

155. Theodor Wieland, Ernst Friedrich Möller und Gerhard Dieckelmann*): Antagonisten des *Lactobacillus-bulgaricus*-Faktors und der Pantothensäure

[Aus dem Organisch-chemischen Institut der Universität Mainz und dem Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Heidelberg]

(Eingegangen am 9. April 1952)

S-Methyl-, *S*-Äthyl- und *S*-Phenyl-pantethein sind aus Natrium-pantothenat und den entsprechenden Thioäthanolamin-Derivaten auf dem Weg über das gemischte Anhydrid der Pantothensäure mit Äthylkohensäure synthetisiert worden. Alle besitzen in kleiner Konzentration geringe Wuchsstoffwirkung bei *Lactobacillus helveticus* V 80, die bei höherer Konzentration in eine durch *Lactobacillus-bulgaricus*-Faktor (LBF, Pantethein) und Pantothensäure aufhebbare Hemmung übergeht. Während diese bei den Alkyl-Derivaten nach einigen Tagen überwunden wird, ist die durch das Phenyl-Derivat erzeugte stabil. Es handelt sich dabei um einen echten kompetitiven Vorgang, wobei 30–70 Moll. Hemmstoff je Mol. Wuchsstoff das Bakterienwachstum zu 50% unterbinden. Das auf analogem Weg synthetisierte Pantothensäureamid besitzt keine Hemmwirkung und vermag den Wuchsstoff bei 3 verschiedenen Mikroorganismen, allerdings in höherer Konzentration, vollständig zu ersetzen.

Nach den z. Zt. über den Mechanismus der Pantothensäurewirkung herrschenden Vorstellungen wird dieses Vitamin in der lebenden Zelle (Säugetier, Hefe, Bakterien) in das ziemlich kompliziert zusammengesetzte Coenzym A¹) eingebaut. In dieser dinucleotidartigen Verbindung liegt es als Thioäthanolamid vor, dessen SH-Gruppe als Acylüberträger u. a. die biologische Acetylierung von Aminen und Alkoholen besorgt²⁾. Gewisse Milchsäurebakterien, darunter der von uns hier verwendete *Lactobacillus helveticus* V 80 zeigen mit einem Spaltstück des Coenzym A, dem sog. *Lactobacillus-bulgaricus*-Faktor (LBF, Pantethein, Pantothensäure-thioäthylamid (I)), besonders in der Anfangsphase der Vermehrung schnelleres Wachstum als mit Pantothensäure³⁾,



I

woraus man schließen darf, daß in diesen Mikroorganismen im Zuge der CoA-Synthese das Vitamin zunächst in Pantethein verwandelt wird. Dieser Wuchsstoff scheint dann als Ganzes in das Coferment eingebaut zu werden.

Um diese Theorie experimentell zu prüfen, haben wir Derivate des Pantetheins synthetisiert, die sich von der Stammverbindung wenig, aber in einem

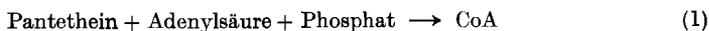
*) Teil der Dissertat. G. Dieckelmann, Mainz 1951.

¹⁾ F. Lipmann, N. O. Kaplan, G. D. Novelli, L. C. Tuttle u. B. Guirard, Journ. biol. Chem. 167, 869 [1947]; J. D. Gregory, G. D. Novelli u. F. Lipmann, Journ. Amer. chem. Soc. 74, 854 [1952].

²⁾ F. Lynen, E. Reichert u. L. Rueff, A. 574, 1 [1951].

³⁾ W. L. Williams, E. Hoff-Jørgensen u. E. E. Snell, Journ. biol. Chem. 177, 933 [1949].

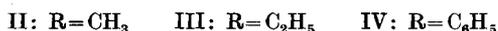
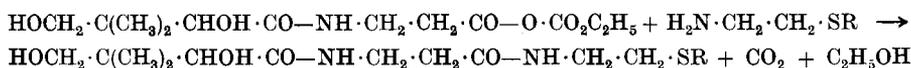
entscheidenden Punkt zu unterscheiden hatten, so daß man erwarten durfte, daß sie den Syntheseschritt



durch Konkurrenz mit dem Pantethein unterbinden könnten.

Eine Substitution einer der geminalen Methylgruppen des Pantoylteils durch Äthyl, etwa nach dem Muster des Methionin-Äthionin-Antagonismus kam hierzu nicht in Frage, nachdem von uns vor mehreren Jahren gezeigt werden konnte, daß 2 diastereomere Methyl-äthyl-pantothersäuren Wuchsstoffaktivität in der Größenordnung der Pantothersäure bei Milchsäurebakterien ausüben⁴⁾. Auch der naheliegende Gedanke, das Thioäthylamid der Sulfopantothersäure, eines bekannten Pantothersäure-Antagonisten⁵⁾ darzustellen, schien bei den zu erwartenden experimentellen Schwierigkeiten nicht auf den bequemsten Weg zu führen.

Wir haben deshalb im schwefelhaltigen Teil der Pantetheinmolekel einige Änderungen vorgenommen, indem wir den Wasserstoff der Sulphydrylgruppe von I durch den Methyl-, Äthyl- und Phenyl-Rest ersetzten. Der einfache Weg zu diesen Verbindungen ergab sich aus den Erfahrungen, die Th. Wieland und E. Bokelmann⁶⁾ bei der Synthese des Pantetheins gemacht haben. Dieses Säureamid ließ sich durch Umsetzung des gemischten Anhydrids aus *d*-Pantothersäure und Äthylkohlensäure mit Cysteamin in Dimethylformamid als Lösungsmittel in guter Ausbeute gewinnen. Dieselbe Synthese mit *S*-Methyl-, *S*-Äthyl- und *S*-Phenyl-cysteamin an Stelle der unsubstituierten Base lieferte die gewünschten *d*-Pantethein-Derivate II, III und IV als ölige Produkte, die allerdings nur schwer in völlig reiner Form zu gewinnen sind.



Die Synthese von *S*-Methyl- und *S*-Äthyl-cysteamin, zweier bereits bekannter Verbindungen⁷⁾, erfolgte in Anlehnung an die Darstellung des Cysteamins aus Äthylenimin und den Mercaptanen, nach welcher nach bekannter Vorschrift⁸⁾ auch das Phenyl-Derivat erhalten wurde.

Weiterhin wurde aus dem Anhydrid und Ammoniak das ölige Amid der *d*-Pantothersäure (V) dargestellt, nachdem die Nacharbeitung einer Patentvorschrift⁹⁾, die partielle Verseifung des Pantothersäurenitrils, nicht zum Erfolg geführt hatte.

Vorher gedachten wir durch Anlagerung des cyclischen Iminoäthers (entspr. VI) an Acrylsäureamid zur Verb. V zu kommen, nachdem wir gefunden hatten, daß sich das Hydrochlorid VI durch Einleiten von Chlorwasserstoff in eine ätherische Lösung des

4) Th. Wieland u. E. F. Möller, B. 81, 316 [1948].

5) R. Kuhn, Th. Wieland u. E. F. Möller, B. 74, 1605 [1941].

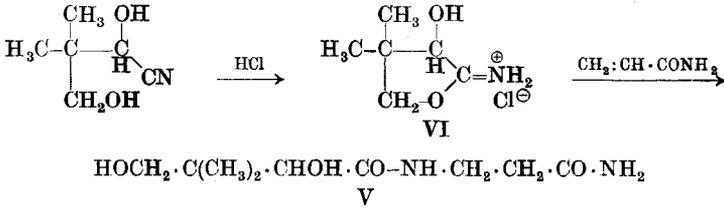
6) Th. Wieland u. E. Bokelmann, Naturwiss. 38, 384 [1951].

7) W. Schneider, A. 386, 332 [1912].

8) K. W. Brighton u. E. E. Reid, Journ. Amer. chem. Soc. 65, 458 [1943].

9) M. B. Moore, U.S.-Pat. 2369839 [1945].

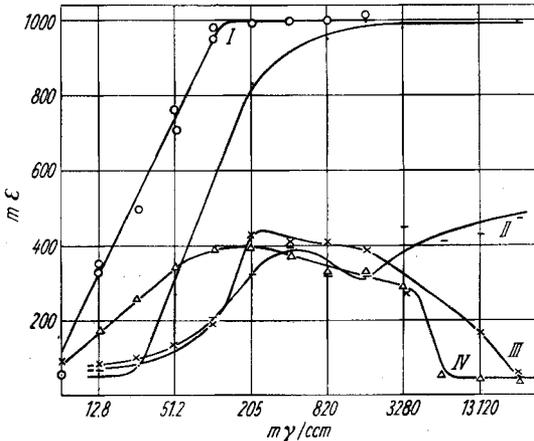
auf dem Weg der Pantothersäure-Synthese liegenden α,γ -Dioxy- β,β -dimethyl-butyrnitrils in guter Ausbeute darstellen läßt,



Da die geplante Kondensation jedoch unerwartete Schwierigkeiten bereitete, haben wir schließlich den erwähnten einfachsten Weg zur Darstellung von V beschrritten.

Mikrobiologische Versuche

Die neu synthetisierten Pantothersäure-Derivate wurden an *Lactobacillus helveticus* V.80 auf Wuchs- und Hemmwirkung geprüft. Dabei zeigte sich, daß im pantothersäurefreien Nährmedium den Verbindungen II, III und IV in kleinen Konzentrationen Wuchsstoffwirkung eigen ist, die etwa bei derselben Konzentration wie beim Pantethein selbst einsetzt, in höherer Konzentration aber bei weitem nicht zu gleich starkem Wachstum führt. Steigert man die Menge noch weiter, so tritt bei etwa 10 γ /ccm „Selbsthemmung“, also Unterbindung der Bakterienvermehrung, ein. Nach 2tägiger Incubation (s. Abbild. 1) hat sich dieses Bild geändert, indem jetzt das S-Methyl-Derivat II seine Hemmwirkung weitgehend eingebüßt hat und auch die der Äthylverbindung III vermindert ist, während die des Phenylpantetheins (IV) erhalten blieb und auch noch nach 5 Tagen beobachtet werden kann.



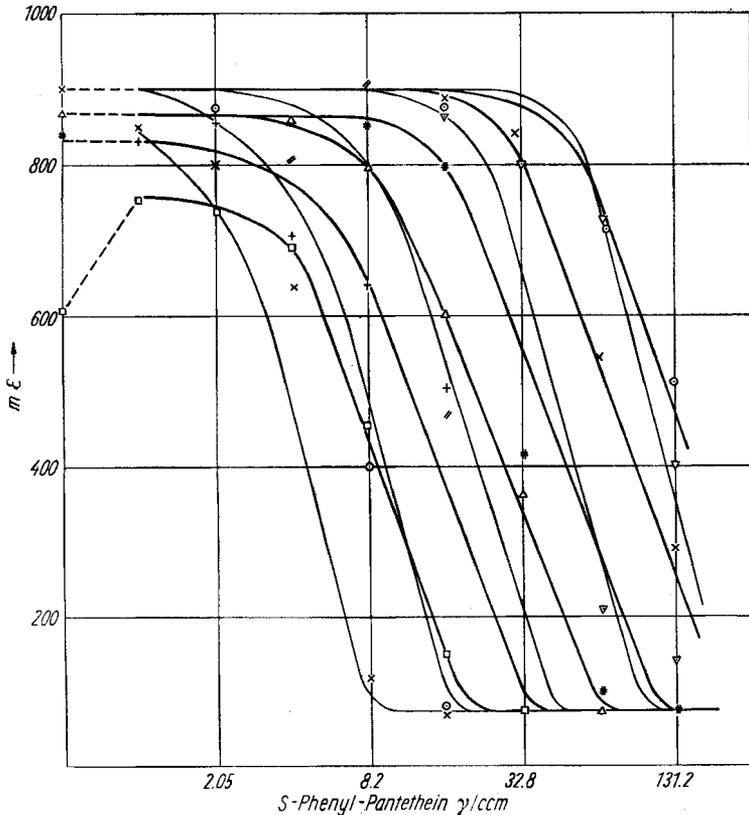
Abbild. 1. Wirkung von Pantethein-Derivaten im Pantethein-Test mit *Lactobacillus helveticus* V 80 nach 48 Stdn. Medium: „R-Acetat“ nach Möller, Weygand u. Wacker¹⁰⁾ + Tween 80 (0.1%); pH 6.6, 37°. Beimpfung: 1 Öse (1 mm \varnothing) einer 48-Stdn.-Kultur im gleichen Medium + $\sim 1.6 \gamma$ Pantethein/ccm

- Pantethein (I), × S-Äthyl- Pantethein (III)
- S-Methyl-Pantethein (II) △ S-Phenyl- „ (IV)

¹⁰⁾ Ztschr. Naturforsch. 4b, 92 [1949].

Diese Erscheinungen möchten wir eher auf eine Abspaltung der Reste vom Schwefel, der zum Wuchsstoff Pantethein führt, als auf eine Hydrolyse zu Amin und Pantothen-säure zurückführen. Die in der Desmethylierung von Thiomethyl geübte Bakterienzelle wird des *S*-Methyl-Derivats am schnellsten Herr und kann es, auch in höheren Konzentrationen, in einiger Zeit zum Wuchsstoff abbauen. Bei der Äthylverbindung erfolgt diese Entgiftung größerer Mengen wesentlich langsamer, wobei wohl ebenfalls der abgespaltene Alkylrest im Stoffwechsel verschwindet. Das Phenylanalogue schließlich, das in kleiner Konzentration eben noch bewältigt und zum Wuchsstoff abgebaut wird, ist, weil sein aromatisches Spaltprodukt nur sehr langsam aus dem Gleichgewicht verschwindet, in höheren Konzentrationen viel beständiger und somit auch die von ihm verursachte Hemmung.

Aus diesem Grund wurde seine antagonistische Wirkung eingehender analysiert (s. Abbild. 2): Innerhalb eines Konzentrationsgebietes von 2 Zehner-



Abbild. 2. Antagonismus von *S*-Phenyl-pantethein gegenüber Pantethein (—) bzw. Pantothensäure (—) bei *Lactobacillus helveticus* V 80 nach 48 Stdn. Medium: „R-Acetat“ nach Möller, Weygand u. Wacker¹⁰) + Tween 80 (0.1%); pH 6.6, 37°. Beimpfung: 1 Öse (1 mm Ø) einer 48-Stdn.-Kultur im gleichen Medium + 205 mγ Pantethein/ccm

□	Pantethein	102 mγ/ccm	×	Pantethein bzw. Pantothensäure	1640 mγ/ccm
+	„	205 „	⊙	„	3280 „
△	„	410 „	♣	Pantothensäure	6560 „
*	„	820 „	∇	„	13120 „
	∇	Pantothensäure	26240 mγ/ccm

potenzen (2–200 γ /ccm) an Hemmstoff zeigt sich annähernd kompetitiver Antagonismus gegenüber Pantethein und Pantothenensäure. Der bei halboptimalem Wachstum aus der Kurvenschar abzulesende bakteriostatische Index beträgt beim Phenylpantethein gegen Pantethein 30–70, d. h. es machen etwa 50 Molekeln Hemmstoff die Wirkung einer Wuchsstoffmolekel zunichte. Gegenüber der als Wuchsstoff weniger wirksamen Pantothenensäure beträgt der bakteriostat. Index sogar 2–4. Man darf hieraus schließen, daß der durch den Hemmstoff verdrängte Wuchsstoff sich aus der Pantothenensäure während der Incubation erst langsam bildet und daß es sich dabei wohl um Pantethein handelt. Im *S*-Phenyl-pantethein haben wir mithin zum ersten Mal einen Stoff vor uns, der im wesentlichen ein Antagonist des Pantetheins ist, indem er die Verwertung dieses Teilstücks bei der Synthese des CoA hemmt (Reaktion 1, S. 1036).

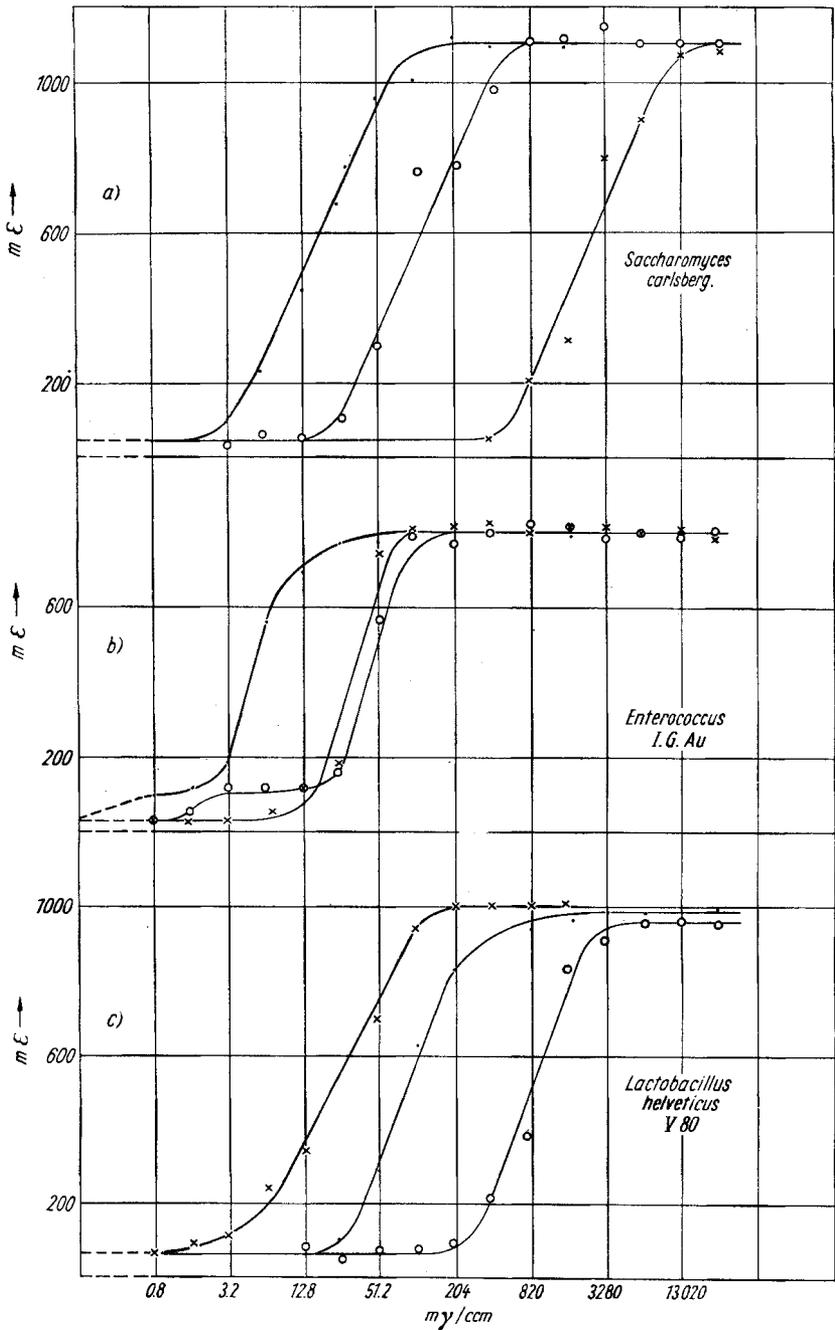
Die genaue Auswertung der hier nur kurz wiedergegebenen Befunde wird in einer ausführlicheren Arbeit gegeben werden, in der auch weitere mikrobiologische Analyseergebnisse diskutiert werden sollen¹¹⁾.

Das nach der neuen Methode synthetisierte Pantothensäureamid (V) besitzt keine bakteriostatischen Eigenschaften. Wir haben es als Wuchsstoff an Stelle von Pantothenensäure und Pantethein vergleichend bei 3 verschiedenen Mikroorganismen geprüft (Abbild. 3). Für *L. helveticus* ist es bedeutend weniger aktiv als die beiden anderen Wuchsstoffe. Bei einem Entero kokken-Stamm ist es mit Pantethein etwa gleich wirksam, aber die beiden müssen 8fach höher konzentriert als Pantothenensäure gegeben werden. Die Hefe *Saccharomyces carlsbergensis* endlich benötigt 4mal mehr an Amid und sogar 128mal mehr an Pantethein zum optimalen Wachstum, das mit dem Amid bei allen 3 Stämmen leicht erreicht wird.

Diese Ergebnisse müssen so ausgelegt werden, daß das Amid keinesfalls Zwischenprodukt der Pantethein-Bildung aus Pantothenensäure sein kann, sondern erst zur Säure desamidiert wird, bevor ein Aufbau zu komplizierteren Wuchsstoffen stattfinden kann. Auch beim Pantethein, das nur für *L. helveticus* von den 3 untersuchten Wuchsstoffen der wirksamste ist, muß man in den beiden anderen Mikroorganismen einen Abbau zu Pantothenensäure annehmen. Von ihr aus könnte bei diesen mindestens ein weiterer unbekannter Wirkstoff gebildet werden. Vielleicht verfügt aber auch *L. helveticus* über einen speziellen Mechanismus der Pantetheinresorption, der bei allen anderen Mikroorganismen nicht vorhanden ist.

Bei diesen Untersuchungen ist Herr G. Dieckelmann durch die Firma C. H. Boehringer Sohn, Ingelheim, unterstützt worden, wofür hier bestens gedankt sei. Weiterhin danken wir der Firma Hoffmann-La Roche, Basel, vielmals für die Überlassung des Natriumpantothenats.

¹¹⁾ E. F. Möller, Ztschr. Naturforsch., in Vorbereitung.



Abbild. 3. Wuchsstoff-Aktivität von Pantoithensäure (---), Pantoithensäureamid (-o-) und Pantethein (-x-) bei 3 Mikroorganismen

Erläuterungen zu Abbild. 3

a) *Saccharomyces carlsbergensis* 1693. Medium: nach Atkin, Williams, Schultz u. Frey¹²⁾ (modifiziert) p_H 5.0. Bedingungen: 28°, 46 Stdn. Beimpfung: 1 Öse (1 mm \varnothing) einer 72-Stdn.-Kultur im gleichen Medium + 100 μ g Pantothen säure/ccm.

b) *Enterococcus* J. G. Au. Medium: „R-Citrat“ nach Möller, Weygand u. Wacker¹⁰⁾ + Tween 80 (0.1%), Caseinhydrolysat nach Skeggs u. Mitarbb.¹³⁾ 10% 0.2 ccm/ccm an Stelle von verdautem Casein, p_H 6.9. Bedingungen: 37°, 65 Stdn. Beimpfung: 1 Öse (1 mm \varnothing) einer 24-Stdn.-Kultur aus „R-Citrat“ + 100 μ g Pantothen säure/ccm.

c) *Lactobacillus helveticus* V 80. Medium: „R-Acetat“ nach Möller, Weygand u. Wacker¹⁰⁾ + Tween 80 (0.1%), p_H 6.6. Bedingungen: 37°, 64 Stdn. Beimpfung: 1 Öse (1 mm \varnothing) einer 48-Stdn.-Kultur im gleichen Medium + 410 μ g Pantethein/ccm.

Beschreibung der Versuche

S-Methyl- und *S*-Äthyl-thioäthanolamin: Diese Thioäther wurden durch Eintropfenlassen von 4.3 g ($1/10$ Mol) Äthylenimin in die auf -15° gekühlten Lösungen von $1/10$ Mol der Mercaptane in 20 ccm Methanol und Stehenlassen über Nacht bei Zimmertemperatur nach dem Abdampfen des Methanols i. Vak. durch Destillation erhalten. Sdp. der Methylverbindung 146–148°/760 Torr, der Äthylverbindung 163°/760 Torr. Die Hydrochloride scheiden sich beim Einleiten von trockenem Chlorwasserstoff in die absol. äther. Lösung in glänzenden hygroscopischen Blättchen ab. Schmp. 120° (Methylverb.), 147° (Äthylverb.).

S-Methyl-pantethein (II): 1.2 g staubtrockenes Natrium-*d*-pantothenat werden in 5 ccm wasserfreiem Dimethylformamid unter schwachem Erwärmen gelöst. Die Lösung wird bei 0° tropfenweise mit 0.5 g Chlorameisensäureäthylester versetzt und einige Stunden bei dieser Temperatur stehengelassen. Danach hat sich Natriumchlorid ausgeschieden. In die gekühlte Lösung werden nun 0.46 g *S*-Methyl-thioäthanolamin gegeben, wobei lebhaftes CO₂-Entwicklung erfolgt. Nach mehrstdg. Stehenlassen wird die vom Natriumchlorid abfiltrierte Lösung i. Vak. abgedampft, der Rückstand in Butanol aufgenommen und diese Lösung im Gegenstromverfahren gegen gleiche Volumina butanolgesättigten Wassers 12mal verteilt. Das vom Natriumchlorid und der Pantothen säure befreite Produkt befindet sich in den beiden meist extrahierten Alkoholphasen aus denen das Lösungsmittel i. Vak. vollständig abgedampft wird. Dabei hinterbleibt II als hochviscoses, geruchloses, blaßgelbes Öl, das in Wasser, den niedrigen Alkoholen, Essigester und Aceton leicht, in Benzol, Chloroform und Äther schwer löslich ist; Ausb. 40% d. Theorie.

$C_{12}H_{24}O_4N_2S$ (292.3) Ber. C 49.3 H 8.28 N 9.58 Gef. C 48.76 H 8.43 N 9.03

S-Äthyl-pantethein (III) wird in analoger Weise mit ähnlicher Ausbeute unter Verwendung von *S*-Äthyl-thioäthanolamin gewonnen. Die Eigenschaften sind dieselben wie die von II.

$C_{13}H_{26}O_4N_2S$ (306.3) Ber. C 50.96 H 8.55 N 9.16 Gef. C 49.55 H 8.73 N 8.74

S-Phenyl-pantethein (IV): Im gleichartigen Ansatz wie oben, aber mit *S*-Phenyl-thioäthanolamin wird die in Wasser ziemlich schwer lösliche, ölige Verbindung mit etwa derselben Ausbeute wie oben gewonnen. Die Reinigung durch Gegenstromextraktion kann hier durch 5maliges Ausschütteln der butanolischen Lösung mit Wasser ersetzt werden.

$C_{17}H_{26}O_4N_2S$ (354.2) Ber. C 57.61 H 7.40 N 7.91 Gef. C 57.08 H 7.40 N 7.05

¹²⁾ L. Atkin, W. L. Williams, A. S. Schultz u. C. N. Frey, Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 16, 67 [1944].

¹³⁾ H. K. Skeggs, H. M. Nepple, K. A. Valentik, J. W. Huff u. L. D. Wright, Journ. biol. Chem. 184, 211 [1950].

d.-Pantothensäureamid (V): In die aus 2.4 g Natriumpantothenat und 1 g Chlorameisensäureäthylester in 15 ccm Dimethylformamid wie oben bereitete und vom Kochsalz abfiltrierte, aber auf -60° gekühlte Lösung des gemischten Anhydrids gibt man 1.5 ccm flüssiges Ammoniak. Man läßt nun langsam auf Zimmertemperatur erwärmen und dampft das Lösungsmittel bei 40° i. Vak. ab. Die Reinigung gelingt durch Gegenstromverteilung zwischen Butanol und Wasser, wobei das Amid die alkohol. Phase bevorzugt. Daraus wird V durch Abdampfen des Lösungsmittels i. Vak., später im Exsiccator als farbloses Öl erhalten, das nicht zur Kristallisation zu bringen war. Leicht löslich in Wasser und Butanol, schwer löslich in Benzol und Äther; Ausb. 40% d. Theorie.

$C_9H_{18}O_4N_2$ (206.2) Ber. C 49.52 H 8.31 N 12.83 Gef. C 49.04 H 8.45 N 12.34

α -Oxy- β - β -dimethyl- γ -butyrolacto-iminoäther-hydrochlorid (VI): In die gut getrocknete Lösung von 5 g α - γ -Dioxy- β - β -dimethyl-butyroneitril in 50 ccm Äther wird unter Eiskühlung bis zur Sättigung trockener Chlorwasserstoff eingeleitet. Nach einiger Zeit beginnt die Abscheidung von Kristallen, die durch Stehenlassen des geschlossenen Gefäßes über Nacht vervollständigt wird. Man saugt dann schnell über einer Glasfritte ab und trocknet im Exsiccator im Kühlschrank; Ausb. nahezu quantitativ. Zur Analyse wurde durch schwaches Erwärmen in Eisessig gelöst, klar filtriert und das nach einigen Tagen in kurzen Prismen ausgeschiedene Hydrochlorid über Kaliumhydroxyd i. Vak. getrocknet.

$C_6H_{11}O_2N \cdot HCl$ (165.6) Ber. N 8.46 Cl 21.54 Gef. N 8.59 Cl 21.73

156. Rudolf Tschesche und Karl-Hans Brathge: Über pflanzliche Herzgifte, XIX. Mitteil.: Die Glykoside der Uzara-Wurzel

[Aus der Biochemischen Abteilung des Chemischen Staatsinstituts der Universität Hamburg]

(Eingegangen am 15. April 1952)

Aus dem Extrakt der Uzara-Wurzel wurden neben dem bekannten Uzarin 3 neue Glykoside isoliert, die die Bezeichnung Xysmalorin, Urezin und Uzariosid erhielten. Letzteres ist ein Triglucoxid des Uzaringenins, während die beiden erstgenannten Glykoside sich von 2 neuen Aglykonen, Xysmalogenin und Urezigenin $C_{23}H_{32}O_4$, ableiten. Beide sind mit Uzaringenin isomer und die dazugehörigen Glykoside enthalten wie Uzarin 2 Moll. Glucose. Urezigenin ist das 3(α)-Isomere des Uzaringenins, beide Aglykone geben das gleiche Keton, während Xysmalogenin sich vom Uzaringenin an wenigstens 2 Asymmetriezentren zu unterscheiden scheint, deren Stellung noch näher zu ermitteln bleibt. Vermutlich ist eine Umkehr sowohl an C^8 wie C^{14} erfolgt. Die Abspaltung der Glucose ließ sich in jedem Fall durch Fermentpräparate aus *Aspergillus oryzae* bewirken. Xysmalorin fand sich auch als die Komponente einer Glykosid-Fraktion aus *Xysmalobium undulatum* R. Br. neben Uzarin.

Aus dem unter der Bezeichnung „Uzaron“ bekannten Extrakt der „Uzara-Wurzel“ ist bisher als einheitliche kristallisierte Verbindung nur das Uzarin bekannt, das zuerst von W. Hennig¹⁾ isoliert wurde und später von A. Windaus und E. Haack²⁾ genauer untersucht worden ist. R. Tschesche und K. Bohle³⁾ erkannten die richtige Zusammensetzung zu $C_{35}H_{54}O_{14} + 1 H_2O$ und zeigten, daß es sich durch Säure in Anhydro-uzaringenin $C_{23}H_{32}O_3$ und

¹⁾ Arch. Pharmaz. **225**, 382 [1917]. ²⁾ B. **63**, 1377 [1930]. ³⁾ B. **68**, 2252 [1935].