

insäure

nd Be-
en von

Über das antineuritische Vitamin.

(3. Mitteilung.)

Von

A. Windaus, R. Tschesche und R. Grewe.

Mit 2 Figuren im Text.

(Aus dem Allgemeinen Chemischen Universitätslaboratorium in Göttingen.)
(Der Schriftleitung zugegangen am 31. Juli 1934.)

n 5 ver-
plexes
troxylen

am. Ges.

; Ohle,

polyoxy-
alle dar-

Im Jahre 1931 haben Windaus, Tschesche, Ruhkopf, Laquer und Schultz¹⁾ die Darstellungen von krystallisiertem, antineuritischem Vitamin aus Hefe beschrieben und festgestellt, daß es sich um eine schwefelhaltige Verbindung handelt; ihr Vitamin besaß eine höhere physiologische Wirksamkeit als das im Jahre 1927 von Jansen und Donath²⁾ aus Reiskleie bereitete, das nur Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff und Stickstoff enthalten sollte. Seitdem ist das krystallisierte antineuritische Vitamin mehrfach und nach verschiedenen Methoden sowohl aus Reiskleie wie aus Hefe gewonnen worden. Alle diese Präparate enthalten Schwefel und unterscheiden sich nicht merklich in ihren Eigenschaften. Man hat darum angenommen, daß das antineuritische Vitamin aus Reiskleie und dasjenige aus Hefe miteinander identisch sind und eine einheitliche Verbindung darstellen. Für dieses Vitamin haben Windaus, Tschesche und Ruhkopf³⁾ die Formel $C_{12}H_{10}N_4OS$ aufgestellt; demgegenüber vertritt Ohdake⁴⁾ die Formel $C_{12}H_{16}N_4O_2S$ oder $C_{12}H_{18}N_4O_2S$ und van Veen⁵⁾ die Formel $C_{12}H_{20}N_4O_2S$.

In der letzten Zeit ist nun von Peters⁶⁾ wie auch von van Veen⁷⁾ behauptet worden, daß das bisher für einheitlich angesehenes Vitamin B_1 durch weitere Reinigungsverfahren in seiner Wirksamkeit auf das Doppelte gesteigert werden könne; demnach müßte unser Präparat noch etwa 50% Verunreinigungen enthalten. Wir halten dies für sehr unwahrscheinlich, haben aber alsbald mit der Nachprüfung begonnen und werden darüber berichten, sobald wir zu einem sicheren Ergebnis gekommen sind. Wegen der Kostbarkeit des Materials schreiten alle Untersuchungen am Vitamin B_1 nur langsam voran.

In der vorliegenden Arbeit teilen wir einige Abbauprobungen mit, die wir an unserem Vitamin B₁ vorgenommen haben. Bei der vorsichtigen Oxydation mit Salpetersäure ist es gelungen, aus dem Vitamin zwei gut charakterisierte Bruchstücke mit je 5 Kohlenstoffatomen zu erhalten. Da sie zweifellos aus verschiedenen Bezirken des Vitamin-Moleküls stammen, sind in diesen beiden Bruchstücken 10 von den 12 Kohlenstoffatomen erfaßt worden.

Darstellung des Äthylesters C₇H₁₁O₅N₃. Als Ausgangsmaterial für diesen Versuch dienten 100 mg krystallisiertes Vitamin B₁-hydrochlorid. Zur Bereitung des salpetersauren Salzes wurde diese Menge in 15 ccm Wasser gelöst, die Lösung mit einigen Tropfen Salpetersäure angesäuert und in der Wärme mit verdünnter Silbernitratlösung versetzt, solange noch ein Niederschlag von Silberchlorid entstand; dann wurde abfiltriert und das Filtrat im Vakuum soweit wie möglich eingedampft; hierbei blieb das salpetersaure Vitamin in eisblumenartigen Krystallen zurück; diese lösten sich leicht in 2 ccm konzentrierter Salpetersäure (Dichte 1,4), ohne daß bei Zimmertemperatur eine sichtbare Einwirkung erfolgte. Wir erwärmten darum die Lösung langsam im Wasserbad; bei 60° färbte sie sich gelb und begann nach etwa 20 Minuten lebhaft Stickoxyde zu entwickeln; diese Gasentwicklung dauerte etwa 40 Minuten an, ließ dann nach und hatte nach weiteren 40 Minuten fast vollständig aufgehört. Nunmehr wurde die Salpetersäure im Vakuum bis auf einen kleinen Rest verdampft, der Rückstand wurde in Wasser gelöst und die Lösung mit Bariumhydroxyd versetzt, solange noch ein Niederschlag entstand, das ausgefällte Bariumsulfat wog 13,2 mg, das ist $\frac{1}{5}$ derjenigen Menge, die bei vollständiger Oxydation des Schwefels zu Schwefelsäure hätte entstehen müssen. Die nach dem Abfiltrieren des Bariumsulfatniederschlags erhaltene Lösung wurde im Vakuum bei niedriger Temperatur soweit als möglich eingedampft, der Rückstand in wenig Wasser gelöst, wieder eingedampft und diese Operation so oft wiederholt, bis die Salpetersäure fast vollständig vertrieben war. Beim Erwärmen mit 20 ccm absolutem Alkohol ging der zähflüssige Rückstand bis auf einen kleinen Rest in Lösung, die Lösung wurde filtriert, auf die Hälfte des ursprünglichen Volumens eingeeengt und mit dem dreifachen Volumen absolutem Äther versetzt. Nach kurzem Umschwenken bildeten sich reichliche Mengen einer gelben, flockigen Substanz, die nicht zur Krystallisation zu bringen war. Die alkoholisch-ätherische Lösung wurde im Vakuum zur Trockne eingedampft; der erhaltene Rückstand war nur schwach gelb gefärbt und

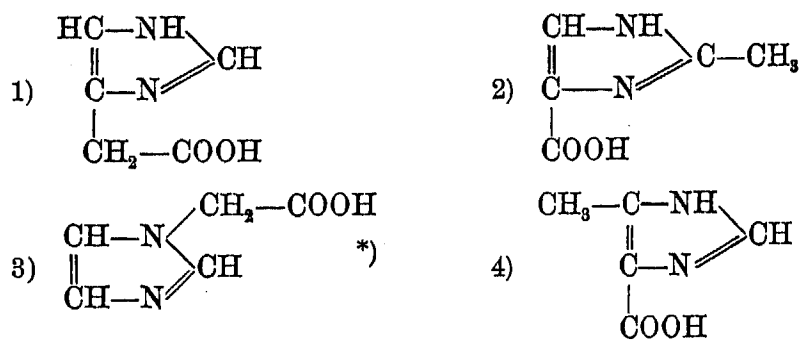
krystallin; er ließ sich sehr gut aus wenig Essigester umkrystallisieren und wurde aus diesem Lösungsmittel in farblosen Nadeln erhalten, die sich je nach der Raschheit des Erhitzens zwischen 146—153° zersetzten. Ausbeute 10 mg.

Die neue Substanz ist leicht löslich in Äther. Sie enthält Stickstoff, aber keinen Schwefel. Gegen Kongopapier reagiert sie sauer; gegenüber Diphenylamin und Schwefelsäure sowie gegen Ferrosulfat und Schwefelsäure zeigt sie Salpetersäurereaktion.

4,935, 4,842 mg Subst.: 6,980, 6,885 mg CO₂ u. 2,280, 2,180 mg H₂O. —
4,770, 3,329 mg Subst.: 0,801 (22°, 753 mm), 0,537 (19°, 763 mm) ccm N₂. —
4,327, 3,183 mg Subst.: 4,480, 3,570 mg AgJ.

C ₇ H ₁₁ N ₃ O ₅	Ber.	C 38,68	H 5,11	N 19,37	OC ₂ H ₅ 20,74
	Gef.	„ 38,59	„ 5,17	„ 19,25	„ 19,86
		„ 38,78	„ 5,04	„ 18,93	„ 21,51.

Wie die Analyse zeigt, enthält die Verbindung eine Äthoxylgruppe. Wir haben es also bei dem Abbauprodukt C₇H₁₁O₅N₃ mit dem salpetersauren Salz eines Äthylesters zu tun, dem eine Säure von der Formel C₅H₈O₂N₂ entspricht. Da das Vitamin kein Äthoxyl enthält, ist die Veresterung während der Aufarbeitung des Reaktionsproduktes erfolgt. Über die Konstitution der Verbindung C₅H₈O₂N₂ können wir noch keine sichere Aussage machen; die Annahme, daß es sich um eine Imidazol-essigsäure oder eine Methyl-imidazol-carbonsäure handelt, ist naheliegend; von diesen sind die vier folgenden bekannt:



Wir haben diese vier Säuren mit Alkohol und etwas konzentrierter Salpetersäure behandelt, haben aber dabei kein Nitrat erhalten, das mit unserem Abbauprodukt aus Vitamin B₁ identisch gewesen wäre. Auch die Absorptionsspektren von 1) und 2) waren von dem Spektrum unserer Verbindung weitgehend verschieden.

*) Herrn Professor F. L. Pyman danken wir vielmals für eine Probe dieser Säure.

Es erscheint also möglich, daß unser Vitamin-Abbauprodukt kein Imidazol-derivat ist; es handelt sich vielleicht um ein Dioxy-methyl-pyrimidin.

Darstellung der Verbindung $C_5H_5O_2NS$. Außer der Verbindung $C_7H_{11}N_3O_5$ haben wir noch eine zweite aus dem Reaktionsprodukt zu isolieren vermocht. Schon Vorversuche hatten gezeigt, daß bei der Oxydation des Vitamins mit Salpetersäure ein in Wasser schwer löslicher Stoff entsteht, der im Vakuum der Wasserstrahlpumpe oberhalb 150° in Würfeln sublimiert. Dieselbe Substanz erhielten wir, als wir alle Rückstände und Mutterlaugen, die bei der Darstellung der Verbindung $C_7H_{11}O_5N_3$ übrig blieben, vereinigten und im Vakuum zur Trockne eindampften. Das so erhaltene Material löste sich nicht mehr vollständig in Wasser; der schwer lösliche Anteil (A) wurde abfiltriert, das Filtrat wurde mit Äther ausgezogen und der Ätherextrakt eingedampft; aus dem Rückstand ließ sich ein weiterer, in Wasser schwer löslicher Anteil (B) gewinnen. A und B wurden vereinigt und bei 160° und 12 mm Quecksilber sublimiert; die erhaltenen Krystalle wurden ein zweites Mal gegen eine mit Wasser gekühlte Fläche im Vakuum sublimiert. Ausbeute 12 mg rein weißer Nadeln.

Die Eigenschaften der Verbindung sind die folgenden: Beim Erhitzen im Kapillarrohr färbt sie sich von 200° ab rot und zersetzt sich oberhalb 250° unter Aufschäumen. In den meisten Lösungsmitteln ist sie ziemlich schwer löslich; die wäßrige Lösung reagiert sauer gegen Lackmus; sie färbt sich an der Luft gelblich; von verdünnten Säuren oder verdünnten Alkalien wird die Substanz leicht gelöst. Beim Erwärmen mit starken Alkalien spaltet sie, ebenso wie das Vitamin selbst, Ammoniak und Schwefelwasserstoff ab.

4,555, 4,355 mg Subst.: 7,020, 6,690 mg CO_2 u. 1,520, 1,420 mg H_2O . —
2,950, 3,112, 4,360 mg Subst.: 0,239 (24° , 747 mm), 0,254 (23° , 742 mm), 0,347
(24° , 750 mm) ccm N_2 . — 8,900 mg Subst.: 14,510 mg $BaSO_4$.

$C_5H_5O_2NS$	Ber.	C 41,93	H 3,52	N 9,78	S 22,4
	Gef.	„ 42,03	„ 2,99	„ 9,23	„ 22,4
		„ 41,89	„ 3,65	„ 9,02, 9,19	—

Bei der Behandlung mit ätherischer Diazomethanlösung bildet der Stoff $C_5H_5O_2NS$ quantitativ einen Methylester, der durch Sublimation leicht rein erhalten werden kann; der Ester schmilzt bei $73-74^\circ$ und bildet farblose Nadeln, die in den üblichen organischen Lösungsmitteln leicht löslich sind; in Wasser ist der Methyl-

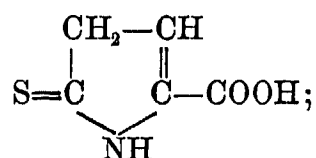
ester schwer löslich; in verdünnten Säuren löst er sich dagegen leicht auf, mit Phosphorwolframsäure gibt er ein schwer lösliches Salz.

4,734 mg Subst.: 7,990 mg CO₂ u. 1,890 mg H₂O. — 5,337 mg Subst.: 0,441 (23°, 757 mm) ccm N. — 10,155 mg Subst.: 14,980 mg BaSO₄. — 8,055 mg Subst.: 11,930 mg AgJ.

C ₆ H ₇ NO ₂ S	Ber.	C 45,82	H 4,49	N 8,92	S 20,40	OCH ₃ 19,74
	Gef.	„ 46,02	„ 4,47	„ 8,84	„ 20,27	„ 19,56.

Die Reaktionen des zweiten Abbauproduktes machen es wahrscheinlich, daß es eine freie Carboxylgruppe und eine C=S- oder C—SH-Gruppe enthält. Als Ringsystem ist vor allem der Pyrrolring in Betracht zu ziehen. In der Tat färben die Dämpfe, die sich beim Erhitzen der Verbindung C₅H₅O₂NS mit Zinkstaub entwickeln, einen mit konzentrierter Salzsäure befeuchteten Fichtenspan kirschrot. Bemerkenswert ist die Feststellung von van Veen, daß auch das Vitamin selbst diese Reaktion gibt.

Als eine mögliche Formulierung für die Verbindung erscheint uns



für die α, α' -Stellung der Substituenten spricht die leichte Abspaltung von Schwefelwasserstoff und Ammoniak. Wir werden versuchen eine solche Verbindung zu synthetisieren.

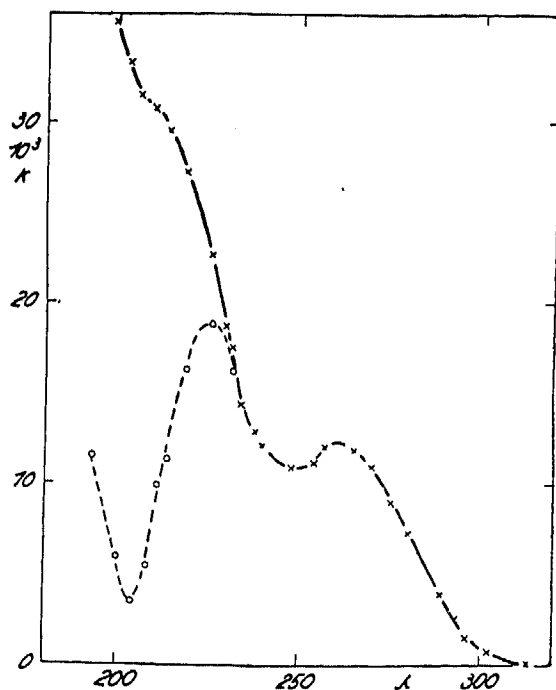


Fig. 1. x — x — Spaltprodukt C₇H₁₁O₅N₃
o — o — ohne Nitration.

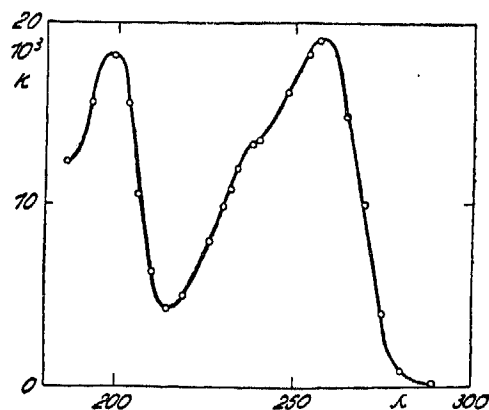


Fig. 2. Spaltprodukt C₇H₅O₂NS

Wir danken der I. G. Farbenindustrie A. G., Werk Elberfeld für die uns zur Verfügung gestellten Hefeextrakte und der Notgemeinschaft der deutschen Wissenschaft für die Unterstützung unserer Arbeiten.

Literatur.

1. A. Windaus, R. Tschesche, H. Ruhkopf, F. Laquer u. F. Schultz, Diese Z. 204, 123 (1932); Nachr. Ges. Wiss. Göttingen, Math.-physik. Kl. 1932, 207.
 2. Jansen u. Donath, Meded. Dienst Volksgezdh. Nederl.-Indië 1927, I.
 3. A. Windaus, R. Tschesche u. H. Ruhkopf, Nachr. Ges. Wiss. Göttingen, Math.-physik. Kl. 1932, 342.
 4. S. Ohdake, Bull. Agr. Chem. Soc. Japan 10, 71 (1934).
 5. A. G. van Veen, Diese Z. 208, 125 (1932).
 6. H. W. Kinnersley, I. R. O'Brien, R. A. Peters, Biochemic. J. 27, 232 (1933); R. A. Peters, I. St. L. Philpot, Proc. roy. Soc. B. 113, 48 (1933); R. Passmore, R. A. Peters, H. M. Sinclair, Biochemic. J. 27, 842 (1933).
 7. A. G. van Veen, Nature 133, 137 (1934).
-