

443. G. Barger, F. Bergel und A. R. Todd*): Über das Thiochrom aus Vitamin B₁ (Antineurin).

[Aus d. Medizin.-chem. Institut d. Universität Edinburgh.]
(Eingegangen am 4. November 1935.)

Vor einiger Zeit haben R. Kuhn, Th. Wagner-Jauregg, F. W. van Klaveren und H. Vetter¹⁾ über die Isolierung eines gelben Farbstoffes aus Hefe berichtet, der in Lösung eine intensive blaue Fluoreszenz zeigt. Sie stellten dafür die Bruttoformel $C_{12}H_{14}ON_4S$ auf und schlugen den Namen „Thiochrom“ vor. Es wurde die Vermutung ausgesprochen, daß in dieser Substanz ein Dehydro-vitamin B₁ vorliegen könnte, da seine Bruttoformel eine große Ähnlichkeit mit der des Vitamins ($C_{12}H_{12}ON_4SCl_2$) aufweist und die Hefe verhältnismäßig reich an diesem Vitamin ist. Ein solcher Zusammenhang schien umso mehr wahrscheinlich, als fluoreszierende Substanzen bereits unter den oxydativen (in Lösung)²⁾ und thermischen³⁾ Abbauprodukten des Vitamins beobachtet worden waren.

Da, wie bekannt, es bisher nicht gelungen war, das Molekül des Vitamins unter milden oxydativen Bedingungen in kristallisierte fluoreszierende Derivate überzuführen, nahmen wir die Untersuchungen in dieser Richtung auf, in der Hoffnung, wenigstens Substanzen zu finden, die Ähnlichkeit mit dem schwer zugänglichen thermischen Abbauprodukt besitzen würden.

Wie schon an anderer Stelle⁴⁾ kurz berichtet, ist es gelungen, das Vitamin B₁ (= Antineurin, nach Jansens Vorschlag) mit einer Ausbeute von 33–40% in alkalischer Lösung bei 15–20° mit Kaliumferricyanid in eine Substanz von der Formel $C_{12}H_{14}ON_4S$ zu verwandeln, die sich mit Thiochrom als identisch erwies. Auch an dieser Stelle möchten wir Hrn. Prof. R. Kuhn, Heidelberg, unseren besten Dank dafür aussprechen, daß er freundlicherweise die angenommene Identität unseres Produktes mit seinem Thiochrom aus Hefe durch direkten Vergleich bestätigte (vergl. experimentell. Teil).

Zur Darstellung von Thiochrom ist es nicht unbedingt nötig, von reinem kristallisiertem Antineurin auszugehen. Bereits mehr oder weniger vorgereinigte Konzentrate aus Reis-Häutchen können auf die gleiche Weise wie das reine Antineurin zum Farbstoff verarbeitet werden. Doch zeigen die Ausbeuten dieser Versuche eine große Diskrepanz zu den möglichen, die sich aus dem durch biologischen Test bestimmten Gehalt an Antineurin errechnen lassen. Das Auftreten von blauer Fluoreszenz bei der Oxydation von Konzentraten mit Kaliumferricyanid kann als orientierender Test für Antineurin besonders im ultravioletten Licht verwendet werden; doch geben erst verhältnismäßig hochkonzentrierte Extrakte, wie das auch bei Peters' Formaldehyd-Azotest der Fall ist, reproduzierbare Resultate. Auch andere Oxydationsmittel, wie Wasserstoffsperoxyd, Selendioxyd, Kaliumpermanganat, sind imstande, Antineurin zum Thiochrom zu oxydieren, allerdings mit unbefriedigenden Ergebnissen. Blau fluoreszierende Lösungen, die in ihren Eigenschaften mit Lösungen von reinem Thiochrom identisch sind, können bereits durch autoxydative Einwirkung von Luft oder Sauerstoff

*) Beit Memorial Research Fellow. ¹⁾ Ztschr. physiol. Chem. **234**, 196 [1935].

²⁾ R. A. Peters, Nature **135**, 107 [1935].

³⁾ G. Barger, B. C. P. Jansen u. A. R. Todd, Chem. and Ind. **54**, 596 [1935].

⁴⁾ G. Barger, F. Bergel u. A. R. Todd, Nature **136**, 259 [1935].

auf die Lösungen der freien Vitaminbase entstehen, was auch das Vorkommen des Farbstoffes in der Hefe erklären könnte.

Die Existenz eines quartären Stickstoffatoms im Antineurin scheint ziemlich gesichert. Weisen doch seine allgemeinen Eigenschaften, die Sulfit-Spaltung von Williams⁵⁾, seine thermische Zersetzung⁶⁾ und die Resultate der elektrometrischen Titration⁷⁾ darauf hin, trotzdem letztere von den verschiedenen Autoren auf verschiedene Weise ausgedeutet werden. Unter dieser Voraussetzung sollte die Bruttoformel des Vitamin-Hydrochlorids $[C_{12}H_{17}ON_4S]Cl, HCl$, und die der freien Base, $C_{12}H_{18}O_2N_4S$ lauten. Deshalb ist es unmöglich, die Bildung von Thiochrom als eine einfache Dehydrierungs-Reaktion zu betrachten. Unterscheidet sich doch seine Formel von der des Vitamins um H_4O , d. i. $H_2O + H_2$. Diese Überlegung findet ihre Stütze in der Tatsache, daß das Thiochrom im biologischen Versuch (Herzfrequenz-Methode) sich als vollkommen inaktiv erweist⁸⁾ und bei der katalytischen Hydrierung nicht in Antineurin zurückverwandelt wird.

Unähnlich dem Vitamin, sublimiert Thiochrom unverändert im Hochvakuum bei 210—215°. Dies legt, neben seiner Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln, die Vermutung nahe, daß es kein quartäres Stickstoffatom mehr besitzt. Sein Hydrochlorid hat die ungewöhnliche Eigenschaft, sich zuerst in farblosen Kristallen abzuscheiden, um dann beim Filtrieren unter Entfernung der letzten Spuren des Lösungsmittels deutlich gelb zu werden. Eine Erklärung hierfür zu geben, ist schwierig. Eine Wasser-Anlagerung liegt nicht vor, da die gelbe Farbe auch in der Trockenpistole nicht verschwindet. Die Färbung hat vielleicht mit der Tatsache zu tun, daß die Analysen-Werte des Thiochrom-Hydrochlorids für Chlor zwischen einem und zwei Atomen liegen. Es muß also ein teilweiser Verlust an HCl bereits an der Luft eingetreten sein, was auf eine äußerst schwache basische Gruppe neben einer normalen schließen läßt.

Im Antineurin selbst ist nach allen vorliegenden Ergebnissen⁹⁾ neben dem quartären Stickstoff noch eine an einem Pyrimidinring gebundene NH_2 -Gruppe vorhanden. Diese Aminogruppe wird quantitativ durch konz. Salzsäure bei 100° als Ammoniak abgespalten. Unter gleichen Bedingungen gibt Thiochrom kein Ammoniak ab, sondern wird zum größten Teil unverändert wiedergewonnen. Außerdem läßt sich das desaminierte Vitamin, das in Lösung erhalten wurde und wahrscheinlich verwandt mit dem von Williams beschriebenen Chloro-oxy-vitamin¹⁰⁾ ist, durch Kaliumferricyanid nicht in blau fluoreszierende Produkte verwandeln. Daraus ergibt sich, daß diese Aminogruppe des Vitamins sicher an der Bildung des Thio-

⁵⁾ R. R. Williams, R. E. Waterman, J. C. Keresztesy u. E. R. Buchman, Journ. Amer. chem. Soc. **57**, 536 [1935]. ⁶⁾ a. a. O.

⁷⁾ T. W. Birch u. L. J. Harris, Nature **135**, 654 [1935]; R. C. G. Moggridge u. A. G. Ogston, Biochem. Journ. **29**, 866 [1935]; R. R. Williams u. A. E. Ruehle, Journ. Amer. chem. Soc. **57**, 1856 [1935].

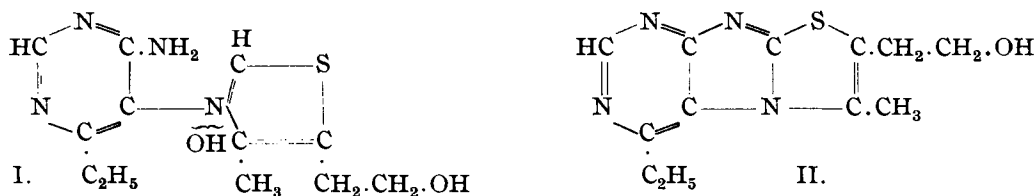
⁸⁾ Nach einer gerade erschienenen, etwas spekulativen Mitteilung von H. W. Kinnersley, J. R. O'Brien u. R. A. Peters, Biochem. Journ. **29**, 2369 [1935], soll eines der nicht isolierten „Quinochrome“ noch Vitamin-Wirkung zeigen, was wohl auf einer Überschätzung der Permanganat-Oxydation (in Gegenwart von Alkohol!) beruhen dürfte.

⁹⁾ vergl. R. R. Williams, E. R. Buchman u. A. E. Ruehle, Journ. Amer. chem. Soc. **57**, 1093 [1935].

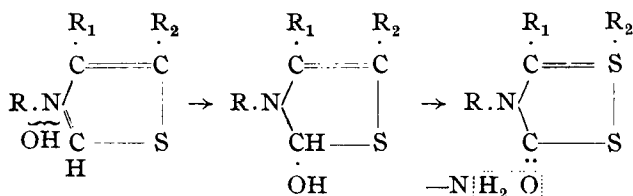
¹⁰⁾ E. R. Buchman u. R. R. Williams, Journ. Amer. chem. Soc. **57**, 1751 [1935].

chroms beteiligt ist. In diesem Zusammenhange mag erwähnt werden, daß auch Peters' Formaldehyd-Azotest von der Existenz dieser Gruppe abhängt, da er beim desaminierten Vitamin und dem Thiochrom völlig negativ ausfällt.

Die blaue Fluoreszenz des Thiochroms ist ähnlich der des 6,7-Dimethylalloxazins¹¹⁾. Es ist daher nicht ohne weiteres von der Hand zu weisen, daß Thiochrom ein Pyrimidazin-Derivat ist, um so mehr als Antineurin nach Williams von einem *o*-Diamino-pyrimidin abgeleitet werden kann. Wie bekannt, schlug Williams vor einiger Zeit¹²⁾ für das Vitamin die Konstitutionsformel I vor. Bei näherer Betrachtung ist es jedoch schwierig, sich



daraus die Bildung eines sechsgliedrigen Azinringes mit Hilfe von Kaliumferricyanid vorzustellen, in Anbetracht der Tatsache, daß der Schwefel im Thiochrom-Molekül erhalten bleibt. Es besteht keine große Wahrscheinlichkeit, daß die Methylgruppe des Thiazols einen solchen Ringschluß bewerkstelligt. In Analogie zu Pyridin-Derivaten scheint eher die Oxydation des Vitamins in Form der Pseudobase plausibel, wobei darauffolgend die gebildete Ketogruppe mit der freien Aminogruppe sich kondensieren könnte:



Benützt man Williams Vitamin-Formel I, so sollte die entstandene Verbindung die Struktur II haben. Daraus ergäbe sich auch eine zwanglose Erklärung dafür, daß der Schwefel im Thiochrom zum Unterschied vom Vitamin sich gegen Alkali stabil verhält. Es läge ein kondensiertes Thiazolin-Ringsystem vor, in dem der Schwefel analog dem Sauerstoff im Furan-Cumaron und dem Stickstoff im Pyrrol-Indol eine gewisse Unangreifbarkeit erworben hat. Ob ein solches System Fluoreszenz aufweist, kann nur die Synthese ergeben.

Versuche in der Richtung, derartige Verbindungen, aber auch solche mit sechsgliedrigen Azinringen aufzubauen, werden gerade unternommen. Im Verlauf dieser Synthesen entdeckten wir¹³⁾, daß *N*-Alkyl- und *N*-Arylthioamide sich verhältnismäßig leicht mit α -Chlor-ketonen umsetzen

¹¹⁾ R. Kuhn u. Mitarbeiter, a. a. O.

¹²⁾ R. R. Williams, Journ. Amer. chem. Soc. 57, 229 [1935].

¹³⁾ Mitbearbeitet von Dr. Karimullah.

und dabei direkt quartäre Thiazoliumsalze liefern. Wir erwähnen dies in diesem Zusammenhange, weil H. T. Clarke und S. Gurin¹⁴⁾ kürzlich die Darstellung von *N*-Phenyl-thiazoliumsalzen auf demselben Wege beschrieben haben. Unsere Resultate bestätigen und erweitern ihre Beobachtungen. Die Einzelheiten unserer Ergebnisse in dieser Richtung sollen in Kürze an anderer Stelle veröffentlicht werden.

Wir haben Hrn. Prof. B. C. P. Jansen, Amsterdam, für die Anregung zum Studium des Vitamins und die freundliche Überlassung eines Teiles des für unsere Versuche benötigten, krystallisierten Antineurins und dem Medical Research Council für die bewilligten Mittel bestens zu danken.

Beschreibung der Versuche.

Thiochrom aus Antineurin.

Zu einer Lösung von 20 mg Antineurin-Hydrochlorid in 1—2 ccm Methylalkohol werden 2 ccm 15-proz. methylalkohol. Kalilauge und 1 ccm 33-proz. wäßrige Kaliumferricyanid-Lösung hinzugefügt. Dann gibt man 10 ccm Butylalkohol, sowie die für die Lösung der anorganischen Salze nötige Menge Wasser hinzu, schüttelt die Mischung 2 Min. heftig und trennt die blau fluoreszierende Butylalkohol-Schicht ab. Diese Extraktion wird mit weiteren Mengen Butylalkohol solange wiederholt, bis der letzte Extrakt keine Fluoreszenz mehr zeigt. Die vereinigten butylalkoholischen Auszüge werden mit ein wenig Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet, um die letzten Spuren von Kaliumferricyanid zu entfernen. Schüttelt man die getrockneten Extrakte mit verd. Salzsäure ($p_H=2-3$), so verschwindet die blaue Fluoreszenz, und eine grünlich-gelbe Substanz geht in die Säure über. Die grün-gelbe saure Lösung wird abgetrennt und im Vakuum (Bad 40°) zur Trockne eingedampft. Der krystallinische Rückstand wird in wenig konz. Kalilauge (25-proz.) gelöst und wiederholt mit Chloroform extrahiert, bis die letzten Auszüge keine Fluoreszenz mehr zeigen. Die vereinigten Chloroform-Extrakte, die leuchtend blau fluorescieren, werden über Natriumsulfat und anschließend kurz über Kaliumcarbonat getrocknet. Schließlich wird im Vakuum auf etwa 3—4 ccm eingengt und in den Eisschrank gestellt. Nach einiger Zeit scheiden sich die schwefelgelben Krystalle des Thiochroms ab, die nach dem Umlösen aus Chloroform den Schmp. 221° (unkorr.) zeigen; Ausbeute 5—6 mg = 33—40% d. Th.

2.664 mg Sbst. (bei 80—100°, 0.1 mm getrockn.): 5.33 mg CO₂, 1.32 mg H₂O. — 1.571 mg Sbst.: 0.292 ccm N (20°, 757 mm). — 2.480 mg Sbst.: 2.220 mg BaSO₄.

C₁₂H₁₄ON₄S. Ber. C 54.9, H 5.3, N 21.4, S 12.2.

Gef. „ 54.6, „ 5.5, „ 21.6, „ 12.3.

Die Substanz besitzt alle Eigenschaften, die für das Thiochrom von Kuhn und Mitarbeitern¹⁵⁾ angegeben werden. Der Vergleich, den Prof. Kuhn mit seinem Thiochrom aus Hefe durchgeführt hat, ergab folgende Resultate: Beide Substanzen zeigten den Schmp. 226—227° (Berl-Block, abgekürztes Thermometer); der Misch-Schmp. ergab keine Depression; Absorptionsspektrum¹⁶⁾ und Fluoreszenz- p_H -Kurve waren identisch.

¹⁴⁾ Journ. Amer. chem. Soc. 57, 1876 [1935].

¹⁵⁾ a. a. O.

¹⁶⁾ Dr. E. B. Ludlam hatte schon vorher die große Ähnlichkeit der Absorptionsspektren festgestellt, wofür wir ihm bestens danken.

Thiochrom wird auf ähnliche Weise aus vorgereinigten Antineurin-Konzentraten aus Reis-Kleie dargestellt; die Ausbeute an krystallisiertem Material ist aber sehr viel geringer, als wenn man von reinem Vitamin ausgeht; denn es entstehen nebenbei ölige Substanzen von gelber Farbe, die nicht mehr zur Krystallisation gebracht werden können. Schwach alkalische Lösungen des Vitamins, die mit Luft, Sauerstoff, Wasserstoffsperoxyd und Kaliumpermanganat oder schwach saure, die mit Selendioxyd behandelt werden, ergeben ebenfalls thiochrom-haltige Lösungen, die aber vorläufig zu wenig günstigen Isolierungs-Ergebnissen führten. Um mit Hilfe des Auftretens der blauen Fluoreszenz Konzentrate auf Antineurin zu prüfen, hat man nur nötig, den jeweiligen Vitamin-Extrakt mit Butylalkohol auszuschütteln, die abgetrennte wäßrige Lösung alkalisch zu machen und mit Kaliumferricyanid zu versetzen. Eine weitere Extraktion mit Butylalkohol bringt im Falle eines an Thiochrom reichen Konzentrats die blaue Fluoreszenz im Butylalkohol schon am Tageslicht zur Erscheinung; im Falle an Thiochrom ärmerer Konzentrate wird die Fluoreszenz im ultravioletten Licht sichtbar. Diese Testmethode hat nur qualitativen Wert.

Eigenschaften des Thiochroms.

Thiochrom ist gut löslich in Methylalkohol, ziemlich gut in Wasser, mäßig in Äthylalkohol und ziemlich schwer löslich in Aceton, Chloroform und Äther. Es sublimiert im Hochvakuum unverändert bei einer Temperatur von 210—215°. Nach $\frac{1}{2}$ -stdg. Erhitzen in 20-proz. Natronlauge zeigt Thiochrom zum Unterschied vom Antineurin keine Nitroprussidnatrium-Reaktion auf S". Im biologischen Test nach der Herzfrequenz-Methode an Ratten¹⁷⁾ läßt das Thiochrom in Dosen von 5 γ , 10 γ und 20 γ keine physiologische Aktivität erkennen. Der Formaldehyd-Azotest nach R. A. Peters¹⁸⁾ ist vollkommen negativ im Falle des Thiochroms und seiner Leukoverbindung, die in Lösung mit Hilfe von Natriumhydrosulfit oder durch katalytische Reduktion (Platin-Kieselgur-Katalysator) erhalten werden kann. Das Leukothiochrom wird sehr leicht zum ursprünglichen Thiochrom zurückoxydiert.

Thiochrom-Hydrochlorid: Zu 8 mg Thiochrom, das in möglichst wenig Methylalkohol gelöst ist, werden das 4-fache Volumen an Aceton und einige Tropfen ätherischer Salzsäure hinzugefügt. Das Hydrochlorid, welches sich zuerst voluminös abscheidet, wird aus einer Mischung von Methylalkohol-Aceton umkrystallisiert. Es bildet fast farblose Nadelchen, die sich selbst beim Trocknen im Exsiccator und in der Trockenpistole deutlich gelb färben.

2.580 mg Sbst.: 1.775 mg AgCl. — 3.471 mg Sbst.: 2.495 mg AgCl.

C₁₂H₁₄ON₄S, HCl. Ber. Cl 11.9.

C₁₂H₁₄ON₄S, 2HCl. Ber. Cl 21.2.

Gef. „ 17.02, 17.78.

Beim Erhitzen des Hydrochlorids in einem Schmelzpunkts-Röhrchen tritt oberhalb 200° langsame Zersetzung auf, wobei die Substanz bei 217—221° zu einer viscosen, rötlichen Flüssigkeit zusammenschmilzt.

Bei der katalytischen Hydrierung von 2 mg Hydrochlorid in verd. methylalkoholisch-salzsaurer Lösung mit Palladium--Katalysator wird nach

¹⁷⁾ T. W. Birch u. L. J. Harris, *Biochem. Journ.* **28**, 602 [1934].

¹⁸⁾ H. W. Kinnersley u. R. A. Peters, *Biochem. Journ.* **28**, 667 [1934].

einiger Zeit beim Abdampfen des Lösungsmittels im Vakuum eine sehr hygroskopische, farblose Substanz erhalten, die weder in alkalischer Lösung fluoresciert, noch leicht zum Thiochrom zurückoxydierbar ist. Die weitere Untersuchung dieser Substanz steht noch aus.

Desaminierungsversuche mit Antineurin und Thiochrom.

Antineurin-Hydrochlorid wird mit konz. Salzsäure 4 Stdn. in einem Einschlußrohr auf 100° erhitzt. Die Lösung wird eingengt, abgekühlt, mit Baryt alkalisch gemacht, das gebildete Ammoniak mittels eines Luftstroms in vorgelegte Schwefelsäure übergetrieben und in üblicher Weise titriert.

5.6 mg Antineurin-Hydrochlorid in 2 ccm konz. Salzsäure.

Ber. für 1 Mol NH_3 0.27 mg. Gef. NH_3 0.28 mg.

Der Formaldehyd-Azotest einer Lösung des desaminierten Vitamins ist negativ. Desgleichen führt die Oxydation einer solchen Lösung mit Kaliumferricyanid zu keinem fluoreszierenden Produkt.

Aus 5.18 mg Thiochrom, unter genau den gleichen Bedingungen mit Salzsäure behandelt, konnte kein abgespaltenes Ammoniak erhalten werden. Aus der Lösung ließ sich auf dem üblichen Wege Thiochrom wiedergewinnen, das keine Schmelzpunkts-Depression mit dem Ausgangsmaterial zeigte.

444. Heinz Ohle und Werner Gross:

Über die Reaktion einiger α, β -Diketo-säuren mit *o*-Phenylendiamin.

[Aus d. Chem. Institut d. Universität Berlin.]

(Eingegangen am 30. Oktober 1935.)

H. Erlbach und H. Ohle¹⁾ hatten gezeigt, daß die Umsetzung von 2.3-Diketo-gluconsäure-lacton (Dehydro-iso-ascorbinsäure) mit *o*-Phenylendiamin in 2Phasen verläuft. In der ersten Stufe bildete sich im äquimolekularen Verhältnis der beiden Reaktions-Teilnehmer die Verbindung $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_5\text{N}_2$, die als ein Oxy-chinoxalin-Derivat angesprochen wurde, in der zweiten Stufe mit einem 2. Mol. Phenylendiamin eine gelbe Verbindung $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_4\text{N}_4$. Als Bindungsstellen der Phenylendiamin-Gruppen kamen nur die C-Atome 1—3 der Dehydro-iso-ascorbinsäure in Betracht, ihre Bindungsart war aber noch nicht in allen Einzelheiten aufgeklärt. Um weitere Anhaltspunkte dafür zu finden, haben wir zunächst einige einfacher gebaute Ketocarbonsäuren mit der Gruppierung: $\cdot\text{CO}\cdot\text{CO}\cdot\text{COOH}$ auf ihr Verhalten gegen *o*-Phenylendiamin genauer untersucht.

Wir begannen mit der Umsetzung des Mesoxalsäure-diäthylesters. Im Molverhältnis 1 : 1 gab er in alkoholischer oder wässrig-alkoholischer Lösung den 2-Oxy-chinoxalin-3-carbonsäure-ester (I), der sich zu der bekannten, aber bisher anscheinend noch nicht auf diesem Wege hergestellten 2-Oxy-chinoxalin-3-carbonsäure²⁾ verseifen läßt. I reagierte unter diesen Bedingungen mit einem zweiten Mol. Phenylendiamin äußerst träge. Kocht man dagegen Mesoxalsäure-ester mit 2 Mol *o*-Phenylendiamin in Gegenwart von Essigsäure, so kann man bis zu 60% d. Th. einer sehr

¹⁾ B. 67, 555 [1934].

²⁾ vergl. Kühling, B. 24, 2368 [1891]; Hinsberg, A. 292, 248 [1896].