

## Anhydroribose &lt;1.5&gt; &lt;1.4&gt;.

0.5 g Diacetylanhydroribose werden auf dem Wasserbad unter Feuchtigkeitsausschluß in 1.25 ccm Methanol gelöst und 0.13 ccm  $n/_{10}$ -Natriummethylat zugegeben. Man kocht 10 Min. am Rückflußkühler. Bereits nach 3 Min. beginnt die krystalline Abscheidung der Anhydroribose. Nach dem Erkalten wird abgesaugt, mit Methanol ausgewaschen und aus absol. Alkohol umkrystallisiert. Ausb. 0.15 g. Schmp. 229°—230° nach Sintern ab 225°.

Zur Analyse wurde die Substanz bei 100°/2 mm über Phosphorpentoxyd getrocknet.

4.165 mg Sbst.: 6.958 mg CO<sub>2</sub>, 2.259 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub> (132). Ber. C 45.46, H 6.06. Gef. C 45.56, H 6.07.

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{+0.25^\circ \times 1.576}{0.0500 \times 1 \times 1} = +78.8^\circ \text{ (I)}, \quad \frac{-0.15^\circ \times 2.336}{0.0450 \times 1 \times 1} = -77.8^\circ \text{ (II) (in Wasser).}$$

Die Anhydroribose löst sich leicht in Wasser. Fehlingsche Lösung wird erst nach vorangegangener Hydrolyse mit 2-n. HCl auf dem Wasserbad (10 Min.) reduziert. Die Reaktion mit Kupfersulfat/Alkali nach Klimek-Parnas verläuft positiv.

#### 154. Richard Kuhn und Theodor Wieland: Über Dioxyacyl-Derivate des $\beta$ -Alanins und *l*-Leucins aus der Leber des Thunfisches.

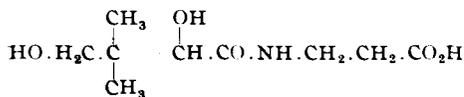
[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizin. Forschung, Heidelberg, Institut für Chemie.]  
(Eingegangen am 7. August 1940.)

Neben einer ganzen Reihe von Mineralsalzen, Aminosäuren, Vitaminen und Wuchsstoffen, die chemisch bekannt sind, benötigen die Milchsäure-Bakterien<sup>1)</sup> für ihr Wachstum auch einen durch Säure und verd. Alkali in der Hitze zerstörbaren Faktor, der durch saure Silicate wie Fullererde, Clarit u. a. nur schwer adsorbierbar ist. In seinen Eigenschaften erinnerte dieser Wirkstoff an die von R. J. Williams und seinen Mitarbeitern<sup>2)</sup> seit vielen Jahren untersuchte Pantothersäure. Die amerikanischen Forscher haben als Ausgangsmaterial Säugetierleber und als Test bei den Isolierungsversuchen die Wachstumsgeschwindigkeit einer besonderen Hefe benutzt. Es gelang ihnen noch nicht, die Pantothersäure selbst bzw. Salze oder Ester derselben in krystallisierter Form zu gewinnen. Als Hydrolysenprodukte hochgereinigter, amorpher Präparate konnten jedoch  $\beta$ -Alanin und das Lacton der  $\alpha,\gamma$ -Dioxy- $\beta,\beta$ -dimethyl-buttersäure<sup>3)</sup> identifiziert werden. Es gelang durch Wiedervereinigung dieser beiden Bruchstücke, biologisch wirksame Lösungen von synthetischer Pantothersäure zu erhalten, der demgemäß von R. J. Williams und R. T. Major<sup>3)</sup> die Formel I zugeschrieben wurde. Es kommt aber auch die cyclische Formel II in Betracht.

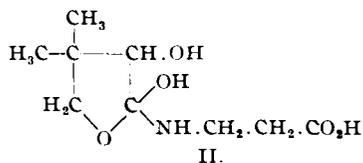
<sup>1)</sup> E. F. Möller, Angew. Chem. **53**, 204 [1940].

<sup>2)</sup> R. J. Williams, H. H. Weinstock, E. Rohrmann, J. H. Truesdail, H. K. Mitchell u. C. E. Meyer, Journ. Amer. chem. Soc. **61**, 454 [1939].

<sup>3)</sup> R. J. Williams u. R. T. Major, Science [New York] **91**, 246 [1940].



I.



II.

Für die vorliegende Untersuchung gingen wir nicht von Säugetier- sondern von Fisch-Leber aus. Der Test wurde nicht an einer Hefe, sondern an *Streptobacterium plantarum*, einem Milchsäure-Bakterium, von E. F. Möller<sup>1)</sup> ausgeführt. Es war ungewiß, ob unter diesen Umständen derselbe Wirkstoff in Erscheinung tritt, wie unter den Bedingungen von R. J. Williams und seinen Mitarbeitern; denn die Spezifität der Pantothensäure schien nach Y. Subbarow und L. Rane<sup>4)</sup>, die auch aus 2.5-Dioxy-valeriansäure und  $\beta$ -Alanin zu einem biologisch aktiven Produkt gelangt waren, nur gering zu sein.

Als Streptobacterium-Einheit (Sbm E) bezeichnen wir diejenige Menge des Wuchsstoffes, die unter den im Versuchsteil angeführten Bedingungen je ccm vorhanden sein muß, damit maximale Zellvermehrung erreicht wird. Dank der Unterstützung des Werkes Elberfeld der I.-G. Farbenindustrie A.-G. standen als Ausgangsmaterial über 4000 kg Thunfisch-Leber zur Verfügung, die wie folgt verarbeitet wurden.

Der entfettete Extrakt der Lebern wird im Vakuum eingeeengt, bis 1 ccm (entspr. 20 g frischer Leber) 160—200 mg organische Trockensubstanz enthält ( $\sim 15000$  Sbm E/g). Nach Ausfällung inaktiver Begleitstoffe durch Mercuriacetat ( $\sim 23000$  Sbm E/g) wird an Kohle adsorbiert und mit Pyridin-Methanol-Wasser eluiert, wobei der Reinheitsgrad auf  $\sim 50000$  Sbm E/g steigt. Bei der anschließenden Fällung mit Phosphorwolframsäure bleibt der Wuchsstoff in Lösung ( $\sim 65000$  Sbm E/g). Das Filtrat des Phosphorwolframsäure-Niederschlags enthält überdies viel Uridin, das nach dem Verdampfen auf Zusatz von Methanol auskristallisiert. Aus 4 t Leber wurden 850 g reines Uridin (Uracil-*d*-ribosid) erhalten. Die Methanol-Lösung gibt mit methylalkoholischem Baryt einen Niederschlag, der nahezu den ganzen Wirkstoff mit  $\sim 100000$  Sbm E/g enthält. Nach dem Zerlegen des Niederschlags durch verd. Schwefelsäure führt die Extraktion mit Butanol bei  $p_{\text{H}} 1$  zu einem Reinheitsgrad von  $\sim 170000$  Sbm E/g, der sich durch Wiederholung der Phosphorwolframsäurefällung auf  $\sim 270000$  Sbm E/g erhöhen läßt.

Eine weitere wesentliche Anreicherung gelingt nun durch Chromatographie. Von allen geprüften Adsorbentien hat sich nur Aluminiumoxyd, das mit verd. Salzsäure vorbehandelt ist, für den vorliegenden Zweck als brauchbar erwiesen. Überdies ist es notwendig, die wäßrige Lösung, deren  $p_{\text{H}} \sim 5-6$  beträgt, mit verd. Natronlauge auf  $p_{\text{H}} 8.5$  zu bringen. Eine Aktivierung des  $\text{Al}_2\text{O}_3$  durch verd. Schwefelsäure war nicht möglich; es lief aller Wuchsstoff wie bei nicht vorbehandeltem  $\text{Al}_2\text{O}_3$  glatt durch die Säule. Offenbar findet beim Chromatographieren eine Austausch-Adsorption, d. h. Ersatz von  $\text{Cl}^-$ -Ion durch das Anion des Wirkstoffes, statt. Mit dieser Vorstellung in Einklang steht die Beobachtung, daß Natriumchlorid während der Adsorption ins Filtrat geht und daß die freie Wuchsstoffsäure im Gegensatz zu ihren Alkalisalzen nicht adsorbiert wird. Die Erfahrung, daß eine

<sup>4)</sup> Journ. Amer. chem. Soc. **61**, 1616 [1939].

Vorbehandlung der Säule mit verd. Schwefelsäure nichts nützt, ist verständlich auf Grund der Tatsache, daß  $\text{SO}_4''$  von Aluminiumoxyd viel stärker als  $\text{Cl}'$  festgehalten wird<sup>5)</sup>. Noch stärker wird aber  $\text{OH}'$  adsorbiert, so daß man nicht nur  $\text{Cl}'$ , sondern auch das Anion des Wuchsstoffes so wie  $\text{SO}_4''$  mit verd. Alkalien eluieren kann. Die Adsorptionsaffinität fällt in der Reihenfolge



was alle angeführten Erscheinungen verständlich macht und auch erklärt, daß eine Elution des Wirkstoffes aus der Säule mit wäßriger Natriumsulfatlösung möglich ist, mit Kochsalzlösung aber nicht gelingt. Die chromatographische Reinigung führt zu Präparaten von 1500000—3000000 Sbm E/g, die 4.5—5% N, aber praktisch keinen freien Aminostickstoff enthalten. Da reine Pantothersäure 45000000—50000000 Sbm E/g hat<sup>6)</sup>, berechnete sich unter der Annahme, daß die Wirkstoffe von Fisch- und Säugetier-Leber identisch sind, ein Reinheitsgrad von 3—6%. Die Ausbeute an Wirkungseinheiten, bezogen auf den ursprünglichen Leberextrakt, betrug trotz der großen Zahl von Reinigungsstufen nach der Chromatographie noch 45% d. Theorie.

5 g chromatographisch gereinigte Substanz von 2500000 Sbm E/g wurden mit 2-n. Schwefelsäure hydrolysiert und im Apparat erschöpfend ausgeäthert. In der schwefelsauren Lösung ließen sich 70—80 mg  $\beta$ -Alanin nachweisen (Wuchsstoff-Wirkung an Hefe M) sowie 1.2 g *l*-Leucin (Wuchsstoff-Wirkung an Sbm. plantarum), wovon 1.0 g *l*-Leucin krystallisiert erhalten werden konnten. In den Äther gingen neben anderen N-freien Verbindungen ~120 mg linksdrehendes  $\alpha,\gamma$ -Dioxy- $\beta,\beta$ -dimethyl-buttersäurelacton, das als Chininsalz der entsprechenden Dioxysäure krystallisiert erhalten und durch Schmelzpunkt (183<sup>0</sup>) sowie Mischprobe mit einem synthetischen Präparat<sup>7)</sup> identifiziert wurde. Neben diesem Lacton der Formel  $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_3$  fanden sich im Ätherauszug noch ~500 mg einer in farblosen Nadelchen krystallisierenden Verbindung  $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_3$  vom Schmp. 159—160<sup>0</sup>, die allem Anscheine nach ein Homologes des Lactons  $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_3$  darstellt.

Das hydrolysierte Präparat (5 g mit 2 500 000 Sbm E/g) entsprach in seiner Wirksamkeit 0.25 g reiner Pantothersäure und hätte demgemäß 102 mg  $\beta$ -Alanin und 148 mg  $\alpha,\gamma$ -Dioxy- $\beta,\beta$ -dimethyl-buttersäurelacton liefern sollen. Die gefundenen Mengen (70—80 mg  $\beta$ -Alanin und etwa 120 mg Lacton) stimmten damit überein. Es ergibt sich, daß der in der Leber des Thunfisches (*Orcynus thynnus* L.) vorkommende Wuchsstoff mit Pantothersäure identisch ist.

Es ist zu vermuten, daß auch dem Leucin-Derivat besondere biologische Funktionen zukommen werden. Da *l*-Leucin zu den für *Sbm. plantarum* unentbehrlichen Aminosäuren zählt, hat Hr. Dr. E. F. Möller einen quantitativen Vergleich des *N*-Acyl-Derivates aus Fischleber (Präparat von 2 500 000 Sbm E/g) mit freiem *l*-Leucin vorgenommen. Es ergab sich, daß kein nennenswerter Unterschied besteht und vom *l*-Leucin in gebundener wie in freier Form  $\sim 4 \times 10^{-5}$  g/ccm für optimales Wachstum benötigt werden.

<sup>5)</sup> G. M. Schwab u. G. Dattler, Angew. Chem. **50**, 691 [1937].

<sup>6)</sup> Vergl. die nachstehende Abhandlung, R. Kuhn u. Th. Wieland, B. **73**, 971 [1940].

<sup>7)</sup> T. Reichstein u. A. Grüssner, Helv. chim. Acta **23**, 650 [1940]; zur Darstellung des Vergleichspräparates siehe auch R. Kuhn u. Th. Wieland, B. **73**, 975 [1940], Abschnitt 8. des Versuchsteiles.

Dies schließt nicht aus, daß bei anderen Organismen ein großer Unterschied zwischen *l*-Leucin und seinen *N*-Dioxy-acyl-Derivaten bestehen kann. Weiß man doch von einer Reihe von Mikroorganismen bereits, daß sie auf freies  $\beta$ -Alanin ähnlich wie auf Pantothersäure ansprechen.

Durch Kondensation von *l*-Leucin-benzylester mit  $\alpha,\gamma$ -Dioxy- $\beta,\beta$ -dimethyl-buttersäure-lacton und anschließende katalytische Hydrierung<sup>6)</sup> haben wir das Leucin-Analogon der Pantothersäure dargestellt. Dieses vermochte im Test an *Sbm. plantarum* Pantothersäure nicht zu ersetzen. Auch wenn 10  $\gamma$ /ccm angewandt wurden, d. h. 500-mal mehr als von Pantothersäure für optimales Wachstum benötigt werden, war kein Effekt festzustellen. Andererseits haben wir das Lacton  $C_7H_{12}O_3$  der Kondensation mit  $\beta$ -Alanin-benzylester unterworfen. Die durch anschließende katalytische Hydrierung gewonnene Lösung von „Homo-pantothersäure“ war gleichfalls mit 10  $\gamma$ /ccm unwirksam. Welche biologische Bedeutung dem in der Thunfisch-Leber nachgewiesenen Derivat des Leucins und dem Spaltstück  $C_7H_{12}O_3$  zukommt, läßt sich somit noch nicht sagen.

### Beschreibung der Versuche.

#### 1) Testmethode.

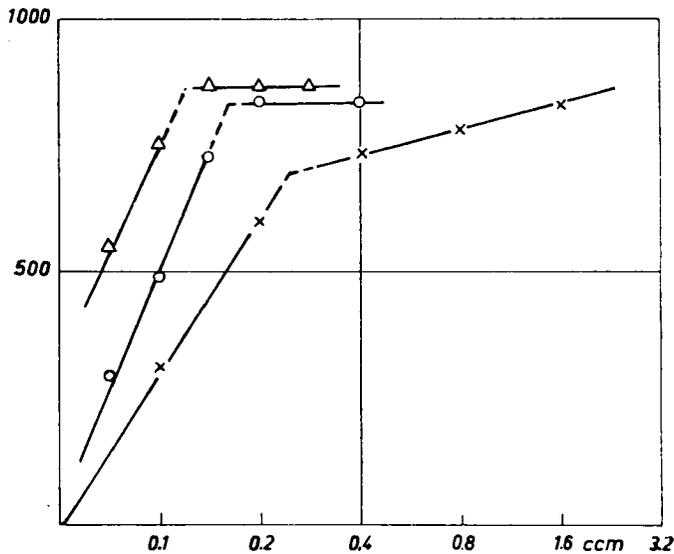
Alle biologischen Wertbestimmungen der in dieser Arbeit beschriebenen Präparate sind an *Streptobacterium plantarum* (*B. acetylcholini*, Keil, 10 S) von Hrn. Dr. E. F. Möller ausgeführt worden. Es wurde im lichtelektrischen Photometer nach Lange die Trübung als Maß der im Laufe von 4 Tagen gebildeten Zellmenge bestimmt. Beimpft wurde mit Platinösen aus Reinkulturen auf Reagensgläser von genau gleichem Durchmesser, die mit je 6 ccm Nährlösung beschickt waren. Versuchstemperatur 25°.

Die Nährlösung für die Milchsäure-Bakterien hatte folgende Zusammensetzung:

Substanz	Konzentration im Versuch (g/ccm)
Ammoniumacetat (Merck 1116) .....	$6.42 \times 10^{-3}$
Dinatrium-phosphat ( $2H_2O$ , Merck 6580) .....	$1.25 \times 10^{-3}$
Monokalium-phosphat (nach Sörensen, Kahlbaum) .....	$0.83 \times 10^{-3}$
Magnesiumsulfat ( $7H_2O$ , Merck 5882) .....	$0.42 \times 10^{-3}$
Ferricitrat (Merck, DAB 6) .....	$4.20 \times 10^{-5}$
ManganII-chlorid ( $4H_2O$ , Merck 5926) .....	$1.25 \times 10^{-5}$
Glucose (Merck 8341) .....	$2.0 \times 10^{-2}$
<i>l</i> -Cysteinhydrochlorid (natürl., Hoffmann, La Roche) .....	$0.8 \times 10^{-4}$
<i>d,l</i> -Methionin (synth., Hoffmann, La Roche) .....	$0.5 \times 10^{-4}$
Glykokoll (synth.) .....	$5.0 \times 10^{-4}$
<i>d,l</i> -Alanin (synth., H. Stocker) .....	$5.0 \times 10^{-4}$
<i>d,l</i> -Valin (synth., H. Stocker) .....	$5.0 \times 10^{-4}$
<i>d,l</i> -Leucin (synth., H. Stocker) .....	$2.5 \times 10^{-4}$
<i>d,l</i> -Isoleucin (synth., H. Stocker) .....	$1.0 \times 10^{-4}$
<i>d,l</i> -Phenylalanin (synth., H. Stocker) .....	$5.0 \times 10^{-4}$
<i>l</i> -Tryptophan (natürl., Hoffmann, La Roche) .....	$1.0 \times 10^{-4}$
<i>d,l</i> -Asparaginsäure (synth.) .....	$5.0 \times 10^{-4}$
<i>l</i> -Glutaminsäure (natürl., Schuchardt) .....	$5.0 \times 10^{-4}$
Aneurinchlorid-chlorhydrat (synth., I.-G. Elberfeld) .....	$1.0 \times 10^{-7}$
Aderminchlorhydrat (synth., I.-G. Elberfeld) .....	$2.0 \times 10^{-6}$
Nicotinsäure (aus Nicotin, Fraenkel & Landau) .....	$1.7 \times 10^{-5}$
Adeninsulfat (aus Hefe, Th. Wieland) .....	$4.3 \times 10^{-5}$
Vitamin-Fraktion aus Thunfischleber (Mercuriacetatfällung) ...	

Die an letzter Stelle angeführte Vitamin-Fraktion aus Thunfisch-Leber war  $\frac{1}{2}$  Stde. mit 2-n. Schwefelsäure gekocht, um etwa darin noch vorhandene Pantothensäure zu zerstören, und hierauf mit Barytwasser genau von der Schwefelsäure befreit worden. Abgesehen von Cystein, Tryptophan und Glutaminsäure handelte es sich bei allen Aminosäuren um synthetische Präparate.

Um die Zahl der Streptobacterium-Einheiten (Sbm E) zu bestimmen, setzt man eine Reihe von Röhrchen, z. B. mit 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 und 1.6 ccm Wuchsstofflösung in 6 ccm an, trägt die nach 4 Tagen gemessenen Trübungswerte graphisch auf (Abbild.) und liest ab, wieviele ccm Wuchsstofflösung für „maximale“ Zellvermehrung nötig sind.



Ermittlung der Wuchsstoff-Einheiten Sbm E/g.

Abzissen: ccm Wuchsstofflösung in 6 ccm Nährlösung.

Ordinaten: Skalenteile-Ausschlag am Lange-Photometer.

× — × mit  $HgAc_2$  gereinigte Lösung (1 ccm = 1.00 mg Trockengew.); max = 0.26 ccm = 0.043 ccm/1 ccm = 0.043 mg/1 ccm = 23 000 E/g.

○ — ○ mit  $HgAc_2$ , Kohle, PWS und Butanolextrakt gereinigte Lösung (1 ccm = 0.20 mg Trockengew.); max = 0.18 ccm = 0.030 ccm/1 ccm = 6  $\gamma$ /1 ccm = 167 000 E/g.

Δ — Δ weiter an  $Al_2O_3$  chromatographisch gereinigte Lösung (1 ccm = 0.020 mg Trockengew.); max = 0.12 ccm = 0.02 ccm/1 ccm = 2 500 000 E/g.

## 2) Aufarbeitung der Thunfisch-Leber.

1 ccm des als Ausgangsmaterial dienenden Extraktes aus Thunfisch-Leber (A 1588) entsprach 20 g frischer Leber und enthielt 180 mg organische Substanz mit 7500 Sbm E/g.

Quecksilberacetatfällung: 10 l der wäßrigen braunen Lösung werden mit einer kaltgesättigten wäßrigen Lösung von Hydrargyrum aceticum oxydat. (Merck) versetzt, bis kein Niederschlag mehr ausfällt, wozu etwa 12 l (3 kg Hg-acetat) nötig sind. Die Fällung wird abzentrifugiert und 1-mal mit 5 l Wasser gewaschen. Sie enthält den „H“-Komplex<sup>1)</sup>, während der Faktor F (Pantothensäure) in die Mutterlauge geht. Diese wird durch Einleiten von H<sub>2</sub>S vom Hg befreit. Das HgS wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen und die Lösung durch Hindurchsaugen eines Luftstromes von H<sub>2</sub>S befreit. Wirksamkeit: 12 000 Sbm E/g.

Kohleadsorption: In die entlüftete Lösung werden unter Umrühren 500 g I. G.-Kohle eingetragen. Das Rühren wird 2 Stdn. fortgesetzt. Dann wird abgesaugt, die Kohle 2-mal mit je 5 l Wasser gut verrieben und von neuem abgesaugt.

Elution: Zur Elution wird die Kohle mit 3 l einer Mischung von Pyridin-Methanol-Wasser (1:2:1) zum kurzen Sieden erhitzt und abgesaugt. Diese Operation wird im ganzen 4-mal ausgeführt. Die vereinigten Elutionsflüssigkeiten werden im Vak. bei etwa 50° eingedampft. Der ölige Rückstand wird zur vollständigen Entfernung des Pyridins 3-mal mit Methanol nachgedampft.

Alkoholbehandlung: Der Rückstand wird nun in 500 ccm absol. Alkohol aufgenommen und über Nacht im Eisschrank stehen gelassen. Am anderen Tag wird vom ausgefallenen Niederschlag abgesaugt und der Alkohol im Vak. abgedampft. Wirksamkeit: 50 000 Sbm E/g.

1. Phosphorwolframsäurefällung: Der Abdampfrückstand wird mit 400 ccm Wasser in Lösung gebracht. Von ungelösten dunkelroten Flocken wird abfiltriert und das Filtrat mit 100 ccm einer 20-proz. wäßrigen PWS-Lösung versetzt. Nach mehrstündigem Stehenlassen im Eisschrank wird abzentrifugiert und der Niederschlag 1-mal mit 100 ccm Wasser gewaschen. In das mit diesem Waschwasser vereinigte Filtrat der PWS-Fällung läßt man zum Zweck der Zerlegung heiße wäßrige Barytlösung einlaufen bis zur deutlichen Rötung von Phenolphthalein. Dann wird abzentrifugiert, die Fällung noch 1-mal mit festem Baryt verrieben, zentrifugiert und endlich mit Wasser gewaschen. Aus den vereinigten Filtraten und dem Waschwasser entfernt man das Ba genau mit Schwefelsäure.

Silbersulfatfällung: Zur Entfernung der Cl-Ionen wird die wäßrige Lösung mit wäßriger Silbersulfatlösung versetzt, bis kein Niederschlag mehr ausfällt, wozu etwa 3—4 l Reagens nötig sind. Von der flockigen Fällung wird abzentrifugiert und 1-mal mit Wasser nachgewaschen. Das überschüssige Silber wird mit H<sub>2</sub>S entfernt. Nach dem Filtrieren und Entlüften entfernt man die SO<sub>4</sub>-Ionen genau mit Barytwasser und engt nach dem Filtrieren im Vak. zum Sirup ein.

12.5 mg entspr. 20 g Fischleber. Wirksamkeit: 65 000 Sbm E/g. Ausbeute an Wirksamkeit: 70%, berechnet auf das Ausgangsmaterial (A 1588). Ausbeute an Substanz: 2.37 kg in 5.5 l Wasser (= 3800 kg Fischleber).

Abscheidung von Uridin: Die wäßrige Lösung (5.5 l) wird im Vak. zum dicken Sirup eingengt und mit 3 l Methanol nachgedampft. Der Rückstand wird in 6 l Methanol gelöst und die Lösung mehrere Tage im Eisschrank aufbewahrt. Dann wird vom ausgeschiedenen krystallinischen Niederschlag

abgesaugt und mit wenig Methanol gewaschen. Es scheiden sich 850 g Uridin ab, die im Möller-Test unwirksam sind. Die Mutterlauge hat eine Wirksamkeit von 90000 Sbm E/g.

Zur Analyse wurde das Uridin aus wenig Wasser durch Zusatz von Alkohol und Äther umkrystallisiert. Farblose, süß schmeckende Nadeln vom Schmp. 162—162.5°.

4.406 mg Subst.: 7.14 mg CO<sub>2</sub>, 1.97 mg H<sub>2</sub>O. — 3.20 mg Subst.: 0.317 ccm N<sub>2</sub> (21°, 758 mm).

C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>N<sub>2</sub> (244.1). Ber. C 44.25, H 4.96, N 11.47. Gef. C 44.21, H 5.00, N 11.47.

**Methanolische Barytfällung:** Die methanolische Uridinmutterlauge (8 l) wird unter kräftigem Rühren langsam mit kaltgesättigter Methanol-Lösung von Ba(OH)<sub>2</sub> + 8H<sub>2</sub>O versetzt, bis kein Niederschlag mehr ausfällt, wozu etwa 8 l nötig sind. Nach 2-stdg. Stehenlassen wird vom Niederschlag abdekantiert und der Rest zentrifugiert. Die Fällung wird in 2 l Wasser gelöst und unter gutem Rühren mit 8 l Methanol von neuem gefällt. Nach dem Dekantieren und Zentrifugieren wird diese Operation noch einmal mit 1 l Wasser und 5 l Methanol wiederholt. Die vereinigten Filtrate dieser Fällungen neutralisiert man mit Schwefelsäure gegen Lackmus und zentrifugiert das BaSO<sub>4</sub> ab. Dieses wird unter gutem Rühren 2-mal mit insgesamt 5 l Wasser gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden nun im Vak. bei 40° auf 4 l eingengt. Aus dieser Lösung wird das überschüssige Sulfat mit Barytwasser genau entfernt. Der BaSO<sub>4</sub>-Niederschlag wird 2-mal unter Erwärmen mit je 1.5 l Wasser gewaschen. Die vereinigten Filtrate enthalten 900 g Substanz mit einer Wirksamkeit von 100 000 Sbm E/g, während die Fällung 360 g beträgt und nur mit 10 000 Sbm E/g wirksam ist.

**Butanolextraktion:** Die wäßrige Lösung des Filtrat-Faktors, die man nach der letzten Reinigungsstufe erhält, wird mit Phosphorsäure auf p<sub>H</sub> 1 gebracht und 5-mal mit insgesamt 20 l wassergesättigtem Butanol ausgeschüttelt. Die vereinigten Butanolschichten werden mit Barytwasser auf p<sub>H</sub> 5—6 abgestumpft und im Vak. ohne vorherige Filtration zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird dann mehrmals mit Wasser (3 l) heiß extrahiert und filtriert. Aus dem Filtrat werden alle Spuren von Ba bzw. Phosphat mit Schwefelsäure bzw. Barytwasser entfernt. Die butanol-lösliche Substanz beträgt 550 g mit 170 000 Sbm E/g, die butanol-unlösliche 350 g mit nur 40 000 Sbm E/g.

**2. Phosphorwolframsäurefällung:** Die in Butanol lösliche Fraktion wird in 2—3 l Wasser gelöst, mit Schwefelsäure auf p<sub>H</sub> 1.5 gebracht und mit 60-proz. wäßriger Phosphorwolframsäurelösung gefällt. Der Niederschlag ist von honigartiger Konsistenz und braun gefärbt. Die Mutterlauge der Fällung wird mit Baryt genau neutral gemacht, der Niederschlag abzentrifugiert und 3-mal mit heißem Wasser gewaschen. Die vereinigten Lösungen werden mit Schwefelsäure genau vom Ba befreit. Auch dieser Niederschlag wird 2-mal mit Wasser gewaschen, so daß die Gesamtmenge der Lösung 12—13 l beträgt. Diese enthält 350 g Substanz mit einer Wirksamkeit von 270 000 Sbm E/g.

### Chromatographie an Aluminiumoxyd.

**Darstellung der „sauren Säule“:** Käufliches Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (E. Merck) wird mit Wasser zu einem dünnen Brei angerührt. Dieser wird unter gutem Umschütteln mit 2-n. Salzsäure versetzt, bis deutlich kongosaure Reaktion eintritt. Nach einigem Stehen-

lassen wird die Flüssigkeit abgegossen und das Aluminiumoxyd nunmehr so lange mit dest. Wasser digeriert, bis eine Probe der Waschlöslichkeit hochempfindliches Kongopapier nur noch schwach violett färbt. Dann wird der dünne Brei unter schwachem Ansaugen in ein unten mit einer Filterplatte und einem Papierfilter geschlossenes Chromatogrammrohr eingefüllt.

Die Chromatographie wird mit 1-*l*-Portionen der nach der 2. PWS-Fällung erhaltenen Lösung folgendermaßen ausgeführt: Die Lösung wird mit Barytwasser auf  $p_H$  8.5 gebracht und unter Saugen durch eine Säule von 800 g des nach der obigen Vorschrift behandelten  $Al_2O_3$  laufen gelassen. Während dieser Operation bilden sich schon am Tageslicht sichtbare Zonen aus, die beim Nachwaschen mit 2 *l* Wasser deutlicher werden. Nachdem auch die 2 *l* Waschwasser die Säule passiert haben, sind unter der U. V.-Lampe folgende Zonen zu erkennen:

schmal	1	hell blauviolett fluoreszierend,
schmal	2.3	braungrün, nicht fluoreszierend,
schmal	4	dunkelblau fluoreszierend,
etwas breiter	5	nicht fluoreszierend, bei Tageslicht gelb,
sehr breit	6	weiß-bläulich fluoreszierend, mit unscharfem Übergang in das Violett des $Al_2O_3$ (Pantothensäure),
Ende	7	$Al_2O_3$ -Fluoreszenz.

Die noch feuchte, aber nicht mehr tropfende Säule wird durch Stauchen langsam aus dem Rohr gebracht. Die Zone 6, welche die Hauptmenge des Filtratfaktors enthält, und die Hälfte von Zone 7 werden zusammen folgendermaßen weiter verarbeitet: Man rührt diesen Säulenabschnitt mit dest. Wasser zu einem dünnen Brei an und füllt ihn unter schwachem Ansaugen in ein geeignetes neues Rohr. Dann wird unter weiterem Saugen eine kaltesättigte wäßrige Barytlösung durchlaufen gelassen. Dabei sieht man vor der U. V.-Lampe eindrucksvoll, wie sich die fluoreszierende Substanz, die den Wirkstoff begleitet, langsam von oben her ablöst. In dem Moment, wo die fluoreszierende Zone eben unten anlangt, was nach dem Durchlaufenlassen von etwa 1.5 *l* Barytwasser der Fall ist, wird das Auffanggefäß abgenommen. Das Eluat reagiert genau neutral und enthält neben dem Ba-Salz der Filtratfaktorsäure noch aus der Säule stammendes Chlorid. Um dieses zu entfernen, wird mit gesättigter wäßriger Silbersulfatlösung versetzt, bis kein Niederschlag mehr ausfällt. Ein großer Überschuß an diesem Reagens ist zu vermeiden. Hierauf wird das überschüssige Silber mit Schwefelwasserstoff gefällt, vom Silbersulfid abfiltriert und die klare Lösung entlüftet. Dann wird alles Sulfat mit Barytwasser genau entfernt und filtriert. Anschließend dampft man im Vak. vollständig ein und erhält so aus einem Ansatz 3 g eines gelb gefärbten Sirups. Dieser besitzt eine Wirksamkeit von 1500000—3000000 Sbm E/g, während die anderen Zonen und der die Hauptmenge enthaltende Durchlauf nahezu unwirksam sind. Ausbeute an Wirksamkeit: 45% bezogen auf A 1588.

Das Bariumsalz eines so gereinigten Präparates ergab bei der Analyse:

C 41.85, H 5.81, N 4.01, Ba 22.08.

Die aus einem ähnlich bereiteten Bariumsalz mit der berechneten Menge Schwefelsäure in Freiheit gesetzte Säure wurde vor und nach Hydrolyse mit 2-*n*. Salzsäure ( $1/2$  Stde. gekocht) nach van Slyke auf Aminostickstoff analysiert. Es ergab sich vor Hydrolyse: N 0.54%, nach Hydrolyse: N 4.59%.

## 3) Hydrolyse.

5 g Substanz von 2500000 E/g wurden mit 25 ccm 2-n. Schwefelsäure  $\frac{1}{2}$  Stde. unter Rückfluß gekocht und hierauf im Apparat mit Äther 24 Stdn. extrahiert. Die über Natriumsulfat getrocknete Ätherlösung verdampften wir und destillierten den Rückstand unter 0.02 mm. Zunächst wurde eine Fraktion I (1.2 g) vom Sdp. 65—120°, hierauf eine Fraktion II (0.5 g) vom Sdp. 120—150° erhalten. Es hinterblieb ein bräunlicher, glasig erstarrender Rückstand (1 g).

Die Fraktion I vom Sdp.<sub>0.02</sub> 65—120° ließ sich durch erneute Destillation ziemlich scharf in einen Anteil (0.4 g, Fraktion Ia) vom Sdp.<sub>0.02</sub> 65—70° und einen weiteren Anteil (0.5 g, Fraktion Ib) vom Sdp.<sub>0.02</sub> 85—90° zerlegen. In der Kugel hinterblieben 0.3 g eines schwerer flüchtigen, zähen Öls.

a) Isolierung der linksdrehenden  $\alpha,\gamma$ -Dioxy- $\beta,\beta$ -dimethylbuttersäure als Chininsalz: 200 mg Fraktion Ia (Sdp.<sub>0.02</sub> 65—70°) wurden in 5 ccm Wasser gelöst, mit Äther durchgeschüttelt, um etwas in Wasser unlösliche Substanz zu entfernen, und in der Hitze mit verd. Barytwasser auf  $p_H$  8.5 gebracht. Die Lösung des Bariumsulfates wurde hierauf mit einer wäßrigen Lösung von neutralem Chininsulfat (2 Chinin,  $1H_2SO_4$ ) versetzt, bis alles Barium genau ausgefällt war. Nach dem Abzentrifugieren des Bariumsulfates wurde im Exsiccator über Phosphorpentoxyd zur Trockne gebracht. Der sirupartige Rückstand krystallisierte beim Anreiben mit Wasser. Nach 2-maligem Umkrystallisieren aus wenig siedendem Wasser wurden farblose derbe Prismen vom Schmp. 182—183° (Berl) erhalten. Synthetisch gewonnenes Chininsalz der linksdrehenden  $\alpha,\gamma$ -Dioxy- $\beta,\beta$ -dimethylbuttersäure zeigte die gleiche Krystallform und schmolz bei 183°. Der Mischschmelzpunkt mit dem aus Thunfisch-Leber gewonnenen Chininsalz lag bei 183° (Berl).

b) Isolierung des Spaltstückes  $C_7H_{12}O_3$ : Die Fraktion II (0.5 g) erstarrt nach kurzer Zeit nahezu vollständig. Durch Umkrystallisieren aus Äther erhält man die Substanz in farblosen Nadeln vom Schmp. 159—160° (Kofler).

2.168 mg Sbst.: 4.62 mg  $CO_2$ , 1.58 mg  $H_2O$ .

$C_7H_{12}O_3$  (144.1). Ber. C 58.29, H 8.40. Gef. C 58.12, H 8.15.

c) Isolierung des *l*-Leucins: Die bei der Hydrolyse erhaltene, mit Äther extrahierte wäßrige Lösung wird mit Barytwasser genau von der Schwefelsäure befreit und im Vak. zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird mit absol. Alkohol verrieben und über Nacht im Eisschrank aufbewahrt. Dann wird die im Alkohol unlösliche Substanz abzentrifugiert und mit absol. Alkohol gewaschen. Man nimmt in 4—5 ccm heißem Wasser auf und zentrifugiert etwas flockigen Rückstand ab. Beim Einengen der wäßrigen Lösung beginnt die Abscheidung der Aminosäure, die man durch Zusatz von absol. Alkohol vervollständigt (1.0 g). Zuletzt wurde öfters aus 60-proz. Alkohol umkrystallisiert und bei 100° (15 mm) über  $P_2O_5$  getrocknet (0.25 g). Glitzernde Blättchen vom Schmp. 269—273° (Berl, Zers.).

Ein bei normalem Druck sublimiertes Präparat wurde zur Analyse gebracht.

2.635 mg Sbst.: 5.285 mg CO<sub>2</sub>, 2.38 mg H<sub>2</sub>O. — 3.157 mg Sbst.: 0.297 ccm N<sub>2</sub> (27°, 749 mm). — 3.000 mg Sbst.: 2.31 ccm *n*<sub>100</sub>-NaOH (in Alkohol).

C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>O<sub>2</sub>N (131.1). Ber. C 54.92, H 9.99, N 10.68, Äquiv.-Gew. 131.

Gef. „ 54.70, „ 10.10, „ 10.55, „ 130.

$[\alpha]_D^{20}$ : (+0.38° × 100): (4.93 × 0.5) = +15.4° (20-proz. Salzsäure).

Zum Vergleich wurde *l*-Leucin polarisiert:

$[\alpha]_D^{20}$ : (+0.24° × 100): (3.05 × 0.5) = +15.7° (20-proz. Salzsäure).

d) Nachweis des β-Alanins: Die vereinigten Mutterlaugen der *l*-Leucin-Krystallisation wurden im Vak. zur Trockne gebracht. Es wurden 1.6 g fester Substanz (LM) erhalten, die im Hefe-Test (Rasse M) im Vergleich mit reinem β-Alanin auf ihren Gehalt an dieser Aminosäure geprüft wurde.

	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6 ccm zugesetzt	
β-Alanin (2.5 γ/ccm) . . . . .	83	452	539	655	635	} Trübungswerte im Langeschen Photometer
LM (62.5 γ/ccm) . . . . .	—	338	515	615	665	

Die optimalen Trübungswerte liegen in beiden Ansätzen bei 0.8 ccm zugesetzter Lösung. Daher sind in 62.5 γ LM 2.5 γ β-Alanin, d. h. etwa 5% vorhanden, im ganzen also etwa 70—80 mg β-Alanin aus 180—200 mg Pantotheinsäure. Daraus berechnet sich für das hydrolysierte Präparat ein Gehalt von 4—5% an Pantotheinsäure. Dies stimmt mit der Zahl an Sbm E/g (2500000) überein, die  $\frac{1}{20}$  des Wertes für reine Pantotheinsäure (~5000000) beträgt.

Hrn. Dr. E. F. Möller haben wir für die Ausführung sämtlicher Bestimmungen an *Sbm. plantarum* und an *Hefe M* aufrichtig zu danken, dem Werk Elberfeld der I. G. Farbenindustrie A.-G. und Fr. L. Wirth für wertvolle Unterstützung beim präparativen Teil der Arbeit.

### 155. Richard Kuhn und Theodor Wieland: Krystallisiertes Chininsalz der Pantotheinsäure; Synthese und Spaltung des Racemates in die Antipoden.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizin. Forschung, Heidelberg, Institut für Chemie.]  
(Eingegangen am 7. August 1940.)

Zur Reinigung der Pantotheinsäure sind bereits Alkaloidsalze herangezogen worden, insbesondere das Brucinsalz von R. J. Williams und Mitarbeitern<sup>1)</sup>. Diese Salze sind ebenso wie die freie Säure, ihre Alkali-, Erdalkali-Salze und Ester amorph geblieben. Wie wir gefunden haben, zeichnet sich das Chininsalz durch Krystallisationsvermögen aus. Es scheidet sich aus Aceton-Methanol in schönen, farblosen Nadeln ab, deren Schmelzpunkt bei 167—168° liegt.  $[\alpha]_D^{24}$ : —115° (Wasser).

Das Chininsalz ist auch zur Spaltung von synthetischer *d, l*-Pantotheinsäure in die optischen Antipoden sehr geeignet. Die natürliche, linksdrehende Pantotheinsäure liefert ein schwer lösliches Chininsalz, die rechtsdrehende Säure ein in Aceton-Methanol erheblich leichter lösliches. Für die aus dem schwer löslichen Chininsalz in Freiheit gesetzte (—)-Pantotheinsäure ergab sich  $[\alpha]_D^{24}$ : —27° (Wasser),  $[\alpha]_D^{24}$ : —56° (Methanol). Ihre biologische Wirksamkeit im *Streptobacterium*-Test beträgt 4500000 bis

<sup>1)</sup> R. J. Williams, J. H. Truesdail, H. H. Weinstock jr., F. Rohrmann, C. M. Lyman u. Ch. H. McBurney, Journ. Amer. chem. Soc. **60**, 2719 [1938].