

286. Richard Kuhn und Hans Brockmann: Prüfung von α - und β -Carotin an der Ratte) (Über das Vitamin des Wachstums, II)¹⁾.

[Aus d. Institut für Chemie am Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizinische Forschung, Heidelberg.]

(Eingegangen am 27. Mai 1931.)

H. Steenbock hat in einer Reihe von Untersuchungen²⁾ auf Beziehungen zwischen dem Gehalt an Carotinoiden und dem Gehalt an A-Vitamin bei verschiedenen Pflanzen hingewiesen. Nach Steenbock, Sell, Nelson und Buell³⁾ erzeugt mehrfach umkrystallisiertes Carotin von konstantem Schmelzpunkt bei A-vitaminfrei ernährten Ratten regelmäßig Wachstum. J. C. Drummond⁴⁾ hat dieses Ergebnis in Zweifel gezogen und die Vergesellschaftung des Wachstums-Vitamins mit dem Carotin als zufällig erachtet.

B. v. Euler, H. v. Euler und H. Hellström⁵⁾ konnten mit krystallisiertem Carotin erneut Wachstumswirkungen erzielen, und zwar in Tagesdosen von 0.005 mg pro Tag und Ratte. Nach B. v. Euler, H. v. Euler und P. Karrer⁶⁾ sind alle untersuchten natürlichen Polyen-Farbstoffe mit Ausnahme des Carotins unwirksam. H. v. Euler, V. Demole, P. Karrer und O. Walker⁷⁾ geben für die äther-löslichen, unverseifbaren Extrakte aus einer größeren Zahl von Pflanzen ein konstantes Verhältnis zwischen Carotin-Gehalt und Wachstumswirkung bei der Ratte an. Der Carotin-Gehalt der eben noch wirksamen Extraktmengen beträgt nach ihren Versuchen 0.01—0.038 mg. Die Beobachtungen H. v. Eulers sind von vielen Seiten bestätigt worden⁸⁾.

Wie R. Kuhn und E. Lederer⁹⁾ gezeigt haben, ist das Carotin der Karotte ein Gemisch von Kohlenwasserstoffen. Die bisher in reinem Zustande gewonnenen Komponenten α - und β -Carotin, deren Isolierung und Eigenschaften ausführlich beschrieben sind¹⁾, haben wir an A-vitaminfrei ernährten Ratten geprüft.

Seit Anfang Januar sind die folgenden 10 Präparate, die Hr. E. Lederer dargestellt hat, an 187 Ratten geprüft worden:

*) Vorgetragen von R. Kuhn auf der Versammlung südwestdeutscher Chemie-Dozenten in Würzburg am 28. April 1931.

¹⁾ I. Mittel.: R. Kuhn und E. Lederer, *B.* **64**, 1349 [1931].

²⁾ *Science* **50**, 352 [1919]; H. Steenbock u. P. W. Boutwell, *Journ. biol. Chem.* **41**, 81 [1920]; **42**, 131 [1920]; H. Steenbock u. E. G. Groß, *Journ. biol. Chem.* **40**, 511 [1919]; **41**, 149 [1920]; **51**, 63 [1922].

³⁾ *Journ. biol. Chem.* **46**, XXXII [1921].
⁴⁾ J. C. Drummond, *Biochem. Journ.* **13**, 81 [1919]; J. C. Drummond u. K. H. Coward, *Biochem. Journ.* **14**, 668 [1920]; O. Rosenheim u. J. C. Drummond, *Lancet* **1920**, 1, 862; J. C. Drummond, H. J. Channon u. K. H. Coward, *Biochem. Journ.* **19**, 1047 [1925].

⁵⁾ *Biochem. Ztschr.* **203**, 370 [1928].
⁶⁾ *Helv. chim. Acta* **12**, 278 [1929]; H. v. Euler, P. Karrer u. M. Rydbom, *B.* **62**, 2445 [1929].

⁷⁾ *Helv. chim. Acta* **13**, 1078 [1930].
⁸⁾ D. L. Collison, E. M. Hume, J. Smedley-Maclean u. H. Henderson-Smith, *Biochem. Journ.* **23**, 634 [1929], fanden Carotin aus Spinat, Karotten und Kohl in Tagesdosen von 0.002—0.005 mg wirksam. Th. Moore, *Lancet* **1929**, 499; *Biochem. Journ.* **23**, 803 [1929]. M. Javillier, *Compt. rend. Acad. Sciences* **190**, 665 [1930].

⁹⁾ *Naturwiss.* **19**, 306 [1931].

1. α -Carotin, Schmp. 174–175° (korr.), $[\alpha]_{\text{Cd}}^{20} = +365^{\circ}$ (Benzol), aus Karotten durch fraktionierte Fällung mit Jod und fraktionierte Adsorption an Fasertonerde gereinigt.

2. α, β -Carotin, Schmp. 175–176°, $[\alpha]_{\text{Cd}}^{20} = +75^{\circ}$ (Benzol), 1 Stde. bei 20° mit 2 Molen Diazo-methan in Benzol-Lösung behandelt und mehrfach aus Benzol-Methanol umkrystallisiert.

3. α, β -Carotin, Schmp. 181–182°, $[\alpha]_{\text{Cd}}^{20} = 45^{\circ}$ (Benzol), aus Karotten über das Dijodid, das mit Thiosulfat zerlegt wurde, gereinigt. Nach wiederholter Krystallisation aus Benzol-Methanol war vielleicht noch etwas Iso-carotin⁹⁾ vorhanden.

4. β -Carotin, Schmp. 180–181°, $[\alpha]_{\text{Cd}}^{20} < 5^{\circ}$ (Benzol), aus Winterspinat gewonnen, ausschließlich durch Krystallisationen gereinigt.

5. β -Carotin, Schmp. 181–182°, $[\alpha]_{\text{Cd}}^{20} < 5^{\circ}$ (Benzol), in gleicher Weise aus 8 Monate lang gelagertem Brennessel-Mehl gewonnen.

6. β -Carotin aus Paprika¹⁰⁾. Das Ausgangsmaterial hatte Hr. L. Zechmeister in freundlicher Weise zur Verfügung gestellt. Schmp. 178–179°.

7. Gemisch von α -¹¹⁾ und β -Carotin aus Karotten, 1 Stde. in siedendem Toluol unter CO₂ erhitzt (110°). Aus Benzol-Methanol umkrystallisiert. $[\alpha]_{\text{Cd}}^{20} = +260^{\circ}$.

8. Natürliches Gemisch von α - und β -Carotin aus Karotten vom Schmp. 176° (korr.) und $[\alpha]_{\text{Cd}}^{20} = +45^{\circ}$, in Benzin (Sdp. 70–80°) gelöst durch Fasertonerde filtriert, so daß über 80% des Farbstoffes adsorbiert wurden. Das Filtrat im Vakuum verdampft und in Arachisöl gelöst.

9. Zwischenfraktion von α - und β -Carotin, durch systematische Krystallisationen so gereinigt, daß eine zwischen α - und β -Carotin etwa noch vorhandene dritte Komponente stark angereichert sein müßte. $[\alpha]_{\text{Cd}}^{20} = +200^{\circ}$ (Benzol).

10. Iso-carotin, Schmp. 185–186°, Absorptionsbanden wie angegeben⁹⁾, vielleicht noch 10% β -Carotin enthaltend.

Die nach der kurativen Methode erhaltenen Ergebnisse lassen sich dahin zusammenfassen, daß α -Carotin (Präp. 1) und β -Carotin (Präp. 4) Wachstumswirkungen von gleicher Größenordnung hervorrufen. 0.005 mg pro Tag und Ratte bewirken in beiden Fällen gutes, 0.01 mg starkes Wachstum. Nach den Kurven auf S. 1863 und S. 1864 beträgt der durchschnittliche Gewichtszuwachs bei 0,005 mg α - oder β -Carotin 1.2–1.6 g im Tag, innerhalb der Fehlergrenzen der Methodik¹¹⁾ für beide Präparate übereinstimmend. Die in gleicher Weise vorgenommene Prüfung der anderen Präparate hat ergeben, daß die Wirksamkeit des Carotins durch Behandeln mit Diazo-methan (Präp. 2) nicht wesentlich verändert wird. Bei direktem Vergleich der Präparate 1 und 2 stimmten die Gewichtskurven vollkommen überein.

Für β -Carotin ergab sich, daß seine Wirksamkeit innerhalb der Fehlergrenzen unabhängig davon ist, ob es aus dem Carotin der Karotte durch Reinigung über das Dijodid (Präp. 3) oder aus Spinat (Präp. 4) oder aus Brennesseln (Präp. 5) ausschließlich durch fraktionierte Krystallisationen

¹⁰⁾ Optisch inaktiv.

¹¹⁾ J. C. Drummond u. A. Morton, Biochem. Journ. 23, 785 [1929]; S. V. Gud-jónsson, s. S. 1863 Anm. 19.

dargestellt wird. Das aus Paprika dargestellte β -Carotin (Präp. 6) zeigte ein abweichendes Verhalten, insofern als die Tiere, die 0.05, 0.02 und 0.01 mg pro Tag erhielten, 11–13 Tage lang keine Gewichtszunahme zeigten, dann aber sehr rasch (2.0–2.5 im Tag) wuchsen.

Eine entscheidende Änderung der Wachstumswirkung konnte an natürlichen Gemischen von α - und β -Carotin weder durch Erhitzen auf 110° (Präp. 7), noch durch fraktionierte Adsorption an Faserterre (Präp. 8) erzielt werden.

Nach der mit Präp. 9 angestellten Versuchsreihe ist es wenig wahrscheinlich, daß in den verarbeiteten Karotten ein in den Eigenschaften zwischen α - und β -Carotin liegender Kohlenwasserstoff vorkommt, dessen Wirksamkeit erheblich größer oder geringer ist. Iso-carotin (Präp. 10), dessen Prüfung noch nicht abgeschlossen ist, scheint unwirksam zu sein. Die mit großen Dosen (0.06 mg) beobachteten geringen Gewichtszunahmen könnten durch einen etwaigen Gehalt von 10% β -Carotin erklärt werden.

Die Erkenntnis, daß im Carotin aus Karotten ein Gemisch von Kohlenwasserstoffen vorliegt, hat seit der ersten Veröffentlichung⁹⁾ bereits von zwei Seiten eine willkommene Bestätigung erfahren¹²⁾, indem durch fraktionierte Krystallisationen Präparate von $[\alpha]_D^{20} = +135^\circ$ bzw. $+110^\circ$ erhalten wurden. In einer soeben erschienenen Mitteilung machen P. Karrer, H. v. Euler, H. Hellström und M. Rydholm¹³⁾ bereits vorläufige Angaben über die biologische Prüfung solcher Fraktionen. Sie schätzen die Wachstumswirkung ihres „ α -Carotins“, das dem Drehungsvermögen nach nur etwa ein Drittel α -Carotin enthalten dürfte, auf 0,5 bis 0,8 g, die Wirkung von β -Carotin auf 1.0 g bei Tagesdosen von 0.01 mg pro Ratte. Wäre es berechtigt, die wenigen, vielfach nur 2–3 Wochen in der Nachperiode angestellten Versuche so genau auszuwerten, so würde sich für α -Carotin von $[\alpha]_D^{20} = +365^\circ$, wie wir es untersucht haben, vollständige oder doch nahezu vollständige Wirkungslosigkeit ergeben. Nach unseren Versuchen sind, im Gegensatz zu diesen Angaben, α - und β -Carotin Wachstumsstoffe von nahezu gleicher Wirksamkeit. Ob das eine oder das andere Carotin etwas stärker wirkt, wird sich nur an einem sehr großen Tiermaterial sicher feststellen lassen. Wir müssen auch jetzt noch die Möglichkeit offen lassen, daß weder α - noch β -Carotin ein Vitamin bzw. Provitamin des Wachstums darstellen, sondern ein weiterer Stoff, der beide Carotin-Komponenten bei der Fraktionierung zu begleiten vermag.

Für die Beurteilung unserer Versuche ist die Feststellung wichtig, daß α - und β -Carotin im Organismus der Ratte, soweit noch unveränderter Farbstoff gefunden wird, keine gegenseitige Umwandlung erleiden. Wir haben wiederholt Kot und Leber der Tiere untersucht und gefunden, daß nach Fütterung mit α -Carotin nur α -Carotin (1. Absorptionsbande in CS_2 bei 511 $m\mu$), nach Fütterung mit β -Carotin nur β -Carotin (1. Absorptionsbande in CS_2 bei 521 $m\mu$) spektroskopisch nachzuweisen ist.

Nach Th. Moore¹⁴⁾ gibt das Leberöl A-vitaminfrei ernährter Ratten mit Antimontrichlorid (Carr-Price) keine Blaufärbung. Nach Fütterung mit Carotin fällt die Reaktion positiv aus. Durch Verabreichung des Leberöls carotin-gefütterter Ratten an andere A-vitaminfrei ernährte Tiere konnte

¹²⁾ P. Karrer, A. Helfenstein, H. Wehrli, B. Pieper u. R. Morf, *Helv. chim. Acta* 14, Mai [1931]; O. Rosenheim u. W. W. Starling, *Meeting Biochem. Soc. (Oxford)*, 16. Mai 1931.

¹³⁾ *Svensk kem. Tidskrift* 43, 105 [1931].

¹⁴⁾ *Biochem. Journ.* 24, 692 [1930].

Th. Moore Wachstum erzielen. Er schließt daraus, daß das Carotin eine Vorstufe des Wachstums-Vitamins darstellt und erst in der Leber in dieses übergeht.

Die Beobachtung, daß das Leberöl A-vitaminfrei ernährter Ratten mit Antimontrichlorid keine Farbreaktion gibt, konnten wir bestätigen. Wir haben darauf 14 solcher Ratten, die 14 Tage gewichtskonstant waren, während 6 Tagen mit insgesamt je 2.85 mg α - bzw. β -Carotin gefüttert, wobei sie stark wuchsen. Die Leberöle wogen 0.10–0.13 g und enthielten nach colorimetrischer Bestimmung durchschnittlich

etwa 0.010 mg α -Carotin (8 Ratten),

etwa 0.010 mg β -Carotin (6 Ratten).

Danach ist die Speicherung beider Carotin-Komponenten in der Leber unter den angeführten Bedingungen nicht nennenswert verschieden. Die Blaufärbung der Leberöle (0.1 g in 0.2 ccm Chloroform¹⁵⁾) auf Zusatz von Antimontrichlorid (1 ccm gesättigte Chloroform-Lösung) wurde so rasch als möglich mit einer Lösung von 6.50 g $\text{CuCl}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ und 0.30 g $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ in 100 ccm Wasser colorimetrisch verglichen (Mikro-Hellige-Colorimeter). Die Lösung war in der Nuance gut vergleichbar mit der Blaufärbung, welche die Leberöle der β -Carotin-Ratten gaben. Die Leberöle der α -Carotin-Ratten lieferten ein violettstichigeres, sehr schnell verblassendes Blau. Soweit unter diesen Umständen ein Vergleich berechtigt ist, geben die Leberöle der β -Carotin-Ratten etwa 10-mal stärkere Blaufärbung mit Antimontrichlorid als die der α -Carotin-Ratten, nämlich auf die ganzen Lebern bezogen:

20–35 mm blaue Standard-Lösung (α -Carotin),

240–400 mm blaue Standard-Lösung (β -Carotin).j

Daraus ergibt sich, daß Carotin-Präparate, die nahezu gleiche Wachstumswirkung geben, keineswegs zur Bildung gleicher A-Vitamin-Mengen in der Leber führen, wenn man diese durch die Antimontrichlorid-Reaktion zu erfassen versucht. Da die Versuchsdauern kurz waren, könnte der Unterschied auf einer verschiedenen raschen Umsetzung von α - und β -Carotin oder einer verschiedenen Speicherung der Umwandlungsprodukte im Organismus der Ratte beruhen. Er könnte, wenn keine Störung der Antimontrichlorid-Reaktion bei den Leberölen der α -Tiere vorliegt, auch mit der Bildung verschiedener Stoffe aus α - und β -Carotin zusammenhängen. Zwischen diesen Möglichkeiten wird sich erst durch langdauernde Versuche und durch die biologische Prüfung der mit α - und β -Carotin erhaltenen Leberöle entscheiden lassen.

Beschreibung der Versuche.

Zur Prüfung der Carotin-Präparate dienten Wistar-Ratten (G), die teils von den Glaxo Research Labor., London, bezogen, teils von uns daraus weitergezüchtet waren. Für viele Versuche dienten Albino-Ratten aus einer anderen eigenen Zucht (H).

Die Grundnahrung bestand nach Th. Moore¹⁶⁾ aus 20 Tln. Casein, 60 Tln. Reisstärke, 15 Tln. Arachisöl und 5 Tln. Salzgemisch. Das Casein „zu Genußzwecken“ wurde 8 Stdn. mit siedendem Methanol extrahiert und 24 Stdn. in dünner Schicht bei 110–120° getrocknet. Die Reisstärke erhitzen wir ebenfalls 24 Stdn. auf 110–120°. Das Arachisöl (E. Merck) wurde unter

¹⁵⁾ Bei den α -Carotin-Ratten wurde das gesamte Leberöl, bei den β -Carotin-Ratten $\frac{1}{5}$ – $\frac{1}{10}$ verwendet.

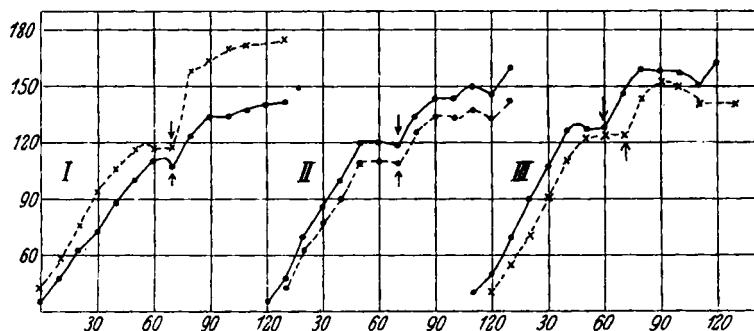
¹⁶⁾ Biochem. Journ. 23, 805 [1929].

Durchleiten von Luft 8 Stdn. auf 150° erwärmt. Das Salzgemisch nach E. V. Mc Collum und N. Simmonds¹⁷⁾ besteht aus NaCl 0.173, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{H}_2\text{O}$ 0.347, K_2HPO_4 0.954, $\text{CaH}_4(\text{PO}_4)_2 + \text{H}_2\text{O}$ 0.540, Ferrum citricum 0.118, Calciumlactat 1.3–1.4, MgSO_4 0.266. Die Grundnahrung wurde in Form von Kekes¹⁸⁾, die bei 120 – 130° gebacken wurden, verabreicht.

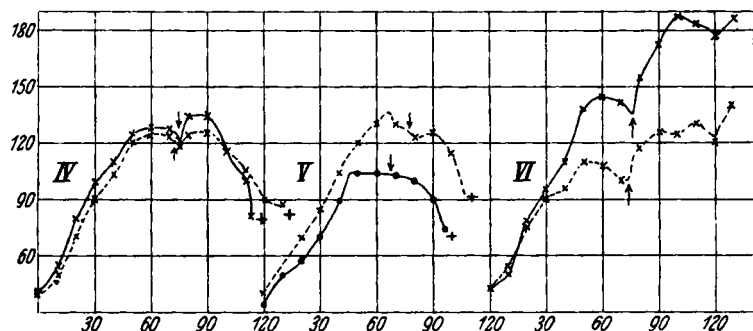
B-Vitamin wurde in Form von Marmite (0.5 g pro Tag), D-Vitamin als Vigantol (2 klinische Einheiten in der Woche) gegeben. C-Vitamin wurde nicht gegeben¹⁹⁾, Wasser war nach Belieben vorhanden.

Vor Beginn der Versuche warteten wir mindestens 14 Tage Gewichtskonstanz ab. Die Carotin-Präparate wurden in Arachisöl gelöst, das die Ratten aus kleinen Glasnöpfen quantitativ ausleckten.

Zur Aufstellung der Gewichtskurven, von denen wir hier nur einige Beispiele anführen können, wurden die Ratten jeden zweiten Tag auf 0.5 g genau gewogen. Auf der Abszisse ist die Zeit in Tagen, auf der Ordinate das Gewicht in Gramm abgetragen. Die Gewichtskurven der Männchen sind mit Kreuzchen bezeichnet, die der Weibchen mit Punkten. Der Abstand zwischen zwei Kreuzchen bzw. zwei Punkten entspricht



0.030 mg α -Carotin (1) 0.010 mg α -Carotin (1) 0.005 mg α -Carotin (1)



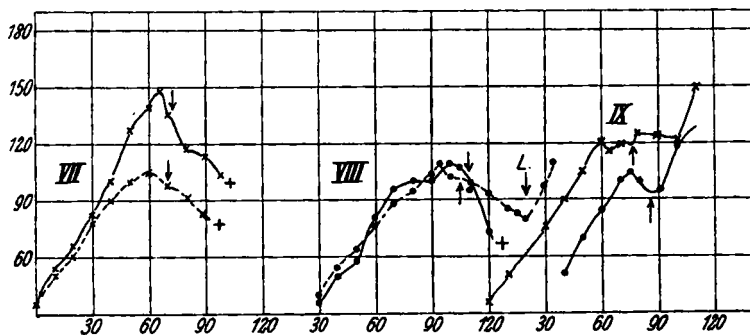
0.0017 mg α -Carotin (1) 0.0006 mg α -Carotin (1) 0.005 mg β -Carotin(4)

¹⁷⁾ Journ. Biol. Chem. **33**, 55 [1918].

¹⁸⁾ Nach Aron u. Gralka, Abderhaldens Hdb. IV, 9, S. 156.

¹⁹⁾ vergl. dazu S. V. Gudjónsson, Experiments on Vitamin A deficiency in rats and the quantitative determination of Vitamin A. Levin und Munksgaard, Kopenhagen 1930, S. 74.

einer Zeit von 10 Tagen. Die Pfeile bezeichnen den Zeitpunkt, von dem ab Carotin gefüttert wurde. Der zweite mit L bezeichnete Pfeil in Fig. VIII gibt den Zeitpunkt an, von dem ab 20 blaue Einheiten eines Lebertrankkonzentrates (British Drug House) täglich gegeben wurden. Die eingeklammerten Zahlen unter den Diagrammen geben die Nr. der Carotin-Präparate an.



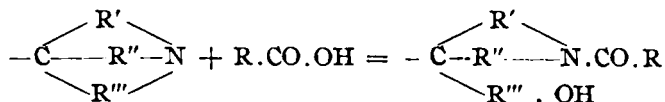
0.0017 mg β Carotin (4) 0.0006 mg β -Carotin (4) $\times - \times - \times$ 0.005 mg β -Carotin¹⁾ (4)
 ● - ● - ● 0.005 mg α -Carotin (1)

287. Julius v. Braun und Karl Weißbach: Die Einwirkung organischer Säuren auf tertiäre Amine, III. Mitteilung: Versuche mit Tropin und mit China-Alkaloiden.

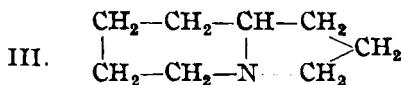
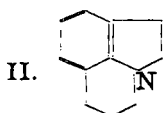
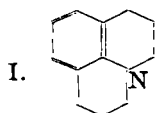
[Aus d. Chem. Institut d. Universität Frankfurt a. M.]

(Eingegangen am 9. Juni 1931.)

Die nach der Gleichung: $(R')(R'')(R''')N + R.CO.OH = (R')(R'')N.CO.R + R'''.OH$ mit Hilfe organischer Säuren erfolgende Entalkylierung offener tertiärer Basen¹⁾, denen sich auch monocyclische $R' \diamond N - R''$ zur Seite stellen, muß offensichtlich zu einer Ringsprengung führen, wenn die Reaktion auf solche bi- bzw. polycyclischen tertiären Amine angewandt wird, in denen der Stickstoff gleichzeitig zwei Ringen angehört und kein offenes Alkyl trägt:



Wir kennen in der organischen Chemie leider nur wenige Basen, die diesem bicyclischen Typus entsprechen: zu ihnen gehören unter den künstlich dargestellten Verbindungen das Julolidin (I), das Lilolidin (II)²⁾ und das Piperolidin (δ -Conicein) (III)³⁾:



¹⁾ J. v. Braun u. K. Weißbach, B. **63**, 489, 2018 [1930].

²⁾ J. v. Braun, K. Heider u. W. Wyczałkowska, B. **51** 1215 [1918].

³⁾ K. Löffler u. H. Kaim, B. **42**, 94 [1904]; K. Löffler u. M. Flügel, B. **42** 3420 [1909].