

in wenig Alkohol auf. Nach längerem Stehen im Eisschrank hatte sich das Allophanat ausgeschieden. Es wurde aus wenig Alkohol umkristallisiert, wobei eine sehr geringe Menge eines schwerlöslichen Nebenproduktes zur Abtrennung gelangte.

Das so gewonnene Allophanat schmolz nach vorgängigem Sintern bei 73° und zeigte mit dem Allophanat des Dihydro-phytols (Smp. 73°, Gef. C = 68,76, H = 11,83 %) keine Schmelzpunktserniedrigung.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

### 161. Über die Photosynthese eines fluoreszierenden Stoffes der Thiazolreihe (Vitachrom)

von P. Karrer und M. C. Sanz<sup>1)</sup>.

(23. VII. 43.)

Bei Bestrahlungsversuchen der Thiazolkomponente des Aneurins (4-Methyl-5-oxyäthyl-thiazol<sup>2)</sup>) auf der photochemischen Wirkplatte wurde von R. Stämpfli<sup>3)</sup> das Auftreten einer starken Fluoreszenz im Gebiete zwischen 210 und 400 m $\mu$  beobachtet. Dieselbe starke Fluoreszenz tritt auf bei der Bestrahlung einer wässerigen Lösung desselben Präparates mit einer Quecksilberdampf Lampe: schon nach einer Minute Bestrahlungsdauer erscheint die Lösung hellblau fluoreszierend im Wood'schen Licht. Die Fluoreszenz nimmt während einer langen Bestrahlungsdauer (bis zu 40 Stunden) sehr stark zu. Sie ist sehr ähnlich derjenigen von Thiochrom, besitzt aber eine viel grössere p<sub>H</sub>-Beständigkeit als letztere. Die Fluoreszenz ist am stärksten im sauren Gebiet (sehr kräftig sogar in konz. Schwefelsäure) und nimmt in alkalischem Milieu ab, ist aber bei p<sub>H</sub> 13 noch deutlich sichtbar, während Thiochrom nur in alkalischem Gebiet fluoresziert. Mit Natriumdithionit entsteht eine nicht fluoreszierende Leukoverbindung, die an der Luft wieder in die fluoreszierende übergeführt wird.

W. H. Schopfer<sup>4)</sup> hat in Fortsetzung seiner Arbeiten mit fluoreszierenden Vitalfarbstoffen wie Thiochrom, Lumiflavin und Lumichrom diesen neuen fluoreszierenden Stoff auf seine Verwendbarkeit in der Cytophysiologie untersucht. Er diffundiert ausserordentlich schnell in die Zellen ein und reichert sich in der Vakuole an, wird aber in sehr

<sup>1)</sup> Mit Unterstützung der „Roche“-Studienstiftung.

<sup>2)</sup> Synthetisches Präparat der Fa. Hoffmann-La Roche & Co., Basel.

<sup>3)</sup> R. Stämpfli, Med. Diss. 1942, Bern; R. Stämpfli, Verh. Schweiz. Physiol., Juni 1942, S. 9.

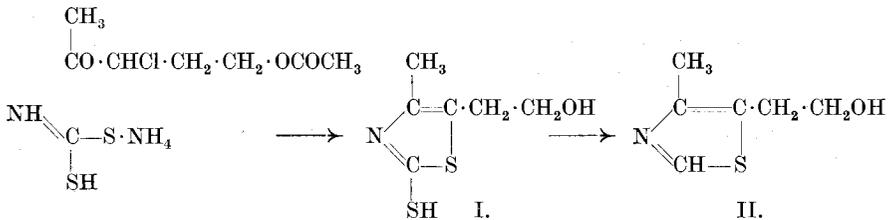
<sup>4)</sup> W. H. Schopfer, Helv. physiol. Acta 1, 49—50 (1943).

vielen Fällen — im Gegensatz zu den obengenannten Vitalfarbstoffen — durch das lebende Cytoplasma fixiert. Es ist meistens die Gegend des Zellkerns, die besonders stark fluoresziert. Bis jetzt konnten keine irgendwie schädigende Effekte dieses hervorragenden „fluorochrome vital primaire“ (nach Definition *Schopfer*) festgestellt werden. Auf Grund dieser Eigenschaften wurde die neue fluoreszierende Substanz von *Stämpfli* „Vitachrom“ genannt<sup>1)</sup>.

Auch für die tierische Physiologie scheint Vitachrom von Interesse zu sein, umso mehr als es sich am überlebenden Froschherzen und bei Injektionen an kleineren Tieren als völlig ungiftig erweist. Es scheint durch die Niere unverändert ausgeschieden zu werden.

In der vorliegenden Arbeit soll kurz die den Chemiker interessierende Seite dieses Problems: die Isolierung, Reindarstellung und die Frage der Konstitution des Vitachroms behandelt werden.

Als Ausgangsmaterial für die Belichtung diente ein durch Destillation gereinigtes 4-Methyl-5-oxyäthyl-thiazol der Fa. *F. Hoffmann-La Roche & Co.* Basel, das aus dithiocarbaminsaurem Ammonium und Methyl- $[\alpha$ -chlor- $\gamma$ -acetoxypropyl]-keton hergestellt worden war, wobei das primär gebildete 2-Mercapto-4-methyl-5-oxyäthyl-thiazol (I) durch Wasserstoffperoxyd und starke Salzsäure in 4-Methyl-5-oxyäthyl-thiazol übergeführt wird:



Aus diesem Präparat wurde durch Belichtung in 1-proz. wässriger Lösung ( $p_{\text{H}} = 8$ ) und nachfolgende chromatographische Reinigung die erste Menge von krystallisiertem Vitachrom erhalten<sup>2)</sup>. Da die Ausbeute indessen sehr gering war (nur 1–3 $\frac{0}{100}$  des Ausgangsmaterials), haben wir vermutet, dass das gebildete Vitachrom möglicherweise nicht aus 4-Methyl-5-oxyäthyl-thiazol entstanden sei, sondern aus einer Verunreinigung des verwendeten Präparates. Diese Vermutung fand sich bestätigt, als wir das 4-Methyl-5-oxyäthyl-thiazol über das Pikrat reinigten. Das aus dem Pikrat zurückgewonnene Präparat liess auch nach längerer Bestrahlung durch die U. V.-Lampe keine Fluoreszenz erkennen.

Nach Abtrennung des 4-Methyl-5-oxyäthyl-thiazols als Pikrat aus dem Rohprodukt blieb ein Öl zurück, das unter 0,002–0,003 mm

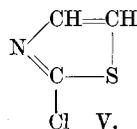
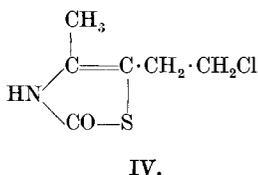
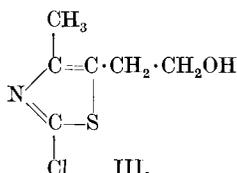
<sup>1)</sup> *R. Stämpfli*, *Helv. physiol. Acta* **1**, C 54 (1943).

<sup>2)</sup> Anscheinend entstehen daneben noch andere fluoreszierende Verbindungen, wenn auch nur in kleiner Menge. Vgl. auch *M. C. Sanz*, *Helv. physiol. Acta* **1**, C 7 (1943).

Druck bei 88–92° destillierte, neutral reagierte, kein Pikrat bildete und sich in verdünnter wässriger Salzsäure nicht auflöste. In Wasser war es schwer, in Alkohol, Äther und Pyridin leicht löslich. Die Verbindung war Chlor-haltig und zeigte folgende Analysenergebnisse:

$C_6H_5ONSCl$	Ber. C 40,58	H 4,54	N 7,88	S 18,05	Cl 19,96%
	Gef. „ 40,68	„ 4,53	„ 7,84	„ 17,87	„ 19,78%

Vom 4-Methyl-5-oxyäthyl-thiazol (II) unterscheidet sich diese Substanz in der Zusammensetzung nur darin, dass sie statt eines Wasserstoffatoms ein Chloratom enthält. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache und der Bildungsweise der Verbindung aus dithiocarbaminsaurem Ammonium und Methyl-[ $\alpha$ -chlor- $\gamma$ -acetoxy-propyl]-keton und Nachbehandlung des Reaktionsproduktes mit konz. Salzsäure und Wasserstoffperoxyd muss man für das chlorhaltige Nebenprodukt in erster Linie die beiden folgenden Formeln III und IV in Betracht ziehen:



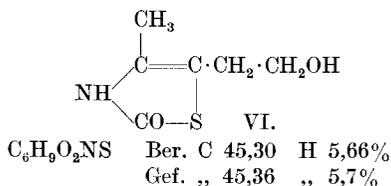
Die Unlöslichkeit in Säuren und die Unfähigkeit zur Pikratbildung wäre mit beiden Formulierungen vereinbar; 2-Chlor-thiazol<sup>1)</sup> (V) ist in verdünnten sauren Lösungen auch nicht leichter löslich als in Wasser. Die leichte Destillierbarkeit der Verbindung (ihr Siedepunkt ist ungefähr gleich hoch wie derjenige des 4-Methyl-5-oxyäthyl-thiazols) spricht aber gegen Formel IV, die mit der stark polaren säureamidartigen Gruppierung geringe Flüchtigkeit voraussehen lässt. Auch die Leichtlöslichkeit in Äther steht mit der Struktur IV nicht im Einklang. Zu Gunsten der Formulierung III sprach dann weiterhin der Acetylierungsversuch. Unsere Chlorverbindung liess sich in Pyridin mit Essigsäure-anhydrid acetylieren, wodurch die Anwesenheit eines alkoholischen Hydroxyls bewiesen ist. Das Monoacetylderivat ist ein viskoses Öl.

$C_6H_7ONSCl\cdot\text{COCH}_3$	Ber. C 43,72	H 4,59%
	Gef. „ 44,26	„ 4,63%

Schliesslich haben wir in der Verbindung das Chloratom durch OH ersetzt, indem wir sie mit wasserfreiem Kaliumacetat in Eisessig kochten und anschliessend mit 10-proz. wässriger Schwefelsäure hydrolysierten. Die erhaltene chlorfreie Verbindung bildete Krystalle vom Smp. 132–133°, war in Äther unlöslich, dagegen leicht löslich in Wasser und Alkohol, Eigenschaften, die mit dem Strukturbild VI

<sup>1)</sup> *Schatzmann*, A. **261**, 10 (1891).

harmonieren, das der Verbindung zukommen muss, wenn sie sich aus III gebildet hat.



Auf Grund dieser verschiedenen Feststellungen sind wir der Meinung, dass das chlorhaltige Nebenprodukt, das sich in dem rohen 4-Methyl-5-oxyäthyl-thiazol vorfindet, das 4-Methyl-5-oxyäthyl-2-chlorthiazol (III) ist, das sich aus dem Zwischenprodukt I unter der Wirkung der konz. Salzsäure gebildet hat.

Diese Chlorverbindung geht nun bei der Bestrahlung in wässrig-alkoholischer Lösung in eine sehr stark fluoreszierende Verbindung über, die anscheinend mit Vitachrom, dem hauptsächlichsten fluoreszierenden Bestrahlungsprodukt des rohen, die Chlorverbindung enthaltenden 4-Methyl-5-oxyäthyl-thiazols identisch ist. Die Hauptmenge von krystallisiertem Vitachrom, die uns zur Verfügung stand (ca. 45 mg), war direkt aus dem genannten Rohprodukt durch Bestrahlung dargestellt worden; wir haben aber auch eine Mischung von reinem 4-Methyl-5-oxyäthyl-thiazol mit 4-Methyl-5-oxyäthyl-2-chlorthiazol bestrahlt und dabei ebenfalls krystallisiertes Vitachrom isoliert (identifiziert durch Mischschmelzpunkt). Und schliesslich wurden auch aus dem Bestrahlungsprodukt der Chlorverbindung, ohne jeden anderen Zusatz, die charakteristischen, langen Krystallnadeln des Vitachroms erhalten. Die Ausbeuten sind in allen Fällen sehr schlecht, und sie variieren von Versuch zu Versuch, ohne dass die Ursache dieser Unterschiede schon erkannt wäre; man muss wohl annehmen, dass während der Bestrahlung neben Vitachrom noch andere Produkte oder Zersetzungsprodukte aus 4-Methyl-5-oxyäthyl-2-chlorthiazol gebildet werden. Auffallend ist es, dass bei der Bestrahlung von Lösungen des reinen 4-Methyl-5-oxyäthyl-2-chlorthiazols die Fluoreszenz viel später (erst nach ca. 3 Stunden) stärker auftritt, während sie bei der Mischung des 4-Methyl-5-oxyäthyl-thiazols mit 4-Methyl-5-oxyäthyl-2-chlorthiazol kurz nach Beginn der Bestrahlung einsetzt. Nach mehrstündiger Bestrahlung gleichen sich diese Differenzen in der Intensität aber aus.

Vitachrom ist eine ganz schwach gelbliche, in langen feinen Nadeln krystallisierende Substanz, die bei 175° (korr.) schmilzt. Die Krystalle fluoreszieren im Ultraviolett schwach gelblich grün, in Lösung aber sehr intensiv hellblau. Die Fluoreszenz von Vitachrom-Lösungen lässt sich noch bei Verdünnungen von 10<sup>-10</sup> deutlich erkennen; sie ist gleich stark wie diejenige 12mal konzentrierterer Lösungen von Thiochrom.

Das UltraviolettabSORptionsspektrum des Vitachroms wird durch Fig. 1 dargestellt. Es zeigt ein Absorptionsmaximum bei 361 m $\mu$ . (Thiochrom: 2 Absorptionsmaxima bei 358 und 375 m $\mu$ .<sup>1)</sup>)

Analyse und Molekulargewichtsbestimmung (in Campher) führen für Vitachrom zur Formel C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>.

C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub> N <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	Ber. C 50,73	H 5,63	N 9,80	S 22,45%	Mol.-Gew. 284
	Gef. „ 50,78	„ 5,49	„ 9,75	„ 22,76%	„ 330

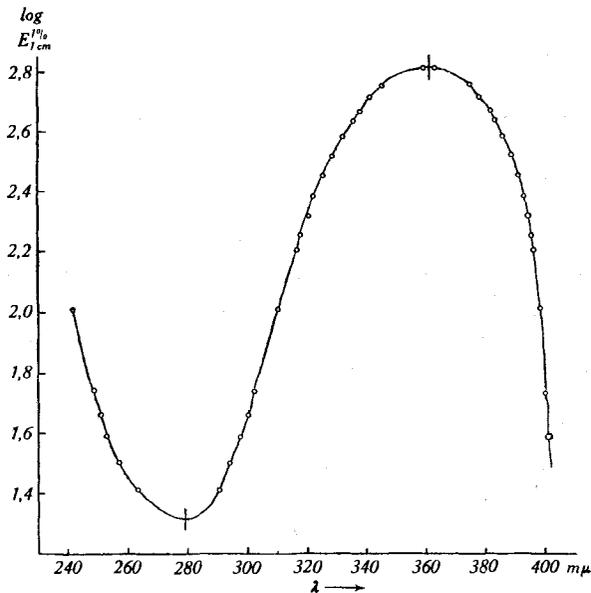


Fig. 1 (Vitachrom).

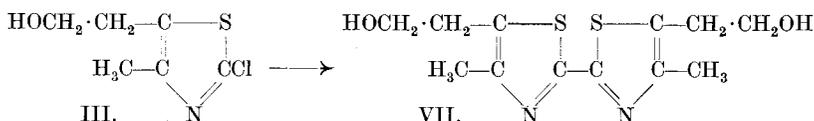
Die Verbindung enthält zwei acetylierbare alkoholische Hydroxylgruppen. Das durch Acetylierung mit Essigsäure-anhydrid in Pyridin dargestellte Diacetat bildet farblose, seidenglänzende Nadeln, die in Lösung sehr stark hellblau fluoreszieren.

C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub> N <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	Ber. C 52,25	H 5,48	N 7,60%
	Gef. „ 52,42	„ 5,44	„ 7,53%

Wie ersichtlich, unterscheidet sich Vitachrom in der Zusammensetzung von dem Ausgangsmaterial, aus dem es bei der Bestrahlung hervorgeht, durch das Fehlen des Chloratoms und Verdoppelung der Molekelgröße. Wenn diesem Ausgangsstoff, wie wir sehr wahrscheinlich machen konnten, die Formel des 4-Methyl-5-oxyäthyl-2-chlorthiazols (III) zukommt, so ergibt sich für Vitachrom mit einiger Wahrscheinlichkeit das Strukturbild VII, sofern bei der Bestrahlung nicht tiefgreifende Umlagerungen eingetreten sind. Dieses Strukturbild kann die meisten bekannt gewordenen Eigenschaften des Vita-

<sup>1)</sup> R. Kuhn, Wagner-Jauregg, van Klaveren, Vetter, Z. physiol. Ch. 234, 196 (1935).

chroms erklären, nur die starke Fluoreszenz bei einer Substanz ohne ortho-kondensierte Ringsysteme wäre auffallend. Die Formel bedarf daher weiterer Bestätigung durch neue Untersuchungen. Diese werden fortgesetzt, insbesondere soll die direkte Synthese von VII angestrebt werden.



### Ergänzungen zum experimentellen Teil.

#### Darstellung von Vitachrom durch Bestrahlung.

Relativ grosse Mengen von Vitachrom (ca. 45 mg) wurden von *R. Stämpfli*<sup>1)</sup> durch Bestrahlung von 30 g rohem 4-Methyl-5-oxyäthylthiazol, welches das chlorhaltige Nebenprodukt, 4-Methyl-5-oxyäthyl-2-chlorthiazol in Mengen von ca. 2–4% enthielt, dargestellt. Er bestrahlte 1-proz. wässrige Lösungen dieses Rohproduktes in einer Glasfilternutsche mit einer Philoralampe (deren Glaskolben entfernt worden war) je 50 Stunden aus einer Distanz von 12–14 cm, wobei zur Bewegung der Flüssigkeit ein Gas durch das Glasfilter gepresst wurde. Man beobachtete in der Fluoreszenzintensität keinen Unterschied, wenn als Gas einmal Sauerstoff, ein anderes Mal Stickstoff Anwendung fand.

Beim Eindunsten dieser bestrahlten Lösungen und längerem Stehen krystallisierte Vitachrom in feinen, leicht gelblichen Nadeln aus. Diese wurden aus heissem Wasser mehrmals umkrystallisiert. Smp. 175°.

In gleicher Art haben wir Mischungen von reinem 4-Methyl-5-oxyäthylthiazol mit 4-Methyl-5-oxyäthyl-2-chlorthiazol sowie reines 4-Methyl-5-oxyäthyl-2-chlorthiazol in wässrigen Lösungen bestrahlt und dabei Vitachrom in wechselnden Ausbeuten erhalten.

#### Trennung von 4-Methyl-5-oxyäthylthiazol und 4-Methyl-5-oxyäthyl-2-chlorthiazol.

Wir setzten zur ätherischen Lösung des Rohproduktes, das die beiden vorgenannten Thiazolverbindungen enthielt, alkoholische Pikrinsäurelösung im Überschuss. Das auskrystallisierte Pikrat des 4-Methyl-5-oxyäthylthiazols wurde mehrmals aus Wasser umkrystallisiert (Smp. 164°). Hierauf zerlegte man das Pikrat in wässriger Lösung bei Siedehitze mit starker Salzsäure und filtrierte nach dem Erkalten die ausgeschiedene Pikrinsäure ab. Nach dem Einengen der Lösung im Vakuum wurden ihr die letzten Reste Pikrinsäure durch

<sup>1)</sup> *R. Stämpfli*, *Helv. physiol. Acta.* Im Druck.

Äther entzogen, die Thiazolbase durch Zusatz konzentrierter Natronlauge unter Eiskühlung freigesetzt, mit Äther extrahiert und schliesslich im Hochvakuum destilliert. Unter 0,003 mm Druck ging das 4-Methyl-5-oxyäthyl-thiazol konstant bei 92–94° über.

Aus den Mutterlaugen der Pikratfällung wurden nach vollständiger Abtrennung des Pikrats sowie überschüssiger Pikrinsäure durch längere Extraktion der neutralisierten Lösung mit Äther 2,8 g eines viskosen, braunen Öles gewonnen. Bei der Destillation im Hochvakuum ging dieses bei einem Druck von 0,002–0,003 mm zwischen 88° und 92° (Luftbadtemperatur, Destillation aus einer Kugelröhre) als klare, leicht hellgelb gefärbte Flüssigkeit über. Diese Verbindung ist das weiter oben beschriebene 4-Methyl-5-oxyäthyl-2-chlorthiazol. Es ist in Wasser schwer, in Alkohol, Äther und Pyridin sowie auch in verdünntem wässrigem Alkohol leicht löslich.

Zürich, Chemisches Institut der Universität  
und Bern, Hallerianum.

## 162. Recherches sur l'amidon XXV.

### Le glycogène du muscle natif

par Kurt H. Meyer et R. Jeanloz.

(22 VII 43)

L'étude du *glycogène natif* a constitué le sujet de ce travail. Ce problème comprend 1° la *recherche de l'état du glycogène* dans l'organisme vivant: se trouve-t-il dans la cellule à l'état libre ou lié à des protéines? 2° La *préparation* du glycogène d'une manière ménagée, condition essentielle dans pareille recherche: aucune liaison chimique ne doit être scindée; et enfin 3° l'*étude du glycogène* ainsi obtenu.

Nous avons choisi comme matériel de départ les moules *Anodonta* qui sont riches en glycogène de muscle après avoir été nourries à la semoule.

#### 1. *Etat du glycogène dans la cellule.*

Au cours de ses nombreux travaux, *Pflüger*<sup>1)</sup> a nié l'existence d'une liaison du glycogène à d'autres constituants de la cellule. Par contre, *Willstätter* et *Rohdewald*<sup>2)</sup> ont déduit, de leurs essais d'extraction du glycogène de foie avec de l'eau chaude ou de l'acide trichloracétique dilué, qu'une partie se trouvait sous forme libre et soluble, le *lyoglycogène*, et que le reste était sous forme insoluble de « symplexe » avec des protéines: le *desmoglycogène*.

<sup>1)</sup> *E. Pflüger*, Das Glykogen, Bonn 1905 (2ème édit.), pp. 33 et 45.

<sup>2)</sup> *R. Willstätter* et *M. Rohdewald*, Z. physiol. Ch. **225**, 103 (1934).