

Abbild. 1. Absorptionsspektrum von Nicotinsäure-amid in Wasser.
 Abscissen: Wellenlängen in $m\mu$. Ordinatens: $\alpha = (2.30/c \times d) \log I_0/I$.

Nicotinsäure ist aus Naturprodukten (Reis) schon mehrfach isoliert worden¹⁾. Ihr Amid haben O. Warburg und W. Christian²⁾ unter den Spaltprodukten gereinigter Coferment-Präparate aus Pferdeblut aufgefunden (10–20 mg aus 100 l Blut). Die von uns erzielte Ausbeute ist etwa 50-mal größer. Der hohe Gehalt des Herzmuskels an Nicotinsäure-amid ist bemerkenswert auch im Hinblick darauf, daß das Diäthylamid der Nicotinsäure als synthetisches starkes Herzmittel (Coramin) bekannt ist.

463. Richard Kuhn und Hellmuth Vetter: Zur Kenntnis des Thiochroms.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizin. Forschung, Heidelberg, Institut für Chemie.
 (Eingegangen am 13. November 1935.)

Der gelbe, blau fluoreszierende, schwefelhaltige Farbstoff aus Hefe, den wir unter dem Namen Thiochrom¹⁾ beschrieben haben, ist in größerer Menge (250 mg aus 4050 kg Hefe) dargestellt worden, so daß wir nun seine Eigenschaften und seine Beziehungen zum Vitamin B₁, auf die wir bereits aus dem Vergleich der Bruttoformel C₁₂H₁₄ON₄S mit C₁₂H₁₆ON₄S, 2 HCl geschlossen hatten, genauer angeben können.

Der Erwartung gemäß gelang es, kristallisiertes Vitamin B₁ zum Thiochrom zu dehydrieren. Die Bildungs-Bedingungen des Farbstoffes gestatten Schlußfolgerungen auf den Reaktions-Mechanismus und auf

¹⁾ U. Suzuki, Th. Shimamura u. S. Odake, *Biochem. Ztschr.* **43**, 89 [1912], G. Klein u. Mitarb., *Österr. botan. Ztschr.* **80**, 273 [1931]; U. Suzuki u. S. Matsunaga, *Journ. Agricult. Tokyo* **5**, 59 [1912]; C. Funk, *Journ. Physiol.* **46**, 173 [1913]; J. C. Drummond u. C. Funk, *Biochem. Journ.* **8**, 598 [1914]; C. Voegtlin, *Journ. Washington Acad. Sciences* **6**, 575 [1916]; R. R. Williams, *Philippine Journ. Science [A]* **11**, 49 [1915].

²⁾ *Biochem. Ztschr.* **275**, 464 [1935].

¹⁾ R. Kuhn, Th. Wagner-Jauregg, F. W. van Klaveren u. H. Vetter, *Ztschr. physiol. Chem.* **234**, 196 [1935].

die Konstitution. Von Bedeutung ist 1) die Wasserstoff-ionen-Konzentration, 2) das Redox-Potential des Dehydrierungsmittels. Es hat sich ergeben, daß nur in ätzalkalischer, nicht aber in soda-alkalischer, Lösung die Umwandlung des Vitamins in den Farbstoff leicht gelingt. Unter den Redox-Indicatoren, die bisher geprüft wurden, hat nur das Porphyrexid gute Ausbeuten an Thiochrom geliefert. Das Normal-potential des Porphyrexids liegt, wie vor kurzem gezeigt wurde²⁾, weit über demjenigen aller anderen organischen Farbstoffe und kommt demjenigen des Sauerstoffs (O₂) nahe. Für die Bildung dieses Radikals aus seiner Leuko-Verbindung dient Kaliumferricyanid in alkalischer Lösung, dessen Redox-Kurve diejenige des Porphyrexids allerdings erst bei p_H = 13 überschneidet³⁾. Bei diesem p_H kann demgemäß an Stelle von Porphyrexid⁴⁾ auch Kaliumferricyanid verwendet werden oder molekularer Sauerstoff, dessen Wirksamkeit freilich bei der Thiochrom-Bildung (wie auch in anderen Fällen) von der Anwesenheit geeigneter Katalysatoren abhängt⁵⁾.

Die Entstehung blau fluoreszierender Stoffe aus Vitamin B₁ durch Oxydation ist erstmals von R. A. Peters⁶⁾ beobachtet worden; die Bildung einer dem Thiochrom ähnlichen kristallisierten Verbindung haben im Anschluß an unsere erste Mitteilung G. Barger, F. Bergel und A. R. Todd⁷⁾ mit Hilfe von Kaliumferricyanid erzielt. Hr. Prof. G. Barger hatte die große Freundlichkeit, uns eine Probe des von ihm erhaltenen Dehydrierungsproduktes zum Vergleich mit Thiochrom zuzusenden. Wir fanden, daß diese Substanz mit dem von uns aus Hefe und aus Vitamin B₁ mit Porphyrexid dargestellten Thiochrom identisch ist: Schmp. 226—227⁰ (k. Th.), Schmp. des Thiochroms 227—228⁰ (k. Th.), Misch-Schmp. 227⁰ (k. Th.). Die Krystallform und die Intensität der Fluorescenz bei p_H = 7.8 stimmten genau überein, die im Tageslicht gelbe Farbe des Präparats war etwas intensiver.

Überraschend war die Beobachtung, daß Kaliumferricyanid in verd. Natronlauge, nicht aber in soda-alkalischer Lösung, Thiochrom bildet, denn das Redox-Potential des Systems Ferricyanid-Ferrocyanid ist im fraglichen Gebiet⁸⁾ unabhängig vom p_H. Diese Tatsache fand durch folgenden Versuch eine Erklärung: Vitamin B₁-Chlorhydrat (je 4 mg) wurden vor Zusatz des Ferricyanids a) in 5 ccm 2-n. Natronlauge gelöst und nach 1 Stde. (20⁰) mit 10 ccm n-Natriumbicarbonat-Lösung verdünnt, b) in 15 ccm 0.66-n. Natriumcarbonat gelöst. Die endgültige Zusammensetzung beider Lösungen war genau die gleiche. Auf Zusatz von Kaliumferricyanid verstärkte sich die bereits (O₂) vorhandene blaue Fluorescenz von Lösung a ganz außerordentlich zum intensiven Leuchten des Thiochroms, während Lösung b ganz unverändert (dunkel) blieb.

²⁾ R. Kuhn u. W. Franke, B. **68**, 1528 [1935].

³⁾ vergl. Abbild. 1 bei R. Kuhn u. W. Franke, a. a. O. und Abbild. 14 bei L. Michaelis, Oxydations-Reduktions-Potentiale, 2. Aufl. Berlin, 1933, S. 102.

⁴⁾ Chinon, das dem Porphyrexid im Redox-Potential unter den üblichen Redox-Indicatoren noch am nächsten kommt, konnte in alkalischer Lösung aus bekannten Gründen nicht verwendet werden. Mit Methylenblau gelingt die Bildung von Thiochrom nicht.

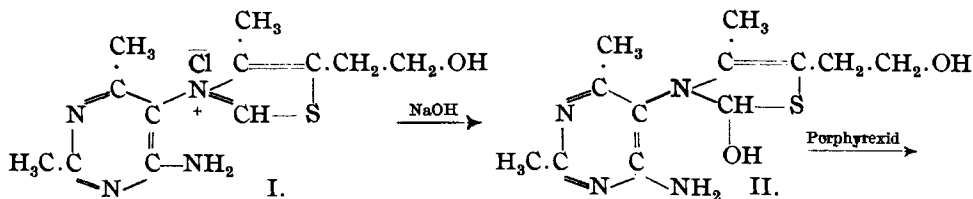
⁵⁾ Für die Bildung von Thiochrom in Hefe-Auszügen kommt die Einwirkung von O₂ in Gegenwart von Katalysatoren namentlich bei alkalischer Reaktion in Betracht.

⁶⁾ Nature **135**, 107 [1935].

⁷⁾ Nature **136**, 259 [1935].

Dieser Versuch beweist, daß die Einwirkung der verd. Natronlauge auf das Vitamin eine vorbereitende Reaktion der Farbstoffbildung ist, die von der eigentlichen Dehydrierung unabhängig ist.

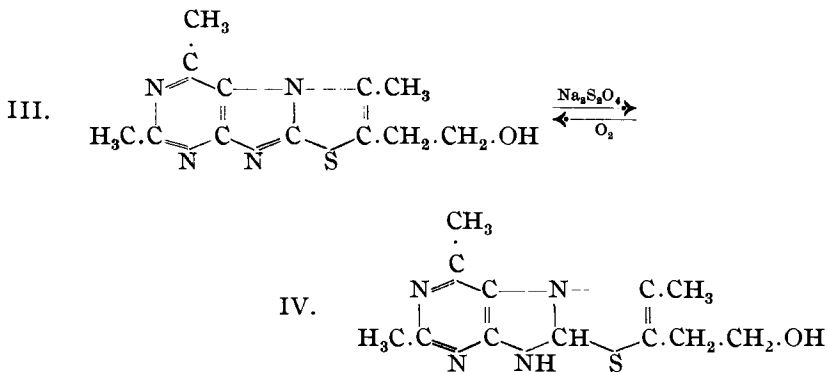
Nach der von R. R. Williams⁸⁾ für das Vitamin begründeten Formel I kann diese vorbereitende Reaktion nicht einfach die Bildung der Base aus dem quartären Salz sein, da sich in diesem Falle bei übereinstimmendem p_H gleiche Reaktionsfähigkeit ergeben sollte. Es muß sich vielmehr um die Bildung einer Pseudobase handeln, die entsprechend den von A. Hantzsch entdeckten Zeit-Phänomenen noch erhalten bleibt, wenn man die alkalische Lösung durch Zusatz von Bicarbonat in eine Carbonat-Lösung verwandelt. Für die Pseudobase des Vitamins B_1 , auf deren Existenz aus potentiometrischen Titrations bereits geschlossen wurde⁹⁾, kommt unter Zugrundelegung von I nur Formel II in Betracht. Erst an der Pseudobase setzt die Dehydrierung ein, über deren Verlauf folgende Beobachtungen Aufschluß geben: 1) Bei der Titration mit Porphyrexid reduziert 1 Mol Vitamin-Pseudobase 2 Mole Radikal. Die Abgabe von 2 H-Atomen entspricht dem Unterschied zwischen der Bruttoformel der hypothetischen Anhydrobase $C_{12}H_{16}ON_4S$ des Vitamins und derjenigen des Thiochroms $C_{12}H_{14}ON_4S$. 2) Die Zahl der C-ständigen Methylgruppen (3) erfährt keine Veränderung; bei der durchgreifenden Oxydation mit Chromsäure nach R. Kuhn und H. Roth geben Vitamin B_1 und Thiochrom übereinstimmende Ausbeuten an Essigsäure. 3) Die Bindungsart des Schwefels bleibt erhalten; Thiochrom spaltet wie Vitamin B_1 beim Erhitzen mit Natronlauge H_2S ab. 4) Die Aminogruppe und die Methingruppe des Vitamins gehen bei der Farbstoffbildung verloren; Thiochrom spaltet mit salpetriger Säure nach D. D. van Slyke keinen Stickstoff ab; es kuppelt nicht mit diazotierter Sulfanilsäure in Gegenwart von Formaldehyd. 5) Die entsprechend geänderte Basen-Dissoziationskonstante des Thiochroms ergibt sich aus der p_H -Abhängigkeit seiner Fluorescenz (Abbild. 2). 6) Die Aminogruppe beteiligt sich an der Bildung eines neuen Ringes, da nur konjugierte Systeme in cyclischer Anordnung dem Thiochrom vergleichbare Fluorescenz-Helligkeit zeigen (Schutz gegen löschende Stöße)¹⁰⁾. Das blau fluoreszierende Thiochrom ist mithin nach III zu formulieren. Es ist tricyclisch gebaut wie die grün fluoreszierenden Flavine.



⁸⁾ Journ. Amer. chem. Soc. **57**, 229 [1935]; R. R. Williams, E. R. Buchman u. A. E. Ruehle, Journ. Amer. chem. Soc. **57**, 1093 [1935].

⁹⁾ T. W. Birch u. L. J. Harris, Nature **135**, 654 [1935]; A. 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].

¹⁰⁾ K. W. Hausser, R. Kuhn u. E. Kuhn, Ztschr. physikal. Chem. (B) **29**, 417 [1935].



Die schwach gelbe Farbe des Thiochroms wird durch Formel III sehr gut erklärt, wenn man bedenkt, daß ein ringförmig gebundenes Schwefelatom (vergl. Benzol-Thiophen) nicht nur chemisch, sondern auch optisch einer Äthylengruppe entspricht. Unter diesem Gesichtspunkt stellt das Thiochrom ein durchkonjugiertes System dar. Die Reduktion zum farblosen, nicht fluoreszierenden Leuko-thiochrom (IV) ist von einer Unterbrechung der Konjugation begleitet.

Von besonderem Interesse war die Prüfung von reinem Thiochrom auf anti-neuritische Wirksamkeit. Es ergab sich, daß 180 γ und 300 γ an der Taube nicht den geringsten Einfluß auf die Krampf-Zustände haben. Dieses Ergebnis ist bei dem verhältnismäßig bedeutenden konstitutionellen Unterschied zwischen Vitamin und Farbstoff verständlich. Es ist nicht wahrscheinlich, daß die Wirkungsweise des Vitamins B₁ auf das Redox-Verhalten des Thiochroms zurückzuführen sein wird.

H. W. Kinnorsley, J. R. O'Brien und R. A. Peters¹¹⁾ haben jetzt ihre Beobachtungen über die Bildung von blau fluoreszierenden Lösungen aus Vitamin B₁ ausführlich beschrieben. Unter den dabei erhaltenen Chinochromen soll sich eine Verbindung befinden, die noch Vitamin B₁-Wirksamkeit (catatorulin Test) zeigt. Dazu möchten wir bemerken, daß wir verschiedentlich auch krystallisierte Thiochrom-Präparate in Händen hatten, die bei stimmenden Elementaranalysen noch nennenswerte B₁-Wirkung an der Taube zeigten, durch wiederholtes Umkrystallisieren aber ganz inaktiv wurden. Daß es verschiedene blau fluoreszierende Substanzen gibt, die sich aus Vitamin B₁ und weiterhin auch aus Thiochrom bilden, wird durch die folgende Beschreibung unserer Versuche bestätigt. Um unter ihnen das Thiochrom ausfindig zu machen, ist die p_H-Abhängigkeit der Fluorescenz und die Absorptionsbande bei 368 m μ (Abbild. 7) nützlich; zur entscheidenden Identifizierung empfehlen wir den Schmp. (Misch-Schmp.), obwohl das Schmelzen unter Zersetzung (Orangefärbung) stattfindet.

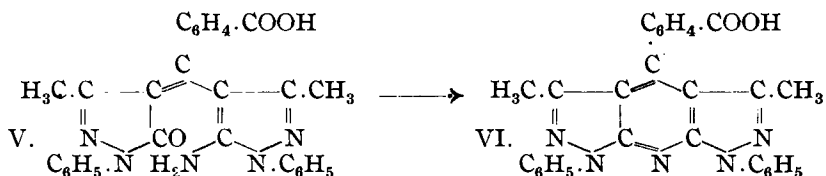
Nach Niederschrift dieser Abhandlung ist eine Arbeit von A. Windaus, R. Tschesche und R. Grewe¹²⁾ erschienen, die auf Grund rein theoretischer Betrachtungen für die Bildung von Thiochrom aus Vitamin B₁ einen Reaktions-Mechanismus vorschlagen, der sich von dem, den wir entwickelt haben

¹¹⁾ Biochem. Journ. **29**, 2369 [1935].

¹²⁾ Ztschr. physiol. Chem. **237**, 98 [1935].

(Formeln I—III), nur durch die Annahme einer Carbonylverbindung unterscheidet, die sich zwischen II und III durch Dehydrierung der Pseudobase vor Eintritt des Ringschlusses bildet. Für diese durchaus wahrscheinliche Annahme ergibt sich aus unseren Versuchen leider noch kein greifbarer Anhaltspunkt.

In einer Abhandlung von G. Rohde¹³⁾, die vor kurzem erschien, findet sich folgende schöne Analogie zur letzten Stufe der Thiochrom-Bildung:



Die Verbindung VI fluoresciert stark blau und gibt wie Thiochrom mit Mineralsäuren gelbe, grün fluoreszierende Salze.

Beschreibung der Versuche.

Fluoreszenz-Helligkeit.

Die maximale Fluoreszenz von Thiochrom in 0.01-*n*. Natronlauge liegt bei 460—470 μ ¹⁴⁾. Das blaue Fluoreszenz-Licht ist daher etwas violettstichiger als das von Chininsulfat in Wasser (Maximum: 470—480 μ). Für den quantitativen Vergleich am Stufen-Photometer diente eine 0.001-proz. Lösung von Thiochrom in *n*/₁₀₀-Natronlauge und eine 0.001-proz. Lösung von Chinin (Base) in 0.1-*n*. Schwefelsäure. Beobachtet wurde in 0.50-cm-Cuvetten im durchfallenden Licht (Abstand der Analysen-Quarzlampe von den Cuvetten = 30 cm) ohne Farbfilter bei etwa 20°. Unter diesen Bedingungen ist die Fluoreszenz-Helligkeit des Thiochroms 1¹/₂-mal so groß wie die des Chininsulfats (gef. 100 : 63.6). Vergleicht man eine 0.002-proz. Lösung von Chinin in *n*/₁₀-Schwefelsäure mit einer 0.002-proz. Lösung von Chinin in 1.5-proz. wäßrigem Alkohol, so findet man, daß die Base nur 6.4% der Fluoreszenz-Helligkeit des Sulfats zeigt. Thiochrom leuchtet also unter den angegebenen Bedingungen 24-mal heller als Chinin¹⁵⁾. Die Fluoreszenz einer 0.00000005-proz. Lösung von Thiochrom in *n*/₁₀₀₀-Natronlauge (1 mg Thiochrom in 2000 l, bzw. 0.0005 γ in 1 cc) ist eben noch sichtbar.

Konzentrations-Abhängigkeit der Fluoreszenz.

1 cc 0.00458-proz. Lösung von Thiochrom in Wasser wurde mit 1 cc Phosphat-Puffer (*m*/₅-Dinatriumphosphat, *m*/₁₀-Citronensäure; Mc Ilvaine; $p_{\text{H}} = 7.8$; Maximum der Fluoreszenz- p_{H} -Kurve) vermischt. Die entsprechende Fluoreszenz ist in Abbild. 1 als 100 eingetragen. Die weiteren Punkte wurden nach Verdünnung mit demselben Phosphat-Puffer gemessen. Dabei leuchteten die Lösungen in den Cuvetten (*d* = 0.50 cm) im gesamten Volumen, nicht nur an der der Quarzlampe zugewandten Seite.

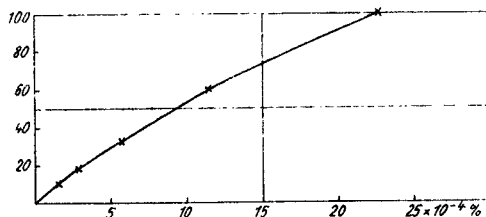
¹³⁾ Journ. prakt. Chem. [2] **148**, 325 [1935].

¹⁴⁾ d. h. rund 100 μ langwelliger als die Haupt-absorptionsbande.

¹⁵⁾ Für äquimolare Lösungen ergibt sich das Verhältnis 1:20. ($\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{ON}_4\text{S} = 262$, $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{O}_2\text{N}_2 = 324$.)

Thiochrom (%)	Fluorescenz	% Fluorescenz nach Verdünnung 1:2
0.00228	100	—
0.00114	59.8	59.8
0.00057	33.2	56.0
0.000285	17.9	54.2
0.000143	9.5	53.0

Zwischen Konzentration und Fluorescenz besteht also in dem untersuchten Gebiet keine genaue Proportionalität, doch nähert man sich dieser mit steigender Verdünnung.



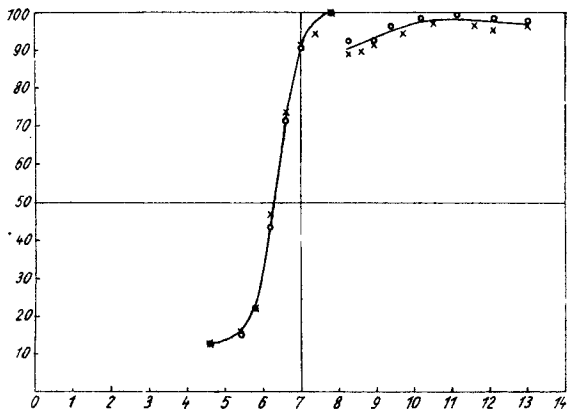
Abbild. 1: Konzentrations-Abhängigkeit der Fluorescenz.
 Abszissen: Konzentrat. in $10^{-4} \%$; Ordinaten: Fluorescenz-Helligkeit in %
 der bei $c = 22.8 \times 10^{-4} \%$ gefundenen Helligkeit.

Zur Prüfung auf einen Neutralsalz-Einfluß der Puffer wurde eine 0.002-proz. Thiochrom-Lösung in Wasser einmal mit der gleichen Menge $m/5$ -Phosphat— $m/10$ -Citronensäure, das anderemal mit der gleichen Menge $m/50$ -Phosphat— $m/100$ -Citronensäure von $p_H = 7.8$ verdünnt. Die Ablesung am Stufen-Photometer ergab keinen Unterschied (gef. 50.1: 50). Dasselbe ergab sich bei $p_H = 10.48$ mit $m/10$ - und $m/100$ -Glykokoll-Puffer (gef. 50.5: 50).

p_H -Abhängigkeit der Fluorescenz.

Je 1 ccm einer 0.002-proz. wäßrigen Thiochrom-Lösung wurde mit 1 ccm Puffer-Lösung verdünnt. Für $p_H = 4.6$ — 7.8 dienten Gemische vom $m/5$ -Dinatriumphosphat und $m/10$ -Citronensäure (Mc Ilvaine); für $p_H = 8.2$ — 13.0 Gemische von $m/10$ -Glykokoll, $m/10$ -Natriumchlorid und $n/10$ -Natronlauge (Sörensen). Die Fluorescenz wurde in 0.50-cm-Cuvetten mit dem Stufen-Photometer gemessen (Einstrahlung in der optischen Achse, Entfernung der Cuvetten vom Schwarzglas der Analysen-Quarzlampe = 30 cm). Zum Vergleich diente eine 0.001-proz. Thiochrom-Lösung von $p_H = 7.8$ (Phosphat-Puffer). Beobachtet wurde ohne Farbfilter bei etwa 20° .

Das Ergebnis der Messungen ist aus Abbild. 2 ersichtlich. Das aus Hefe und das durch Dehydrierung von Vitamin B_1 gewonnene Thiochrom stimmen sehr genau überein. Der Knick der p_H -Kurve bei $p_H = 8$ dürfte auf dem Übergang vom Phosphat- zum Glykokoll-Puffer beruhen. Bei p_H -Werten unter 6 schlägt die rein blaue Farbe des Fluorescenz-Lichtes nach grün-blau, später nach grün-gelb um (Salzbildung), so daß der unterste Teil der Kurve nicht mehr als wahre Dissoziationskurve betrachtet werden darf. Zu berücksichtigen ist ferner, daß in dem aus äußeren Gründen (Helligkeit der Fluores-

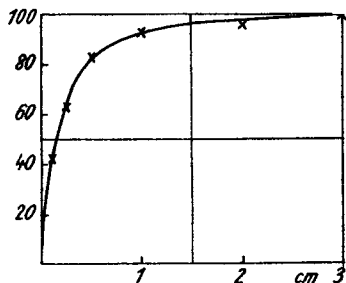


Abbild. 2. pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz.
 Abscissen: pH; Ordinaten: % der maximalen Fluoreszenz-Helligkeit.
 o o o Präparat aus Hefe; × × × Präparat aus kryst. Vitamin B₁.

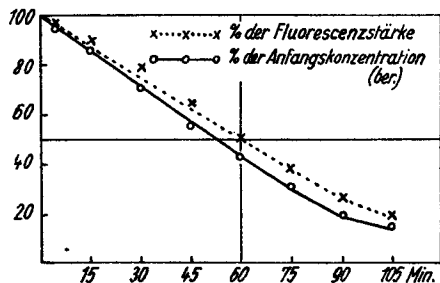
senz) angewandten Konzentrations-Bereich die Fluoreszenz-Stärke nicht ganz genau der Thiochrom-Konzentration proportional ist. Der dadurch bedingte Fehler beträgt maximal 10%. Soweit die Methodik, aus Fluoreszenz-pH-Kurven Dissoziationskonstanten zu berechnen, im vorliegenden Falle anwendbar ist, ergibt sich die Basen-Dissoziationskonstante des Thiochroms zu $k_b = 0.2 \cdot 10^{-7}$ (Wendepunkt bei $p_H = 6.3$). Thiochrom ist somit etwa 50000-mal stärker basisch als Lactoflavin ($k_b = 0.5 \cdot 10^{-12}$), und im Gegensatz zu diesem fehlen ihm auch saure Eigenschaften.

Schichtdicke und Fluoreszenz.

In einer Cuvette von $d = 0.10$ cm fluoresziert eine 0.00456-proz. Lösung von Thiochrom in Wasser in ihrem gesamten Volumen (30 cm vor dem Schwarzglas der Hg-Lampe). Bei $d = 1.00$ cm leuchtet die der Hg-Lampe abgewandte Seite nicht mehr. Demgemäß nimmt die Fluoreszenz-Helligkeit bei weiterer Erhöhung der Schichtdicke kaum mehr zu (Abbild. 3).



Abbild. 3.
 Schichtdicke und Fluoreszenz.
 Abscissen: Cuvetten-Dicke in cm;
 Ordinaten: % der maximalen Fluoreszenz-Helligkeit.



Abbild. 4. Kinetik der alkalischen Photolyse
 Abscissen: Belichtungsdauer in Minuten;
 Ordinaten: Fluoreszenz-Helligkeit in % der Helligkeit der unbelichteten Lösung, bzw. % der Anfangskonzentration.

Kinetik der alkalischen Photolyse.

In einer Glasschale haben wir Thiochrom (1 ccm = 52.8 γ) in $n/_{10}$ -Natronlauge aus 30 cm Abstand mit einer 500-Watt-Lampe 10, 40 und 90 Min. belichtet. Der Vergleich mit der unbelichteten Lösung am Stufen-Photometer ergab, daß die Fluorescenz-Intensität ganz unverändert war.

Im grellen Sonnenlicht (11. September 1935, wolkenlos, 12—14.30 Uhr) nahm dagegen die Fluorescenz dieser Lösung, die sich jetzt in einem gewöhnlichen Reagensglas von 1 cm Durchmesser befand, bald ab, nach 105 Min. auf 20% des Anfangswertes. Aus Abbild. 4 ist der Verlauf der alkalischen Photolyse ersichtlich.

Verhalten gegen Adsorptionsmittel.

Je 2 ccm einer Lösung von 5 mg Thiochrom in 100 ccm reinem Wasser wurden mit je 1 Spatelspitze verschiedener Adsorbentien 1 Min. geschüttelt. Nach dem Absitzen wurde die Fluorescenz-Stärke der überstehenden Lösungen mit derjenigen der Ausgangslösung vor der Analysen-Quarzlampe verglichen.

Es adsorbierten praktisch nicht: Aluminiumoxyd und Calciumcarbonat; mäßig bis stark: Kieselgur, Fullererde (braun), Talcum und Floridin XS; nahezu vollständig: Clarit, Frankonit SB, Floridin XXF und Fullererde (weiß). Seiner basischen Natur entsprechend, wird Thiochrom von sauren Silicaten besonders gut adsorbiert. Mit Frankonit KL und Granosil verschwand die Fluorescenz ebenfalls, doch beruhte die Erscheinung in diesen Fällen auf Salzbildung (Abgabe von Säure an die Lösung): wurde abfiltriert und mit etwas 2-n. Natronlauge versetzt, so leuchteten die Lösungen wieder stark blau. Das Adsorbat an Talcum fluoresciert sehr lebhaft.

Oxydation von Vitamin B₁ mit Porphyrexid.

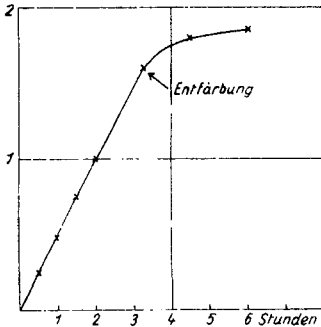
Eine Lösung von Vitamin B₁, 2 HCl in $n/_{10}$ -Natronlauge wird so lange mit einer wäßrigen Porphyrexid-Lösung versetzt, bis die rote Farbe der Lösung nur noch langsam verschwindet. 3.428 mg Vitamin B₁, 2 HCl (M.-G. 337) verbrauchten 0.9 ccm einer $n/_{50}$ -Porphyrexid-Lösung ($F = 1.027$); ber.: 2.0 Aequiv., gef.: 1.83 Aequiv. Zur Isolierung wird mit Chloroform extrahiert und wiederholt aus Chloroform umkrystallisiert. Die Eigenschaften des aus kryst. Vitamin erhaltenen Thiochroms sind aus Abbild. 2 und Abbild. 7 ersichtlich.

Katalytische Hydrierung.

a) In reinem Wasser: 3.254 mg Thiochrom in 2 ccm Wasser wurden mit 25.5 mg Palladiumoxyd¹⁶⁾ und Wasserstoff geschüttelt. Die Messung des H₂-Verbrauchs erfolgte nach R. Kuhn und E. F. Möller¹⁷⁾ bei 25°. Nach 17 Stdn. waren 0.80 Mol H₂ aufgenommen; der Endwert (170 Stdn.) entsprach 0.90 Mol. H₂. Die Fluorescenz der Lösung war am Ende viel geringer, aber nicht ganz verschwunden. b) In $n/_{10}$ -Salzsäure: Schneller läßt sich Thiochrom in saurer Lösung hydrieren. Für 3.530 mg Substanz in 2 ccm $n/_{10}$ -Salzsäure mit 21 mg Palladiumoxyd ergab sich die in Abbild. 5 dargestellte H₂-Aufnahme.

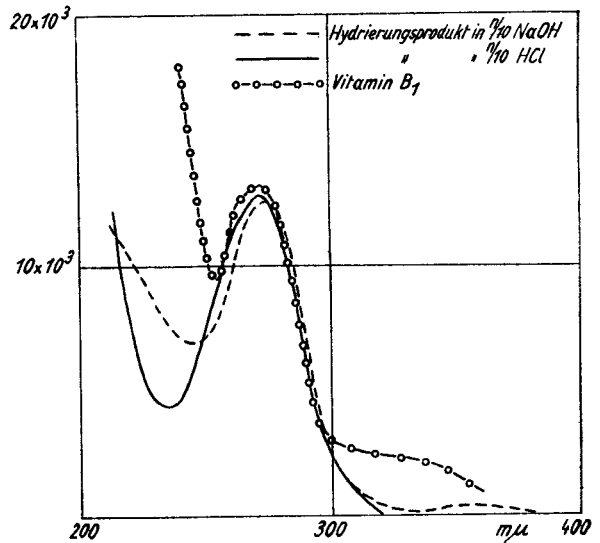
¹⁶⁾ R. L. Shriner u. R. Adams, Journ. Amer. chem. Soc. **46**, 1683 [1924].

¹⁷⁾ Angew. Chem. **47**, 145 [1934].



Abbild. 5.

Katalytische Hydrierung von Thiochrom in 0.1-n. Salzsäure. Abscissen: Zeit in Stdn.; Ordinaten: H_2 -Aufnahme in Molen.



Abbild. 6. Absorptionsspektren von hydriertem Thiochrom (in $n/10$ -HCl hydriert) und einer Lösung von Vitamin- B_1 -Hydrochlorid in n -NaOH (nach 7 Tagen gemessen).

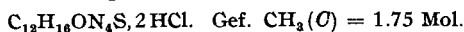
Abscissen: Wellenlänge in $m\mu$; Ordinaten: $\alpha = (2.30/c \times d) \log I_0/I$.

Es werden somit 2 Mol. H_2 bevorzugt aufgenommen. Die anfangs gelbe Lösung war nach der Hydrierung vollkommen entfärbt, die anfangs stark gelbgrüne Fluorescenz ganz schwach blau geworden. Das Absorptionsspektrum der hydrierten Lösung ist in Abbild. 6 (Kurve 1) dargestellt. Kurve 2 gibt das Spektrum des Hydrierungsproduktes in $n/10$ -Natronlauge an. Zum Vergleich ist das Absorptionsspektrum einer Lösung von Vitamin B_1 , 2 HCl in $n/1$ -Natronlauge, die 7 Tage bei 15–20° gestanden hatte, aufgetragen.

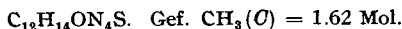
Vitamin B_1 (3.180 mg Dichlorhydrat) wurde ebenfalls in $n/10$ -Salzsäure (2 ccm) mit Palladiumoxyd (23.8 mg) hydriert. Schon nach 1 Stde. kam die H_2 -Aufnahme (1.08 Mol. H_2) zum Stillstand. Unter genau gleichen Bedingungen nimmt also das Vitamin 1 Mol. Wasserstoff weniger auf als das Thiochrom.

C-Methyl-Bestimmungen.

Bei der Oxydation mit Chromsäure nach R. Kuhn und H. Roth wurde gefunden: a) 7.116 mg Vitamin- B_1 -Dichlorhydrat: 3.70 ccm $n/100$ -NaOH.



b) 6.341 mg Thiochrom: 3.93 ccm $n/100$ -NaOH.



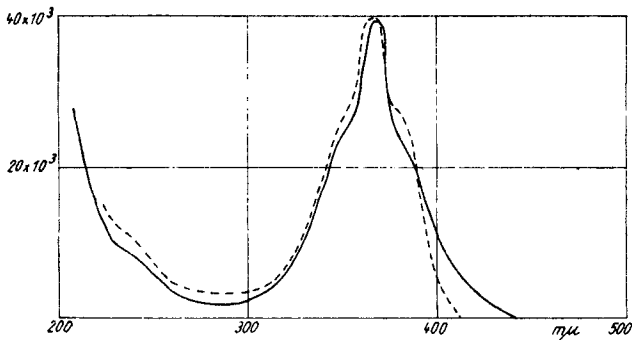
Es folgt, daß die Methylgruppe am Thiazolring sich nicht am Ringschluß bei der Dehydrierung des Vitamins zum Thiochrom beteiligt. Da im vorlie-

genden Falle mit einer durchschnittlichen Ausbeute an Essigsäure von nicht mehr als 50—60% d. Th. zu rechnen ist¹⁸⁾, muß man im Thiochrom wie im Vitamin B₁¹⁹⁾ 3 C-Methylgruppen annehmen.

„Methylimid“-Bestimmungen.

Wie Thiochrom und Vitamin B₁ geben noch andere Verbindungen, die frei von Methylimid-Gruppen sind, bei normaler Ausführung der Methylimid-Bestimmung nach Vieböck-Slotta-Haberland²⁰⁾ positive Werte. Der für 1 CH₃-Gruppe berechnete Wert wird erreicht bei Thiazol-Pikrat; bei 2-Amino-thiazol, 4-Methyl-thiazol-5-carbonsäure und bei Oxazolen bleiben die Werte hinter der „Theorie“ stark zurück.

Substanz	Formel (Mol.-Gew.)	„CH ₃ “ ber.	„CH ₃ “ gef.
Thiochrom	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ OS (262)	5.72	5.92
Vitamin B ₁	C ₁₂ H ₁₆ N ₄ OS, 2HCl (337)	4.45	4.03
„	C ₁₂ H ₁₆ N ₄ OS, 2HCl (337)	4.45	3.50
„	C ₁₂ H ₁₆ N ₄ OS, 2HCl (337)	4.45	3.31
„	C ₁₂ H ₁₆ N ₄ OS, 2Pikrolonsäure (792)	1.89	2.02
Thiazol-Pikrat	C ₃ H ₃ NS, C ₆ H ₃ O ₇ N ₃ (304)	4.93	4.72
2-Amino-thiazol	C ₃ H ₄ N ₂ S (100)	15.00	2.95
4-Methyl-thiazol-5-carbonsäure	C ₅ H ₅ NO ₂ S (133)	11.28	2.53
„	C ₅ H ₅ NO ₂ S (133)	11.28	2.34
2.5-Dimethyl-thio-diazol	C ₄ H ₆ N ₂ S (114)	13.16 ²¹⁾	0.0 _j
α, μ-Dimethyl-oxazol ...	C ₅ H ₇ NO (97)	15.5 ²¹⁾	0.95
β, μ-Dimethyl-oxazol ...	C ₅ H ₇ NO (97)	15.5 ²¹⁾	0.71



Abbild. 7. Absorptionsspektren von Thiochrom.
Abscissen: Wellenlänge in $m\mu$; Ordinaten: $x = (2.30/c \times d) \log I_0/I$.
.... = Thiochrom aus Hefe; — = durch Dehydrierung von Vitamin B₁ gewonnen.

¹⁸⁾ vergl. R. Kuhn u. F. L'Orsa, Ztschr. angew. Chem. **44**, 847 [1931].

¹⁹⁾ vergl. R. R. Williams, E. R. Buchman u. A. E. Ruehle, Journ. Amer. chem. Soc. **57**, 1093 [1935].

²⁰⁾ vergl. F. Pregl-H. Roth, Die quantitative organische Mikro-analyse, 4. Aufl., Berlin 1935, S. 234.

²¹⁾ Bei diesen Substanzen, bei denen das C-Atom zwischen den Heteroatomen eine Methylgruppe trägt, erschien die Bildung von Äthyljodid möglich.

3.586 mg Vitamin-B₁-Chlorhydrat verbraucht. bei 345° nach 3 Stdn. 2.37 ccm $n_{/50}$ -Na₂S₂O₃, 3.281 mg Vitamin-B₁-Chlorhydrat bei 350° nach 3 Stdn. 2.30 ccm $n_{/50}$ -Na₂S₂O₃.

6.064 mg Thiazol-Pikrat verbraucht. nach 6 Stdn. bei 340° 5.71 ccm $n_{/50}$ -Na₂S₂O₃. — 4.900 mg 2-Amino-thiazol verbraucht. nach 5 Stdn. bei 340° 2.89 ccm $n_{/50}$ -Na₂S₂O₃. — 3.904 mg 4-Methyl-thiazol-5-carbonsäure verbraucht. nach 4 Stdn. bei 340° 1.98 ccm $n_{/50}$ -Na₂S₂O₃, 3.945 mg Sbst. nach 3 Stdn. bei 330° 1.85 ccm $n_{/50}$ -Na₂S₂O₃. — 4.372 mg 2.5-Dimethyl-thiodiazol verbraucht. nach 1 Stde. bei 340° kein Thiosulfat. — 5.677 mg α , μ -Dimethyl-oxazol verbraucht. nach 3 Stdn. bei 345° 1.08 ccm $n_{/50}$ -Na₂S₂O₃. — 3.898 mg β , μ -Dimethyl-oxazol verbraucht. nach 3 Stdn. bei 335° 0.55 ccm $n_{/50}$ -Na₂S₂O₃. Bei allen Bestimmungen wurde 2—3-mal destilliert.

van Slyke-Bestimmung: 14.725 mg Thiochrom in Eisessig mit 30-proz. Natriumnitrit-Lösung 40 Min. geschüttelt. Gef. 0.52 ccm Gas; Leerwert vor der Bestimm.: 0.47 ccm; Leerwert nach der Bestimm.: 0.48 ccm. Für 1 NH₂-Gruppe berechnen sich 1.25 ccm N₂, während nur 0.04 ccm gefunden wurden. Vitamin B₁ reagiert unter den angegebenen Bedingungen auch kaum mit salpetriger Säure¹¹⁾.

Reduktion mit Zn in HCl: Die gelbe Lösung von Thiochrom in 10-proz. Salzsäure entfärbt sich auf Zusatz von Zinkspänen. Eine farbige (radikal-artige) Zwischenstufe ist dabei nicht zu beobachten.

In konz. Schwefelsäure löst sich Thiochrom mit weingelber Farbe; die Lösung fluoresciert schwach gelb-grün.

Beim Kochen mit 2-n. Natronlauge verschwindet die blaue Fluoreszenz des Thiochroms im Laufe einer Stunde vollständig. Die erkaltete Lösung färbt sich auf Zusatz von Nitroprussidnatrium intensiv violett (Na₂S). Durch Extraktion mit Chloroform erhält man eine merkwürdigerweise wieder blau-fluoreszierende, schwefel-freie Substanz. Diese fluoresciert aber auch in saurer Lösung blau (Gegensatz zu Thiochrom).

Hrn. Prof. A. Windaus und Hr. Prof. R. Stollé danken wir für die Überlassung der Thiazole, Hr. Doz. W. Keil für die Oxazole, die von den HHrn. H. Roth und H. W. Rzeppa auf ihr Verhalten bei der Methylimid-Bestimmung geprüft wurden. Der Firma E. Merck danken wir für die Überlassung von kristallisiertem Vitamin-B₁-Chlorhydrat. Besonderen Dank schulden wir dem Werk Elberfeld der I.-G. Farben und seinem Direktor H. Hörlein für die Unterstützung unserer Arbeit. Die Prüfung des Thiochroms an neuritischen Tauben wurde im Physiologischen Laboratorium der I.-G. Farben, Elberfeld von Hr. Dr. F. Schultz durchgeführt.