

### 326. Karl Heinrich Slotta und Klaus Neisser: Über Oxydationen mit Hypojodit, II. Mitteil.: Stickstoffhaltige Heterocyclen. Neue Bestimmungsmethode des Aneurins (Vitamin B<sub>1</sub>).

[Aus d. Forschungsabteil. d. Kaffee-Institutes, S. Paulo, Brasilien, Instituto Butantan.]  
(Eingegangen am 11. August 1938.)

In der ersten Mitteilung dieser Reihe<sup>1)</sup> berichteten wir über den quantitativen Verlauf der Oxydation von Diphenolen, Chinonen usw. mittels Hypojodits. So gelang es uns, neue Bestimmungsmethoden für eine Reihe von aromatischen Substanzen auszuarbeiten, darunter für Adrenalin und Tyrosin. Wir können heute darüber berichten, wie man die neue Methode auch bei gewissen stickstoffhaltigen Heterocyclen erfolgreich anwenden kann.

Es war uns nämlich aufgefallen, daß das Trigonellin, das Methylbetain der Nicotinsäure, quantitativ mit 5 Mol. Hypojodit (= 10 Atomen Jod) oxydiert werden kann, während sein Grundkörper, die Nicotinsäure, gegenüber Hypojodit vollkommen beständig ist.

Diese Tatsache überraschte zunächst. Sie wird jedoch verständlich, wenn man die in unserer vorigen Mitteilung<sup>1)</sup> angestellten Überlegungen zweckentsprechend auf diesen Fall anwendet: *o*- oder *p*-Diphenole werden durch Hypojodit in die entsprechenden Chinone übergeführt; das Chinon wird alsdann in den  $\alpha$ -Stellungen zu der —C:O-Gruppe jodiert und die Kohlenstoffkette zwischen der :CJ.C:O-Gruppe und dem benachbarten Kohlenstoffatom hydrolytisch gespalten; die Bruchstücke können nun weiter bis zu Jodoform oxydiert werden.

Der Unterschied zwischen Trigonellin und Nicotinsäure besteht nun einfach darin, daß die letztere im Gegensatz zum Trigonellin keine Gruppierung besitzt, die die Bildung einer chinon-ähnlichen Substanz ermöglichen könnte. Trigonellin jedoch, das in der alkalischen Lösung als quartäre Base vorliegt, kann durch Hypojodit zum Pyridon oxydiert werden. Damit liegt eine typisch chinonähnliche Struktur vor, und der weitere Angriff des Hypojodits kann in der oben dargelegten Weise vor sich gehen: Jodierung in  $\alpha$ -Stellung und hydrolytischer Zerfall, dann weitere Oxydation, die bis zum Jodoform gehen kann.

Ist diese Deutung des Reaktionsverlaufes richtig, so müßte auch Aneurin (Vitamin B<sub>1</sub>) in entsprechender Weise mit Hypojodit reagieren; es ist ja schon seit längerer Zeit bekannt, daß es sich in chemischer und physikalischer Hinsicht wie eine echte quartäre Base verhält. Unsere Erwartung wurde voll erfüllt: Aneurin<sup>2)</sup> reagiert mit alkalischer Jodlösung im konstanten molekularen Verhältnis von 1:6. Wir fürchteten anfänglich, daß die HO.CH<sub>2</sub>.CH<sub>2</sub>-Gruppe am Thiazolring ebenfalls von Hypojodit angegriffen werden könnte. Dies ist auch der Fall, wenn man die Reaktion bei zu hoher Temperatur vor sich gehen läßt. Oxydiert man jedoch bei 0°, so läßt sich diese Nebenreaktion ohne weiteres vermeiden. Das steht im besten Einklang mit den Angaben von J. Messinger<sup>3)</sup>, der die Oxydation von Aceton in Gegenwart von Äthylalkohol untersuchte; auch dabei reagiert der Äthylalkohol nicht mit, wenn die Oxydation unterhalb von 10° vorgenommen wird.

<sup>1)</sup> K. H. Slotta u. Kl. Neisser, B. **71**, 1611 [1938].

<sup>2)</sup> Für die Überlassung von reinstem Aneurin und Thiochrom danken wir der Fa. F. Hoffmann-La Roche, Basel, bestens.

<sup>3)</sup> B. **21**, 3366 [1888].

Der erste Angriff des Hypojodits auf das Aneurin besteht nach unserer Hypothese in der Umlagerung und Oxydation zum Thiazolon-Derivat. Man könnte nun erwarten, daß genau wie bei der Oxydation mit Kaliumferricyanid jetzt der Ringschluß zum Thiochrom eintritt. Man kann diesen Ringschluß auch erzielen, wenn man mit der genau nötigen Menge von Jod (2 Atomen) oxydiert. Hat man aber, wie stets bei unseren Versuchen, einen Überschuß an Hypojodit in der Lösung, so tritt dieser Ringschluß nicht ein, sondern die Reaktion läuft in anderer Weise weiter.

Dies konnten wir folgendermaßen beweisen: wenn man annimmt, daß die Oxydation des Aneurins über die Stufe des Thiochroms verlief, so müßten Aneurin und Thiochrom in gleichartiger Weise oxydiert werden, lediglich mit dem Unterschied, daß Thiochrom 2 Atome Jod weniger verbrauchen sollte. Wir stellten nun bei Versuchen mit Thiochrom fest, daß dieses zwar von Hypojodit angegriffen wird, daß die Reaktion jedoch nicht in einem konstanten und reproduzierbaren molekularen Verhältnis verläuft. Außerdem beobachtet man beim Arbeiten in genügend konzentrierter Lösung das Auftreten eines dunklen Niederschlages beim Ansäuern, der auch während der Titration mit Thiosulfat nicht in Lösung geht. Ist dann das gesamte überschüssige Jod entfärbt, so beginnt nach einer Weile der dunkle Niederschlag unter erneuter Jodausscheidung in Lösung zu gehen, so daß die Titration zu keinem klar definierten Endpunkt kommt.

Ganz anders verhält sich das Aneurin: beim Ansäuern tritt keinerlei Niederschlag auf, und die Titration „zieht“ nicht. Dieselbe Erscheinung wie beim Thiochrom kann man aber erzielen, wenn man, wie oben beschrieben, das Aneurin zunächst mit genau 2 Atomen Jod in alkalischer Lösung behandelt. Hierbei tritt die charakteristische blaue Fluoreszenz des Thiochroms auf, die sich durch Ausschütteln mit Chloroform noch schöner zeigen läßt. Daß nun wirklich Thiochrom in der Lösung vorliegt, geht eindeutig aus den Erscheinungen hervor, die man beobachtet, wenn man jetzt einen Überschuß an Hypojodit zugibt: nach dem Ansäuern fällt derselbe charakteristische dunkle Niederschlag wie beim Thiochrom aus, die Titration zieht, und es läßt sich kein molekulares Verhältnis zwischen Hypojodit und Aneurin mehr feststellen.

Wir haben uns bemüht, die Methode auch für sehr kleine Mengen anwendbar zu gestalten. Einer titrimetrischen Methode, selbst wenn sie einen so günstigen Faktor von Reagens zu Substanz wie die unsere besitzt, sind durch die Genauigkeit der Pipetten und Büretten stets natürliche Grenzen gesetzt. Aber innerhalb dieser Grenzen glauben wir das Mögliche erreicht zu haben. Es gelingt, Mengen von weniger als 1 mg mit einer Genauigkeit zu erfassen, die weit größer ist als die der biologischen Testmethoden. Die Konzentration der zu untersuchenden Lösungen spielt bei unserer Methode eine geringere Rolle als die vorhandene absolute Menge an Aneurin; es gelingt z. B. in gleich genauer Weise, eine Menge von 2 mg sowohl in 1 ccm als in 50 ccm zu titrieren. Zu beachten sind bei der neuen Methode lediglich zwei Dinge: der angewandte Überschuß an Jodlösung darf nicht zu gering sein (30—300%), und die Oxydation und Titration muß von Anfang bis Ende vollständig im schmelzenden Eise durchgeführt werden, um die Nebenreaktion der  $-\text{CH}_2\cdot\text{CH}_2\text{OH}$ -Gruppe zu vermeiden.

Ebenso wie bei den Titrationen der Diphenole<sup>1)</sup> kann man auch bei der Bestimmung des Aneurins die Jodlösung durch Kaliumbiodat ( $\text{KH}_2\text{O}_6$ )

ersetzen, wenn man zur salzsauren Aneurin-Lösung einige Körnchen reinstes Kaliumjodid zusetzt. Für Reihenanalysen hat die Bijodat-Lösung den Vorteil, daß ihr Faktor sich über unbegrenzte Zeit konstant hält.

Wir geben im folgenden die genaue Vorschrift zur Bestimmung des Aneurins und anschließend eine Auswahl von den über 100 Bestimmungen, die wir nach dieser Methode durchgeführt haben. Wir verwendeten reinstes krystallisiertes Aneurin-hydrochlorid, dessen Feuchtigkeitsgehalt von Zeit zu Zeit bestimmt und stets in Rechnung gestellt wurde. Er betrug (Trocknung im Hochvakuum bei 100°) durchschnittlich etwa 4%. Sämtliche Einwaagen sind auf Trockensubstanz bezogen.

#### Vorschrift zur maßanalytischen Bestimmung von Aneurin-hydrochlorid.

Die saure oder neutrale Lösung, die 0.8—4 mg Aneurin-hydrochlorid enthalten soll, wird mit 10 ccm 0.01-*n.* Jodlösung versetzt. Dann kühlt man im schmelzenden Eise und gibt tropfenweise 2-*n.* Natronlauge unter Umschwenken zu, bis das Jod entfärbt ist, und darüber hinaus noch einige Tropfen. Nun läßt man im schmelzenden Eise, möglichst im Dunkeln, 1 $\frac{1}{2}$ —2 Stdn. stehen, säuert dann mit 2-*n.* Schwefelsäure an und titriert das frei werdende Jod mit 0.05-*n.* Thiosulfatlösung zurück, die man aus einer 2 ccm fassenden Mikrobürette zufließen läßt. Das Ansäuern und die Titration hat ebenfalls im schmelzenden Eise zu geschehen.

Berechnung: Man rechnet zunächst die Anzahl ccm Jodlösung und Thiosulfatlösung auf genau 0.05-*n.* Lösungen um und ermittelt durch Subtraktion die von der unbekanntem Menge Aneurin verbrauchte Anzahl ccm 0.05-*n.* Jodlösung. Nach der Gleichung  $x : 337 = \text{ccm Jod} : 120$  errechnen sich die mg Aneurin-hydrochlorid zu  $x = 2.81 \times \text{ccm Jod}$  (für 0.05-*n.* Lösungen).

Beispiele. Die Mengen über 10 mg wurden mit 0.05-*n.* Jodlösung, die über 4 mg mit 0.02-*n.* Jodlösung, die kleineren mit 0.01-*n.* Jodlösung oxydiert.

Einwaage [mg]	5.0	4.46	28.9	4.77	4.77	5.65	8.25	13.87	14.3
Gefunden . . .	4.87	4.50	28.4	4.86	4.80	5.75	8.39	13.78	14.4
Fehler [%] . . .	-2.6	+1.0	-1.7	+2.0	+0.7	+1.7	+1.7	-0.7	+0.7
Einwaage [mg]	6.95	5.70	7.97	3.37	3.05	2.91	2.91	2.91	2.71
Gefunden . . .	7.21	5.87	7.61	3.45	3.15	2.91	3.03	2.98	2.68
Fehler [%] . . .	+3.8	+3.0	-4.5	+2.5	+3.3	0	+4.2	+2.5	-1.1
Einwaage [mg]	2.71	2.71	1.355	1.164	0.93	1.15	1.20	0.96	0.776
Gefunden . . .	2.66	2.73	1.405	1.184	0.95	1.21	1.21	0.984	0.821
Fehler [%] . . .	-1.8	+0.8	+3.7	+1.7	+2.2	+5.2	+0.8	+2.5	+5.8
Mittlerer Fehler:	+1.5%.								

Der größte Teil der Bestimmungen wurde von Frl. Letizia Manginelli ausgeführt, der wir auch an dieser Stelle für ihre ausgezeichnete Mitarbeit danken möchten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden ausführlicher in den *Memorias do Instituto Butantan*, Tomo XII, 1938, veröffentlicht werden.