73), die met behulp van polarografie een inzicht trachten te krijgen omtrent de waardigheid van het cobalt in het vitamine B₁₂ en in daarvan afgeleide producten, menen evenwel dat het blauwpaarse complex slechts één CN-groep bevat boven de normaal in cyano-cobalamine aanwezige⁷⁴⁾.

Dat een Co-bevattend porphyrine, zoals Co-mesoporphyrine, cyaancomplexen kan vormen, werd reeds door Taylor⁷⁵⁾ geconstateerd;

- vorming van adducten: evenals haem adducten

kan vormen, o.a. met verschillende N-bevattende verbindingen (Anson en Mirsky⁷⁶⁾ e.a.), is door Lester Smith c.s.⁶⁴⁾ de vorming van adducten aangetoond van vitamine B₁₂ met thioglycolzuur en met jodium, terwijl Cooley c.s.⁶⁵⁾ de reeds boven besproken cobalichromes bereidden.

Op grond van een aantal van deze overwegingen kwamen Beaven, Holiday, Johnson, Ellis en Petrow³⁸⁾ ertoe aan het onbekende gedeelte van het vitamine B₁₂-molecule een structuur toe te schrijven die overeenkomt met die van porphyrienen. Door vergelijking van de absorptiespectra van vitamine B₁₂, van de α -component, en van modelstoffen (o.a. door Mamalis c.s.⁷⁷⁾ bereid), en door de veranderingen in het vitamine B₁₂-spectrum onder invloed van de toevoeging van extra CN-ionen, kwamen zij tot de conclusie dat de N op de plaats 3 in het benzimidazolgedeelte van de α -component covalent gebonden moet zijn, en wel aan de Co. Tenslotte kwam deze groep van onderzoekers, Cooley c.s.⁶⁵⁾, tot de volgende formule, welke op het ogenblik wel het best uitdrukt hoe men zich de bouw van het vitamine B₁₂ kan voorstellen:



Men moet bij deze formule bedenken dat de plaats en bindingswijze van de 2 propanolaminemoleculen niet bekend zijn terwijl ook niet met zekerheid bekend is of de fosfaatgroep op de aangegeven plaats aan de suiker gebonden is. Van het Co-complex dat door hen als een plat vlak is voorgesteld, is de globale samenstelling C₄₀₋₄₄H₅₀₋₅₆O₄N₉Co.

In een recente publicatie deelt Alicino⁷⁸⁾ mede, dat hij door behandeling van vitamine B₁₂ met perchloorzuur in ijsazijn een complex heeft geïsoleerd, dat 6 moleculen HClO₄ per molecule cyano-cobalamine bevat. Dit zou er dus op kunnen wijzen dat het vitamine B₁₂ 6 zwak-basische groepen bevat. Het complex bevat nog CN en splitst in water ogenblikkelijk weer in vitamine B₁₂ en HClO₄.

8. Andere factoren met vitamine B₁₂-activiteit.

Alle tot nu toe besproken factoren van de vitamine B₁₂-groep kunnen tot de groep der cobalaminen gerekend worden; niet alleen geven alle bij de microbiologische ijking met *L. Leichmannii* of met *L. lactis Dorner* (voor samenvatting zie⁴⁴⁾, blz. 9 e.v.), onder de omstandigheden voor de vitamine B₁₂-ijking, groei van de betreffende bacterie, en zijn een aantal van de genoemde stoffen bij patiënten met pernicioze anaemie op hun klinische werkzaamheid onderzocht en werkzaam bevonden, te weten vitamine B_{12b}⁴¹⁾, vitamine B_{12c}⁷⁹⁾ 80) 81) en vitamine B_{12d}⁸¹⁾ 82),

maar het voornaamste criterium is wel de overgang tot cyano-cobalamine onder invloed van KCN.

Naast deze factoren is evenwel nog een aantal stoffen beschreven die weliswaar vitamine B_{12} -achtige werking in de microbiologische ijking vertonen, die bovendien rood gekleurd zijn en die een absorptiespectrum bezitten dat veel lijkt op, of identiek is met, dat van vitamine B_{12} , maar die desalniettemin niet tot de groep van de cobalaminen gerekend kunnen worden. Naar alle waarschijnlijkheid hebben we hier te maken met verbindingen die slechts zeer weinig van het vitamine B_{12} verschillen, bijv. doordat ze in het porphyrinegedeelte één of meer andere groepen zullen blijken te hebben.

Zo konden door Schindler⁸³⁾ na voorzichtige behandeling van vitamine B_{12} met H_2O_2 in zwak-alkalisch milieu een zuur en een neutrale stof in kristallijne toestand worden geïsoleerd. Van beide verschilde het absorptiespectrum niet — of vrijwel niet — van dat van cyano-cobalamine, terwijl beide stoffen nog een microbiologisch aanwijsbare vitamine B_{12} -activiteit vertoonden. Deze activiteit was bij beide evenwel niet meer zo groot als bij vitamine B_{12} zelf. Door vitamine B_{12} langdurig in 0.1 N NaOH te laten staan werd na opwerken een gekristalliseerd zuur verkregen, eveneens met een op vitamine B_{12} gelijkend spectrum. Deze verbinding bleek evenwel niet in staat de groei van *L. Leichmannii*, op een vitamine B_{12} -vrij medium, te bevorderen en moet dus als een inactief afbraakproduct worden beschouwd.

Ook Wijmenga⁴⁴⁾ beschreef een tweetal verbindingen dat in deze paragraaf behandeld moet worden. In de eerste plaats werd uit varkensmest een rode kristallijne stof geïsoleerd die vitamine B_{12m} werd genoemd (m = mest = manure). Op grond van papierchromatografische onderzoeken, en op grond van absorptiecurves, kon waarschijnlijk gemaakt worden dat ook in koemest en in de faeces van paarden een zelfde stof voorkomt. Het absorptiespectrum van vitamine B_{12m} lijkt zeer veel op dat van vitamine B_{12} ; de maxima worden bij dezelfde golflengten gevonden; alleen de verhoudingen van de extincties bij de verschillende golflengten verschillen enigszins voor de beide vitamines. De loopsnelheid van vitamine B_{12m} bij papierchromatografie (bijvoorbeeld volgens de door Woodruff en Foster⁸⁴⁾ geïntroduceerde uitvoeringsvorm) is aanzienlijk kleiner dan die van vitamine B_{12} .

De tweede factor, voorlopig aangeduid met de codeletters WR, werd in zeer kleine hoeveelheden (1.4 mg) in kristallijne vorm verkregen als bijfractie tijdens de bereiding van vitamine B_{12} uit lever. Het is niet bekend of deze stof als zodanig in lever voorkomt dan wel een kunstproduct is dat tijdens de opwerking is ontstaan. Het absorptiespectrum is volkomen identiek met dat van vitamine B_{12} , maar de loopsnelheid bij papierchromatografie toont duidelijk aan dat hier sprake is van een andere stof. Zowel vitamine B_{12m} als factor WR bezitten microbiologische activiteit maar een geringere dan die van vitamine B_{12} , namelijk resp. 50 en 40 % van die welke men voor een zelfde hoeveelheid vitamine B_{12} zou verwachten (*L. Leichmannii*). Het vitamine B_{12m} werd aan drie patiënten met pernicieuze anaemie toegediend en bleek klinisch werkzaam te zijn. Uit deze gegevens is het duidelijk dat men zowel bij vitamine B_{12m} als bij factor WR te maken heeft met een vitamine B_{12} -achtige verbinding. Beide stoffen blijken evenwel door belichten van een zwak-zure oplossing

HCN af te splitsen, zodat het niet verwonderlijk is dat zij niet in vitamine B_{12} kunnen worden overgevoerd door opneming van een CN-groep. Beide stoffen geven door behandeling van een oplossing met overmaat KCN een paarsblauwe verkleuring; het spectrum is dan identiek — wat de ligging der maxima betreft — met dat van het vitamine B_{12} -cyanocomplex, maar bij aanzuren ontstaan de oorspronkelijke stoffen weer terug, en wordt niet het vitamine B_{12} gevormd.

Enige oriënterende onderzoeken met vitamine B_{12m} hebben aangetoond dat van deze stof, op dezelfde wijze als bij vitamine B_{12} , een gehele serie verbindingen kan worden afgeleid. Zo werd door belichten van de zwak-zure oplossing een stof verkregen met een spectrum vrijwel identiek met dat van vitamine B_{12b} ; de ontstane verbinding, voorlopig vitamine B_{12mb} genoemd, had bij papierchromatografie een geringere loopsnelheid dan vitamine B_{12m} , terwijl door behandeling met KCN het vitamine B_{12m} werd teruggevormd. Er werden aanwijzingen verkregen dat ook uit de factor WR soortgelijke afgeleide verbindingen kunnen ontstaan. Nadere onderzoeken zullen moeten uitmaken of het vitamine B_{12m} en de factor WR naast CN ook de α -component en aminopropanol bevatten, opdat daaruit kan worden beslist of deze factoren inderdaad van vitamine B_{12} alleen verschillen in het cobalt-bevattende gedeelte, zoals boven geopperd werd.

9. Vitamine B_{12} in de lever.

De vraag rijst hoe vitamine B_{12} in de lever voorkomt. Hoewel deze vraag nog niet definitief kan worden beantwoord, is wel bekend uit onderzoeken van Wijmenga c.s.⁴³⁾ dat — althans in sommige leverextracten — vitamine B_{12} niet in een van de bovengenoemde modificaties voorkomt. Alle factoren van de vitamine B_{12} -groep zouden namelijk meer of minder snel met behulp van butanol, na toevoeging van $(NH_4)_2SO_4$ (een zuivering die door Ellis c.s.⁶⁾ en door Fantes c.s.⁸⁵⁾ werd beschreven), kunnen worden geëxtraheerd, terwijl uit de onderzochte leverextracten een zeer groot deel *niet* geëxtraheerd kon worden. Eerst na toevoeging van KCN volgde een vlotte extractie van de rode stoffen onder de boven beschreven omstandigheden. Men neigt daarom tot de opvatting dat vitamine B_{12} in de lever voorkomt gebonden aan een eiwit of aan een polypeptide, zodat men van B_{12} -conjugaten kan spreken. De binding kan worden verbroken door proteolyse of door CN-ionen.

Uit proeven van Boxer c.s.⁸⁶⁾ met $K^{14}CN$ blijkt dat geïncubeerd cyanide (bij de hond) voor een gedeelte met de urine wordt uitgescheiden, gebonden als vitamine B_{12} . De radioactiviteit in deze vorm is vele malen groter dan die van het met de urine uitgescheiden vrije cyanide en thiocynaat. Het moet zeer wel mogelijk worden geacht dat de vorming van het cyano-cobalamine uit conjugaten een normaal fysiologisch proces is.

10. Chemische vitamine B_{12} -bepalingen.

Direct na de ontdekking van het vitamine B_{12} werden er pogingen in het werk gesteld om naast de microbiologische ook chemische bepalingsmethodes te ontwikkelen. De eerste gepubliceerde methode, van Fantes, Ireland en Green⁸⁷⁾, berust op de bepaling van het na hydrolyse met HCl uit vitamine B_{12} en verwante verbindingen ontstane cobalt-bevattende

brokstuk. Een andere methode werd door Boxer en Rickards⁸⁸⁾ uitgewerkt. Hierbij bepaalde men niet het zojuist genoemde brokstuk, maar het bij hydrolyse ontstane 5,6-dimethylbenzimidazol.

Beide methodes zijn door de reeds in § 5 besproken CN-bepalingen volledig achterhaald. Vooral de gevoelige methode van Boxer en Rickards⁵⁵⁾ ⁵⁶⁾ zal met zeer veel voordeel gebruikt kunnen worden om in bloed, urine en andere oplossingen het vitamine B₁₂- en desgewenst ook het totale cobalaminegehalte te bepalen. Voor een uitvoerige beschrijving van methode, uitvoering en toepassingen wordt verwezen naar de publicaties van Boxer c.s.⁸⁶⁾ ⁸⁹⁾ ⁹⁰⁾.

Tenslotte is door Wijmenga c.s.⁴⁴⁾ ⁶⁹⁾ nog een methode ontwikkeld die het mogelijk maakt van daartoe geschikte leverextracten de som van alle cobalaminen, door behandeling met KCN gevolgd door chromatografie over neutraal Al₂O₃, als vitamine B₁₂ te bepalen. Door Lens c.s.⁶⁹⁾ is een overzicht gegeven van de met deze laatste methode verkregen resultaten, in vergelijking met die van de microbiologische ijking met *L. Leichmannii* en *L. lactis Dorner*. Wellicht is het gewenst te wijzen op de mogelijkheid dat bij alle tot nu toe bekende chemische methodes te hoge getalwaarden kunnen worden verkregen. Zo zullen bij de methodes die berusten op de bepaling van het CN-gehalte bij belichting, bij de aanwezigheid in de oplossing van stoffen zoals vitamine B_{12m} of factor WR, dus van stoffen die eveneens HCN bij belichting afsplitsen, maar microbiologisch minder actief zijn dan vitamine B₁₂, waarden verkregen worden die hoger zijn dan de microbiologisch bepaalde gehalten.

11. Isoleringmethoden.

Over de isolering van vitamine B₁₂ of andere cobalaminen uit natuurlijke bronnen zijn weliswaar verschillende publicaties verschenen, maar alleen Jackson c.s.⁴⁸⁾ geven een nauwkeurig voorschrift, namelijk voor de bereiding van vitamine B_{12b} uit de hen ter beschikking staande schimmelcultures voor de neomycine-fabricage. Toch zijn ook door andere onderzoekers zuiveringsmethodes genoemd die voor het concentreren van vitamine B₁₂, bijvoorbeeld uit leverextracten, zeer nuttig zijn. Verwezen kan worden naar de vele in de loop van dit overzicht genoemde artikelen van Lester Smith en medewerkers, waarbij in ⁹¹⁾ de verschillende uitvoeringsvormen van de door

hen toegepaste chromatografieën worden besproken; Borsook c.s.⁹²⁾ beschrijven een chromatografie met zetmeel als drager en een mengsel van propanol-butanol-0.1 N HCl als elueermiddel.

12. Slotopmerkingen.

In het bovenstaande werd slechts een samenvatting gegeven van de tot dusver vergaarde chemische inzichten van het vitamine B₁₂-onderzoek.

Onvermeld bleven, uiteraard, de klinische aspecten. De wonderbaarlijke werkzaamheid van vitamine B₁₂ moge echter blijken uit het feit dat de dagelijkse toediening van circa één microgram, per injectie toegediend, voldoende is om de anaemie en de andere symptomen van de pernicieuze anaemie te doen verdwijnen.

Dat vitamine B₁₂, als CN-verbinding, uitermate weinig toxisch is, is gebleken uit onderzoeken van Winter en Mushett⁹³⁾.

Zo werden bij intraperitoneale toediening aan ratten en caviae in een dosering van 100 mg en bij muizen zelfs tot een dosis van 1600 mg per kg lichaamsgewicht geen toxische verschijnselen waargenomen, evenmin als na intraveneuze toediening aan muizen in hoeveelheden van 1600 mg per kg lichaamsgewicht.

Evenmin werd in deze samenvatting ingegaan op de belangwekkende biochemische facetten van het vitamine B₁₂-onderzoek, zoals bijv. de rol van het vitamine bij trans-methyleringsprocessen, eiwitsynthesen en dergelijke. Reeds van een zuiver chemisch gezichtspunt uit moeten evenwel het vitamine B₁₂ en de daarmee verwante factoren tot een hoogst merkwaardige klasse van verbindingen worden gerekend.

Na de eerste mededeling over de isolering van het kristallijne vitamine B₁₂ heeft voorwaar niemand kunnen bevroeden dat hiermede de hand was gelegd op een vertegenwoordiger van een gehele reeks van factoren met een dergelijke gecompliceerde, en om verschillende redenen opmerkelijke structuur.

Met spanning wordt afgewacht wat nader onderzoek over de structuur van deze, zowel in fysiologisch als in chemisch opzicht fascinerende, groep van vitamines zal leren.

Oss, Research Laboratoria N.V. Organon.

September 1951.

- 1) Tausk, M., Chem. Weekblad 46, 141 (1950); Het Hormoon 15, 4 (1950).
- 2) Rickes, E. L., Brink, N. G., Koniuszy, F. R., Wood, T. R. en Folkers, K., Science 107, 396 (1948).
- 3) Lester Smith, E. en Parker, L. F. J., Meeting Biochem. Soc., May 29 (1948); Biochem. J. 43, (1948) Proc. viii.
- 4) Lester Smith, E., Nature 161, 638 (1948).
- 5) Wijmenga, H. G., Lens, J. en Middelbeek, A., Voordracht Ned. Ver. Biochemie, Utrecht, 4 Nov. 1948; Chem. Weekblad 45, 342 (1949).
- 6) Ellis, B., Petrow, V. en Snook, G. F., J. Pharm. Pharmacol. 1, 60 (1949).
- 7) Rickes, E. L., Brink, N. G., Koniuszy, F. R., Wood, T. R. en Folkers, K., Science 108, 634 (1948).
- 8) Brink, N. G., Wolf, D. E., Kaczka, E., Rickes, E. L., Koniuszy, F. R., Wood, T. R. en Folkers, K., J. Am. Chem. Soc. 71, 1854 (1949).
- 9) Barer, R., Cole, A. R. H. en Thompson, H. W., Nature 163, 198 (1949).
- 10) Pierce, J. V., Page Jr., A. C., Stokstad, E. L. R. en Jukes, T. H., J. Am. Chem. Soc. 72, 2615 (1950).
- 11) Rickes, E. L., Brink, N. G., Koniuszy, F. R., Wood, T. R. en Folkers, K., Science 108, 134 (1948).

- 12) Lester Smith, E., Nature 162, 144 (1948).
- 13) Chaiet, L., Rosenblum, Ch. en Woodbury, D. T., Science 111, 601 (1950).
- 14) Rosenblum, Ch. en Woodbury, D. T., Science 113, 215 (1951).
- 15) Anderson, R. C. en Delabarre, Y., J. Am. Chem. Soc. 73, 4051 (1951).
- 16) Chow, B. F., Rosenblum, Ch., Silber, R. H., Woodbury, D. T., Yamamoto, R. en Lang, C. A., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 76, 393 (1951).
- 17) Barber, K. W. en Johnson, B. C., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 76, 720 (1951).
- 18) Crowfoot, D., geciteerd door Lester Smith, E., Nature 162, 144 (1948).
- 19) Hodgkin, D., Porter, M. W. en Spiller, R. C., Proc. Roy. Soc. London 136, 609 (1949—1950).
- 20) Grün, F. en Menassé, R., Experientia 6, 263 (1950).
- 21) Wallmann, J. C., Cunningham, B. B. en Calvin, M., Science 113, 55 (1951).
- 22) Diehl, H., Vander Haar, R. W. en Sealock, R. R., J. Am. Chem. Soc. 72, 5312 (1950).
- 23) Consden, R., Gordon, A. H. en Martin, A. J. P., Biochem. J. 38, 224 (1944).
- 24) Ellis, B., Petrow, V. en Snook, G. F., J. Pharm. Pharmacol.

- 1, 287 (1949).
- 25) Lester Smith, E., J. Pharm. Pharmacol. 1, 500 (1949).
- 26) Ellis, B., Petrow, V. en Snook, G. F., J. Pharm. Pharmacol. 1, 735 (1949).
- 27) Ellis, B., Petrow, V. en Snook, G. F., J. Pharm. Pharmacol. 1, 950 (1949).
- 28) Cooley, G., Ellis, B. en Petrow, V., J. Pharm. Pharmacol. 2, 128 (1950).
- 29) Wolf, D. E., Jones, W. H., Valiant, J. en Folkers, K., J. Am. Chem. Soc. 72, 2820 (1950).
- 30) Cooley, G., Ellis, B. en Petrow, V., J. Pharm. Pharmacol. 2, 535 (1950).
- 31) Chargaft, E., Levine, C., Green, C. en Kream, J., Experientia 6, 229 (1950).
- 32) Brink, N. G. en Folkers, K., J. Am. Chem. Soc. 71, 2951 (1949); 72, 4442 (1950).
- 33) Holiday, E. R. en Petrow, V., J. Pharm. Pharmacol. 1, 734 (1949).
- 34) Beaven, G. R., Holiday, E. R., Johnson, E. A., Ellis, B., Mamalis, P., Petrow, V. en Sturgeon, B., J. Pharm. Pharmacol. 1, 957 (1949).
- 35) Brink, N. G., Holly, F. W., Shunk, C. H., Peel, E. W., Cahill, J. J. en Folkers, K., J. Am. Chem. Soc. 72, 1866 (1950).
- 36) Cooley, G., Ellis, B., Mamalis, P., Petrow, V. en Sturgeon, B., J. Pharm. Pharmacol. 2, 579 (1950).
- 37) Buchanan, J. G., Johnson, A. W., Mills, J. A. en Todd, A. R., Chemistry Industry 1950, 426; J. Chem. Soc. 1950, 2845.
- 38) Beaven, G. R., Holiday, E. R., Johnson, E. A., Ellis, B. en Petrow, V., J. Pharm. Pharmacol. 2, 733, 944 (1950).
- 39) Kaczka, E., Wolf, D. E. en Folkers, K., J. Am. Chem. Soc. 71, 1514 (1949).
- 40) Pierce, J. V., Page Jr., A. C., Stokstad, E. L. R. en Jukes, T. H., J. Am. Chem. Soc. 71, 2952 (1949).
- 41) Lichtman, H., Watson, J., Ginsberg, V., Pierce, J. V., Stokstad, E. L. R. en Jukes, T. H., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 72, 643 (1949).
- 42) Brockman Jr., J. A., Pierce, J. V., Stokstad, E. L. R., Broquist, H. P. en Jukes, T. H., J. Am. Chem. Soc. 72, 1042 (1950).
- 43) Wijmenga, H. G., Veer, W. L. C. en Lens, J., Biochim. et Biophys. Acta 6, 229 (1950).
- 44) Wijmenga, H. G., Onderzoekingen over vitamine B₁₂ en verwante factoren; dissertatie Utrecht 1951 (Kemink & Zoon N.V., Utrecht).
- 45) Pilgrim, F. J., Rudkin, G. O., Solomons, I. A. en Brunings, K. J., 118th Am. Chem. Soc. Meeting, Chicago, September 3 to 8, 1950, Abstracts of Papers 70C.
- 46) Folkers, K., 117th Am. Chem. Soc. Meeting, Philadelphia, April 9 to 13, 1950; Chem. Eng. News 28, 1377 (1950).
- 47) Kaczka, E. A., Denkwalter, R. G., Holland, A. en Folkers, K., J. Am. Chem. Soc. 73, 335 (1951).
- 48) Jackson, W. G., Whitfield, G. B., Vries, W. H. de, Nelson, H. A. en Evans, J. S., J. Am. Chem. Soc. 73, 337 (1951).
- 49) Fricke, H. H., Lanius, B., Rose, A. F. de, Lapidus, M. en Frost, D. V., Federation Proc. 9, 173 (1950).
- 50) Brockman Jr., J. A., Pierce, J. V., Stokstad, E. L. R., Broquist, H. P. en Jukes, T. H., 117th Am. Chem. Soc. Meeting, Philadelphia, April 9 to 13, 1950, Abstracts of Papers 11A.
- 51) Veer, W. L. C., Edelhausen, J. H., Wijmenga, H. G. en Lens, J., Biochim. et Biophys. Acta 6, 225 (1950).
- 52) Brink, N. G., Kuehl Jr., F. A. en Folkers, K., Science 112, 354 (1950).
- 53) Kaczka, E. A., Wolf, D. E., Kuehl Jr., F. A. en Folkers, K., Science 112, 354 (1950).
- 54) Wijmenga, H. G. en Hurenkamp, B., Voordracht Ned. Ver. Biochemie, Utrecht, 11 Nov. 1950; Chem. Weekblad 47, 217 (1951).
- 55) Boxer, G. E. en Rickards, J. C., Arch. Biochem. 30, 372 (1951).
- 56) Boxer, G. E. en Rickards, J. C., Arch. Biochem. 30, 382 (1951).
- 57) Epstein, J., Anal. Chem. 19, 272 (1947).
- 58) Randall, H. M., Fowler, R. G., Fuson, N. en Dengl, J. R., Infrared Determination of Organic Structures, p. 20 (D. van Nostrand Company, Inc., New York, 1949).
- 59) Boxer, G. E., Rickards, J. C., Rosenblum, Ch. en Woodbury, D. T., Arch. Biochem. 30, 470 (1951).
- 60) Kaczka, E. A., 119th Am. Chem. Soc. Meeting, Cleveland-Ohio, April 8 to 12, 1951, Abstracts of Papers 19A.
- 61) Kaczka, E. A., Wolf, D. E., Kuehl Jr., F. A. en Folkers, K., J. Am. Chem. Soc. 73, 3569 (1951).
- 62) Buhs, R. P., Newstead, E. G. en Trenner, N. R., Science 113, 625 (1951).
- 63) Anslow, W. K., Ball, S., Emery, W. B., Fantès, K. H., Lester Smith, E. en Walker, A. D., Chemistry Industry 1950, 574.
- 64) Lester Smith, E., Fantès, K. H., Ball, S., Ireland, D. M., Waller, J. G., Emery, W. B., Anslow, W. K. en Walker, A. D., 293rd Meeting of the Biochem. Soc., London, January 27, 1951.
- 65) Cooley, G., Ellis, B., Petrow, V., Beaven, G. H., Holiday, E. R. en Johnson, E. A., J. Pharm. Pharmacol. 3, 271 (1951).
- 66) Schindler, O., Helv. Chim. Acta 34, 1356 (1951).
- 67) Bader, R., Dirnhuber, P. en Schütz, F., Biochim. et Biophys. Acta 5, 105 (1950).
- 68) Trenner, N. R., Buhs, R. P., Bacher, F. A. en Gakenheimer, W. C., J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed. 39, 361 (1950).
- 69) Lens, J., Wijmenga, H. G., Wolff, R., Karlin, R., Winkler, K. C. en Haan, P. G. de, Biochim. et Biophys. Acta, in druk.
- 70) Keilin, J., Biochem. J. 45, 440 (1949); 46, 263 (1950); Nature 165, 151 (1950).
- 71) Conn, J. B., Norman, S. L. en Wartman, T. G., Science 113, 658 (1951).
- 72) Diehl, H., Sealock, R. R. en Morrison, J., Iowa State College J. Sci. 24, 433 (1950).
- 73) Diehl, H., Morrison, J. I. en Sealock, R. R., Experientia 7, 60 (1951).
- 74) Diehl, H., persoonlijke mededeling; publicatie in druk.
- 75) Taylor, J. F., J. Biol. Chem. 135, 569 (1940).
- 76) Anson, M. L. en Mirsky, A. E., J. Gen. Physiol. 12, 273 (1928).
- 77) Mamalis, P., Petrow, V. en Sturgeon, B., J. Pharm. Pharmacol. 2, 491, 503, 512 (1950).
- 78) Alicino, J. F., J. Am. Chem. Soc. 73, 4051 (1951).
- 79) Ungley, C. C., Proc. Roy. Soc. Med. 43, 537 (1950).
- 80) Ungley, C. C. en Campbell, H., Brit. Med. J. (1951) 152.
- 81) Marshall Chalmers, J. N., Brit. Med. J. (1951) 161.
- 82) Reid, G. C. K., Brit. Med. J. (1951) 164.
- 83) Schindler, O., Helv. Chim. Acta 34, 101 (1951).
- 84) Woodruff, H. B. en Foster, J. C., J. Biol. Chem. 183, 569 (1950).
- 85) Fantès, K. H., Page, J. E., Parker, L. F. J. en Lester Smith, E., Proc. Roy. Soc. London 136, 592 (1949-1950).
- 86) Boxer, G. E., Rickards, J. C., Rosenblum, Ch. en Woodbury, D. T., Federation Proc. 10, 166 (1951).
- 87) Fantès, K. H., Ireland, D. M. en Green, N., Biochem. J. 46 (1950), Proc. xxxiv.
- 88) Boxer, G. E. en Rickards, J. C., Arch. Biochem. 29, 75 (1950).
- 89) Boxer, G. E. en Rickards, J. C., Colorimetric Determination of Vitamin B₁₂ (Merck & Co., Inc., Rahway, New Jersey).
- 90) Boxer, G. E. en Rickards, J. C., Arch. Biochem. 30, 392 (1951).
- 91) Lester Smith, E., Discussions Faraday Society, No. 7 317 (1949).
- 92) Borsook, H., Deasy, C. L., Haagen-Smit, A. J., Keighley, G. en Lowy, P. H., Science 110, 528 (1949).
- 93) Winter, C. A. en Mushett, C. W., J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed. 39, 360 (1950).

Octrooien

608.3(492)

Openbaar gemaakte octrooiaanvragen
per 15 November 1951.

De eerste datum is de indieningsdatum, de voorrangsdatum is tussen haakjes geplaatst.

Klasse 6b 22, O.A. 143.234 — 10-11-48 (v. 14-1-48).
Les Usines de Melle. Werkwijze voor de continue rectificatie van alcohol ter bereiding van alcohol van hoge zuiverheid.
Klasse 6c 3, O.A. 143.913 — 17-12-48.
H. G. M. Rijssenbeek. Het bereiden van zwak alcoholische