

50. Zur Bestimmung von Vitamin B₁ (Aneurin)

von Walter Karrer und Ulrich Kubli.

(13. III. 37.)

Bei der Bestimmung von Vitamin B₁ war man bis vor kurzem auf rein biologische Prüfungsmethoden (Rattenwachstumstest, kurativer Taubentest, Catatorulintest, elektrokardiographische Methode nach *Birch* und *Harris*¹⁾) angewiesen. Von diesen Methoden hat sich im pharmakologischen Laboratorium der Firma *F. Hoffmann-La Roche & Co., A.-G.* besonders die elektrokardiographische als sehr brauchbar und zuverlässig erwiesen (Genauigkeit bei Verwendung von 6 Ratten etwa $\pm 10\%$). Sie besitzt aber den Nachteil, dass auch bei Vorhandensein einer genügenden Zahl von B₁-avitaminotischen Ratten die Dauer der Prüfung immerhin etwa 5 Tage beträgt, eine reichlich lange Zeit für den mit Vitamin B₁-Arbeiten beschäftigten Chemiker, der zur Fortsetzung der laufenden Untersuchung oft viel rascher über den B₁-Gehalt seiner Präparate orientiert sein möchte.

Die von *Kinnersley* und *Peters*²⁾ 1934 für B₁ angegebene Farbenreaktion mit diazotierter Sulfanilsäure in alkalischer Lösung erwies sich als zu wenig spezifisch; nur ein negativer Ausfall der Reaktion gibt eindeutigen Aufschluss.

Kürzlich teilten *Prebluda* und *McCollum*³⁾ eine weitere Farbenreaktion zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Vitamin B₁ mit. Darnach geben diazotiertes p-Amino-acetanilid und p-Amino-acetophenon mit B₁ in Wasser schwer lösliche rote Verbindungen. Diese Reaktionen sollen für B₁ spezifisch und sehr empfindlich sein.

Fast zur selben Zeit erschien von *Jansen*⁴⁾ eine weitere sehr beachtenswerte chemische Bestimmungsmethode für Aneurin. Nach dieser wird B₁ in bekannter Weise mit Kaliumferricyanid in alkalischer Lösung oxydiert, das entstandene Thiochrom in Isobutanol aufgenommen, diese Lösung mit ultraviolettem Licht belichtet und die dabei auftretende Fluoreszenz im *Cohen*'schen Fluorometer gemessen (photoelektrische Zelle in Verbindung mit einem Galvanometer). Mit dieser Methode erhielt *Jansen* sehr gute Resultate. Nach unseren Feststellungen fallen die Werte oft zu hoch aus, was wohl darauf zurückzuführen ist, dass in der Lösung — besonders bei Verwendung natürlicher Ausgangsstoffe — häufig noch andere fluoreszierende Substanzen anwesend sind, deren Fluoreszenz eben-

¹⁾ *T. W. Birch* and *L. J. Harris*, *Biochem. J.* **28**, 602 (1934).

²⁾ *H. W. Kinnersley* and *R. A. Peters*, *Biochem. J.* **28**, 667 (1934).

³⁾ *H. I. Prebluda* and *W. V. McCollum*, *Science* **84**, 488 (1936).

⁴⁾ *B. C. P. Jansen*, *R.* **55**, 1046 (1936).

falls auf die Photozelle wirkt, wodurch ein höherer Gehalt an Thiochrom bzw. B₁ vorgetäuscht wird. Zudem ist die Apparatur etwas heikel und nicht ohne weiteres überall unterzubringen.

Wir haben daher versucht, die Fluoreszenzstärke der Thiochrom-Isobutanollösungen im ultravioletten Licht durch unmittelbare Beobachtung und Vergleich mit einer Lösung von bekanntem Thiochrom- bzw. B₁-Gehalt zu messen. Eine allfällige zusätzliche weissliche oder gelbliche Fluoreszenz anderer Substanzen zur violetten Thiochromfluoreszenz wirkt für das Auge weniger störend als für die Photozelle. Unsere Versuche, die sich im übrigen eng an diejenigen von *Jansen* anlehnen, waren sehr befriedigend und haben uns bei chemischen Arbeiten über Vitamin B₁ so gute Dienste erwiesen, dass wir kurz darüber berichten möchten.

Als Vergleichssubstanz diente selbst dargestelltes reines, natürliches Vitamin B₁-hydrochlorid mit 440 000 I.E. pro g¹⁾. Von dieser Substanz stellten wir eine wässrige Lösung dar, die pro cm³ 5 I.E. Vitamin B₁ enthält. Diese Lösung ist — im Eisschrank aufbewahrt — lange Zeit haltbar.

Mittels einer geeichten Messpipette bringt man 0,20 cm³ dieser Lösung (= 1 I.E.) in einen graduierten Messzylinder zu 25 cm³ (mit Glasstöpsel), gibt aus einer Mikropipette 0,05 cm³ Kaliumferrieyanidlösung (1%) dazu und nach kurzem Mischen 3 cm³ Natronlauge (10%). Man schüttelt gelinde, aber andauernd 1 bis 1½ Minuten, gibt dann sofort 12 cm³ Isobutanol zu und schüttelt kräftig etwa 2 Minuten bei geschlossenem Messzylinder. Man lässt bei Zimmertemperatur stehen, bis klare Schichtentrennung erfolgt ist, pipettiert dann etwa 10 cm³ der Isobutanolschicht heraus und filtriert diese Lösung in ein Reagensglas. Das Filtrat ist völlig klar und farblos. 4 cm³ davon werden in ein Reagensglas abgemessen; diese Lösung bezeichnen wir als Typlösung. Als Reagensgläser benutzen wir *Schott'sche* Gläser von gleicher lichter Weite. Es ist ratsam, die Gläser vor Gebrauch unter der U. V.-Lampe zu prüfen und diejenigen auszuschalten, deren Glas bei der Belichtung eine stärkere, besonders rötlichbraune Fluoreszenz zeigt.

Als Lichtquelle dient uns eine gewöhnliche Hanauer Analysen-Quarzlampe, deren Brennkammer nach unten und zum Teil auch nach vorn durch Nickeloxyd-Filterglas abgeschlossen ist.

Die auf ihren B₁-Gehalt zu prüfenden Substanzen oder Lösungen werden nun in ganz gleicher Weise oxydiert wie die Vergleichslösung aus reinem B₁. Wenn man den zu bestimmenden B₁-Gehalt einiger-massen kennt oder abschätzen kann, wird man am besten auch unge-

¹⁾ Dieser Wert wurde in unserem pharmakologischen Laboratorium nach der elektrocadiographischen Methode bestimmt. Als bester Durchschnittswert werden in der Literatur für 1 g B₁-Hydrochlorid 437 000 I.E. angegeben (*H. W. Kinnersley, J. R. O'Brien and R. A. Peters, Biochem. J. 29, 701 (1935)*).

fähr 1 I.E. B_1 in 0,2 cm³ Lösung zur Oxydation verwenden. Ist dagegen die Grössenordnung des zu bestimmenden B_1 -Gehaltes vollkommen unbekannt oder ist B_1 nur in sehr geringen Mengen vorhanden, so setzt man zweckmässig 3—4 Lösungen zur Oxydation an, und zwar verwendet man verschiedene Mengen der zu untersuchenden Lösung bei gleichbleibender Menge des Oxydationsmittels oder man variiert die Menge des Oxydationsmittels bei gleichbleibender Menge der zu untersuchenden Lösung. *Jansen* stellte fest, dass die Menge der Kaliumferricyanidlösung eine wichtige Rolle spielt, indem ein Überschuss zerstörend auf das Thiochrom wirken kann. Uns scheint allerdings der entgegengesetzte Fall, das heisst die Verwendung einer zu geringen Menge Kaliumferricyanid, praktisch wichtiger zu sein. Bei Anwesenheit anderer leicht oxydierbarer Substanzen können diese das Oxydationsmittel ganz oder zum Teil verbrauchen, so dass für die Oxydation des B_1 zu wenig Kaliumferricyanid übrig bleibt.

Die oxydierte Lösung wird wie oben mit 12 cm³ Isobutanol ausgeschüttelt; die Trennung der Schichten erfolgt — je nach Reinheit der Präparate — in 1—3 Stunden. Von der filtrierten Thiochromlösung werden 4 cm³ in ein Reagensglas abgemessen. Diese 4 cm³ Lösung vergleicht man nun mit der Typlösung bei auffallendem U.V.-Licht, indem man die zwei Reagensgläser schief nebeneinander stellt und von oben beobachtet:

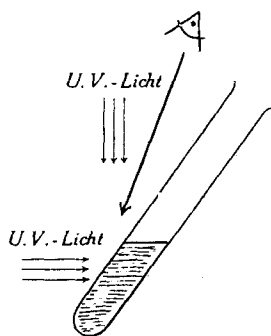


Fig. 1.

Beim Vergleich der Fluoreszenz tauscht man die beiden Reagensgläser öfters gegeneinander aus, um Beobachtungsfehler herabzumindern. Diejenige Lösung, die eine stärkere violette Fluoreszenz zeigt, wird durch Zusatz von Isobutanol, das man aus einer Bürette zufließen lässt, auf gleiche Fluoreszenzintensität gebracht. Vor der Ablesung sind die Lösungen in den beiden Reagensgläsern immer, auf gleiche Schichthöhe einzustellen. Ist Fluoreszenzgleichheit erreicht, so erfolgt die Berechnung, die recht einfach ist, da 12 cm³

der Typlösung 1 I.E. Vitamin B_1 entsprechen.

Die hier geschilderte Methode ist einfach und erfordert wenig Zeit, jedoch ist der mögliche Versuchsfehler bis auf etwa $\pm 20\%$ zu veranschlagen, was aber für die meisten Fälle ausreichend genau sein dürfte. Dabei ist zu bemerken, dass Abweichungen vom Soll-Gehalt vielleicht weniger auf die subjektiven Beobachtungsfehler zurückzuführen sind als vielmehr auf eine unvollständige oder zu weitgehende Oxydation. Zu beachten ist noch, dass die Typlösung jeden Tag, an denen Auswertungen ausgeführt werden, frisch her-

gestellt werden muss, da die Thiochrom-Isobutanollösungen auch bei diffusem Tageslicht nicht lange haltbar sind.

Wir haben nach dieser Methode weit über 100 Substanzen und Lösungen meist natürlicher, zum Teil aber auch synthetischer Herkunft auf ihren B₁-Gehalt untersucht. Zur Kontrolle wurden verschiedene davon in unserem pharmakologischen Laboratorium von Herrn Dr. M. Reinert auch nach der elektrokardiographischen Methode ausgewertet. Es wurden folgende Resultate erhalten:

	A nach der Thiochrommethode	B nach der elektrokardiogr. Methode	Abweichung der Werte A von B
1. Substanz	3250 I.E./g	2800 I.E./g	+ 16%
2. ..	2660 I.E./g	2480 I.E./g	+ 7%
3. ..	220000 I.E./g	270000 I.E./g	- 19%
4. ..	3125 I.E./g	2500 I.E./g	+ 25%
5. ..	3500 I.E./g	3400 I.E./g	+ 3%
6. ..	8000 I.E./g	10000 I.E./g	- 20%
7. ..	3000 I.E./g	3250 I.E./g	- 8%
8. Lösung	500 I.E./cm ³	480 I.E./cm ³	+ 4%
9. ..	400 I.E./cm ³	420 I.E./cm ³	- 5%
10. ..	420 I.E./cm ³	420 I.E./cm ³	0
11. ..	620 I.E./cm ³	560 I.E./cm ³	+ 11%
12. ..	620 I.E./cm ³	600 I.E./cm ³	+ 3%

Unter diesen 12 parallel ausgeführten Auswertungen beträgt nur bei einer (Nr. 4) die Abweichung etwas mehr als 20%.

Den internationalen B₁-Fullererde-Standard haben wir ebenfalls nach unserer Methode ausgewertet. Wir oxydierten jeweils 20 mg Fullererde-Adsorbat (= 2 I.E.) mit wechselnden Mengen Kaliumferricyanidlösung und erhielten folgende Resultate:

Standard-Fullererde-Adsorbat	Kaliumferricyanid-Lösung (1%)	Natronlauge (10%)	ermittelte I.E.
20 mg	0,1 cm ³	3 cm ³	0,6 0,7
20 mg	0,15 cm ³	3 cm ³	0,8
20 mg	0,2 cm ³	3 cm ³	1,3
20 mg	0,3 cm ³	3 cm ³	1,5 1,7
20 mg	0,4 cm ³	3 cm ³	2,0 1,7 2,0
20 mg	0,6 cm ³	3 cm ³	2,0 2,0
20 mg	0,8 cm ³	3 cm ³	2,5 2,0
20 mg	1,0 cm ³	3 cm ³	2,0 2,2
20 mg	1,5 cm ³	3 cm ³	2,0
20 mg	2,0 cm ³	3 cm ³	2,0

Während *Jansen* zur Oxydation von 20 mg Fullererde-Standard nur 0,1 cm³ Kaliumferricyanidlösung verwendete, beobachteten wir, dass mindestens 0,4 cm³ erforderlich sind, um zu den Maximalwerten zu gelangen, die der Definition des Standards entsprechen. Ein Überschuss an Kaliumferricyanidlösung schadete auch in weiten Grenzen nicht; darin stimmen unsere Resultate mit denen von *Jansen* also nicht überein.

Zusammenfassend können wir sagen: Für die Bestimmung von Vitamin B₁ hat sich in vielen Fällen eine Modifikation der Methode von *Jansen* als brauchbar erwiesen, die darin besteht, dass man die B₁-haltige Substanz bzw. Lösung alkalisch mit Kaliumferricyanid oxydiert, das entstandene Thiochrom in Isobutanol aufnimmt und die Intensität der im U.V.-Licht auftretenden violetten Fluoreszenz mit derjenigen einer Lösung von bekanntem Thiochrom- bzw. B₁-Gehalt durch unmittelbare Beobachtung vergleicht.

Mit der Prüfung der Methode auf ihre Brauchbarkeit zur Bestimmung von B₁ bei biologischen Untersuchungen (z. B. im Harn) sind wir beschäftigt.

Basel, Wissenschaftliche Laboratorien der
F. Hoffmann-La Roche & Co., Aktiengesellschaft.

51. Über Derivate des m- und p-Phenylen-diamins sowie des 6-Amino-oxindols

(29. Mitteilung über Stickstoff-Heterocyclen¹⁾)

von **Paul Ruggli** und **Richard Grand**.

(15. III. 37.)

In Fortsetzung früherer Synthesen²⁾ von Derivaten des Benzodipyrrols (I) haben wir geprüft, ob sich der Aufbau von Indolderivaten aus Anilin und seinen Abkömmlingen, der längst von zahlreichen Forschern anlässlich der Indigosynthesen bearbeitet worden ist, auch mit zweiwertigen Komponenten wie m- und p-Phenylendiamin oder ähnlichen Substanzen ausführen lässt.

Nach unseren bisherigen Erfahrungen gelingt die Synthese von Benzo-dipyrrolderivaten auch mit Diaminen der Benzolreihe³⁾ verhältnismässig glatt, wenn in den o-Stellungen zu den Aminogruppen Kohlenstoff-Seitenketten mit Carbonylgruppen in β -Stellung vorhanden sind, die unter Wasserabspaltung den Ring schliessen. Die

¹⁾ Letzte Mitteilung *Helv.* **20**, 272 (1937).

²⁾ *P. Ruggli* und Mitarbeiter, *Helv.* **16**, 69 (1933); **18**, 613 (1935); **19**, 326, 928 (1936).

³⁾ *P. Ruggli* und *O. Straub*, *Helv.* **19**, 326 (1936).