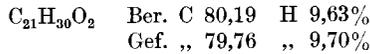


säure-methylester XIV. Diese Verbindung ist ein sehr zähes, gelbes Öl. Sdp. 0,001 mm 125—135°. (Kugelrohr, Luftbadtemperatur.)



Versetzt man die Chloroformlösung des Esters mit Antimontrichlorid, so nimmt sie eine weinrote bis violette Farbe an. Im Spektralapparat erkennt man eine einzige Bande mit Absorptionsmaximum bei 572 m μ .

Durch alkalische Verseifung des Esters XIV entsteht die kristallisierte Vitamin-A-carbonsäure XV(3,7-Dimethyl-9-[1',1';3'-dimethyl-c.-hexen-2'-yl-2']-nonatetraen-(2,4,6,8)-carbonsäure).

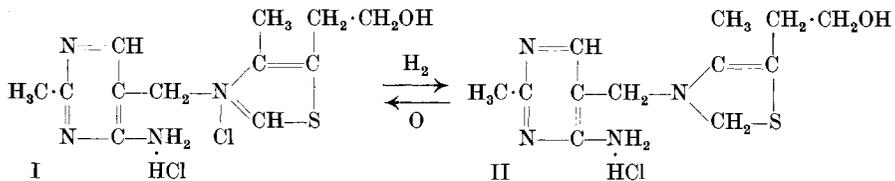
Zürich, Chemisches Institut der Universität.

90. Zur Frage des Wirkungsmechanismus des Vitamins B₁ und zur Kenntnis der Cocarboxylase

von P. Karrer und Max Viscontini.

(29. III. 46.)

Über die Wirkungsweise des Vitamins B₁ (Aneurin, Thiamin) in der lebenden Zelle sind verschiedene Ansichten geäußert worden. Nach der einen¹⁾ sollte Aneurin (I) mit einem Dihydroderivat (II) ein Redoxsystem bilden und in dieser Form in Zellreaktionen eingreifen:



Diese Auffassung war von Anfang an unwahrscheinlich, da die durch Na₂S₂O₄ reduzierten Aneurinlösungen keine Vitamin-B₁-Wirkung zeigten. Sie musste völlig aufgegeben werden, als wir nachweisen konnten²⁾, dass bei der Reduktion des Aneurins mit Natriumdithionit nicht ein Dihydroderivat gebildet, sondern die Verbindung reduktiv unter Freisetzung von 4-Methyl-5-oxyäthyl-thiazol gespalten wird.

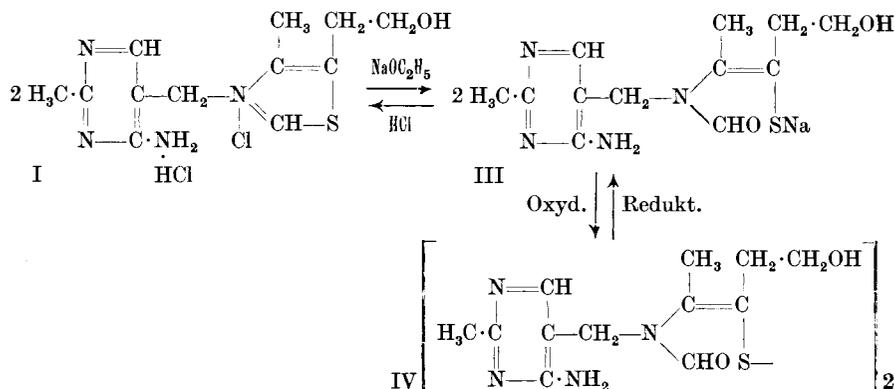
Nach der Ansicht von O. Zima und R. R. Williams³⁾ ist die Wirkung des Aneurins mit seiner Stellung als reduzierte Form eines Redoxsystems verknüpft. Die genannten Forscher hatten gefunden,

¹⁾ F. Lipmann, Nature **138**, 1097 (1937).

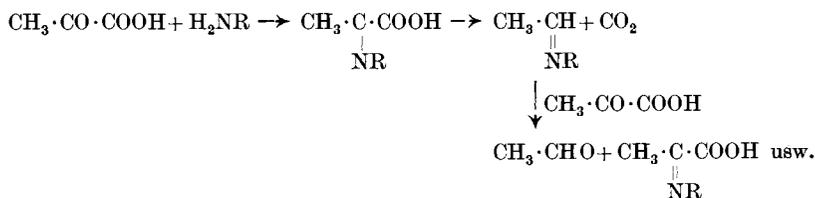
²⁾ P. Karrer, W. Graf, J. Schukri, Helv. **28**, 1523 (1945).

³⁾ O. Zima, R. R. Williams, B. **73**, 941 (1940). — O. Zima, K. Ritsert, T. Moll, Z. physiol. Ch. **267**, 210 (1941).

dass sich Aneurin (I) durch Natriumalkoholat in die Thiolform (III) überführen lässt, die leicht zur Disulfidform (IV) oxydiert wird. Aus IV bildet sich durch Reduktionsmittel (auch physiologische, wie Cystein und Glutathion) die Thiolform (III) zurück. Sowohl die Thiolform (III) wie die Disulfidform (IV) erwiesen sich im Tierversuch als Vitamin-B₁-Faktoren ungefähr gleich aktiv wie Aneurin selbst, so dass die Hypothese nahe lag, dass sie in der lebenden Zelle ineinander übergeführt werden und die Aneurinwirkung mit der Errichtung dieses Redoxsystems zusammenhängt.



Schliesslich wurde noch die Hypothese entwickelt, die Wirkung des Aneurins, bzw. seines Pyrophosphorsäure-esters (Cocarboxylase) beim Brenztraubensäure-Abbau beruhe darauf, dass es im Sinn des *Langenbeck-Zyklus*¹⁾ mit seiner primären Aminogruppe in Reaktion trete. Primäre Amine können zur Decarboxylierung von α -Ketocarbonsäuren zu den entsprechenden niedrigeren Aldehyden dienen, wobei Iminosäuren Zwischenprodukte sind, die (in vitro) bei höherer Temperatur unter Abgabe von CO₂ zerfallen.

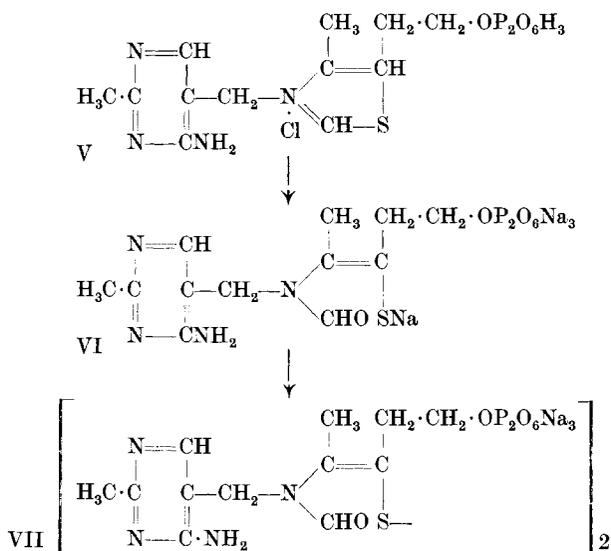


Irgendeine Beobachtung, dass dieses Abbauschema auch für die Decarboxylierung der Brenztraubensäure durch Aneurin-pyrophosphat in der Zelle Gültigkeit hätte, ist bisher nicht bekannt geworden.

Die im Folgenden beschriebenen Versuche können, wie wir glauben, die Frage des Wirkungsmechanismus des Aneurins und der Cocarboxylase weiter abklären.

¹⁾ *Ergeb. Enzymf.* **2**, 314 (1933).

Wir stellten aus Cocarboxylase (V) (Aneurin-pyrophosphat) und Natriumalkoholat die Thiolform VI her und aus letzterer durch Oxydation mit der berechneten Menge Jod die Disulfidform VII und prüften beide in der *Warburg*-Apparatur auf Cocarboxylase-wirkung. Als Apoferment (Proteinkomponente) diente in üblicher Weise mit alkalischem Phosphatpuffer gewaschene Trockenhefe. Die Versuche ergaben, dass Cocarboxylase V und ihre Thiolform VI im Fermentsystem aus Brenztraubensäure ungefähr gleich schnell CO₂ abspalteten (vgl. Fig. 1), dass dagegen das Disulfid VII ohne jede Wirkung ist.



Daraus ergibt sich, dass die Cocarboxylasewirkung des Aneurinpyrophosphats nichts mit der Bildung eines aus Thiolform (VI) und Disulfidform (VII) gebildeten Redoxsystems zu tun hat. Die Disulfidform ist inaktiv; wenn sie im lebenden Organismus trotzdem als B₁-Faktor ausgenutzt wird, so deshalb, weil sie durch die lebenden Zellen zum Thiol reduziert werden kann.

Nachdem, wie oben ausgeführt, auch die Bildung eines Redoxsystems aus Aneurin und einer Dihydrostufe der Verbindung experimentell ausgeschlossen werden konnte, ist es höchst unwahrscheinlich geworden, dass Vitamin B₁ in der lebenden Zelle an einem Redoxsystem beteiligt ist.

Zur Darstellung der Cocarboxylase (Aneurinpyrophosphat) haben wir zuerst die Methode von *J. Weijlard* und *H. Tauber*¹⁾ benützt, die in der direkten Veresterung des Aneurins mit Pyrophosphorsäure in

¹⁾ Am. Soc. **60**, 730, 2263 (1938).

Gegenwart von Phosphorsäure besteht. Die Herstellung liess sich vereinfachen und verbessern und die Ausbeute konnte erhöht werden. Neben dem Aneurin-pyrophosphorsäure-ester bildete sich in Ausbeuten bis zu 25% Aneurin-orthophosphorsäure-ester (Aneurin-monophosphat), das in prachtvoll krystallisiertem Zustand erhalten wird.

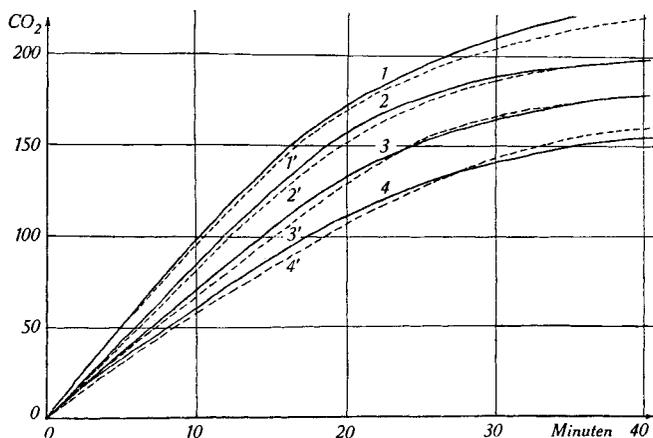


Fig. 1.

Ansatz: 5 mg Brenztraubensäure in 0,3 cm³ H₂O (+ eine Spur MgCl₂).
100 mg Trockenhefe in 2 cm³ Phosphatpuffer (p_H 6,2).

Kurve 1	1000 γ	Cocarboxylase
„ 2	500 γ	„
„ 3	250 γ	„
„ 4	125 γ	„
„ 1'	1000 γ	Thiolform d. Cocarboxylase
„ 2'	500 γ	„ „ „
„ 3'	250 γ	„ „ „
„ 4'	125 γ	„ „ „

Aneurin-monophosphat haben *K. Lohmann* und *P. Schuster*¹⁾ zuerst durch partielle Hydrolyse von Cocarboxylase gewonnen; sie fanden, dass das Monophosphat keine Cocarboxylasewirkung besitzt. An einem Aneurin-monophosphat-Präparat, das wir nach *Lohmann* durch Hydrolyse von Aneurin-pyrophosphat mit verdünnter Schwefelsäure hergestellt hatten, konnten wir dessen Inaktivität bestätigen. Die von uns durch direkte Einwirkung von Phosphorsäure und Pyrophosphorsäure auf Aneurin gewonnenen und mehrmals umkrystallisierten Aneurin-orthophosphat-Präparate, die richtige Analysenwerte ergaben, besaßen aber deutliche Cocarboxylase-Aktivität, die auf geringe Mengen (ca. 2—3%) von anhaftendem Aneurin-pyrophosphat zurückzuführen ist.

¹⁾ Bioch. Z. **294**, 188 (1937).

S. Ochoa und *R. A. Peters*¹⁾ haben gezeigt, dass Aneurin-orthophosphat (ebenso Aneurin und verschiedene andere Verbindungen) die Wirkung der Cocarboxylase stark steigern, so dass es erklärlich ist, dass die in den kristallisierten Aneurin-orthophosphat-Präparaten enthaltene, sehr geringe Menge Cocarboxylase noch eine nachweisbare Wirkung ausübt. Um die letzten Reste der Cocarboxylase zu entfernen, ist eine partielle Hydrolyse mit 0,2-n. Schwefelsäure nach der Vorschrift von *Lohmann* und *Schuster*²⁾ notwendig.

Die schlechten Ausbeuten an Cocarboxylase nach der Methode von *Weijlard* und *Tauber* sind teilweise darauf zurückzuführen, dass das Reaktionsprodukt in n. Salzsäure gelöst und aus dieser sauren Lösung als Chlorid der Cocarboxylase isoliert wird. Dabei findet eine beträchtliche Hydrolyse des Aneurin-pyrophosphats in Aneurin-monophosphat statt. Wenn man auf die Gewinnung des Cocarboxylase-chlorids verzichtet und an dessen Stelle das Cocarboxylase-phosphat herstellt, so ist es möglich, auf einfache Weise aus Aneurin und entwässelter Phosphorsäure bis zu 55% dieser Verbindung (berechnet auf angewandtes Aneurin) in beträchtlichem Reinheitsgrad zu erhalten. Die Methode wird im experimentellen Teil näher beschrieben.

Experimenteller Teil.

Synthetische Darstellung von Aneurin-pyrophosphat und Aneurin-monophosphat.

Die Darstellung des Aneurin-pyrophosphats (Cocarboxylase) führten wir nach dem Prinzip von *J. Weijlard* und *H. Tauber*³⁾ sowie *J. Weijlard*⁴⁾ aus. Die Reinigungsmethode wurde aber vereinfacht und verbessert und die Ausbeute liess sich erhöhen. Als zweites Produkt bildet sich bei der Synthese in guter Ausbeute das schön kristallisierte Aneurin-monophosphat (Aneurin-orthophosphat).

In einer Porzellanschale wird kristallisiertes Natriumpyrophosphat über freier Flamme erhitzt, bis kein Wasserdampf mehr entweicht. Gleichzeitig erhitzt man 15 cm³ 85-proz. Orthophosphorsäure (0,27 Mol) in einem Becherglas, bis sich an den Wandungen des Gefässes Krystalle abzuscheiden beginnen. Hierauf trägt man 3,6 g (0,0135 Mol) des entwässerten Natriumpyrophosphates in die erhitzte, wasserfreie Orthophosphorsäure ein und rührt bis zur Auflösung des Salzes. Nach der Abkühlung der Mischung auf 135° bringt man das Becherglas mit seinem Inhalt in ein Ölbad von 155° C und trägt auf einmal 6 g Aneurin (0,0178 Mol) unter starkem Rühren in die Schmelze ein; hierauf wird das Reaktionsgemisch während 15 Minuten bei 135° (Innentemperatur) gehalten.

Nun lässt man die zähflüssige Masse sich etwas abkühlen und verrührt sie, bevor sie erstarrt, mit 50 cm³ Aceton, welches die nicht in Reaktion getretene Orthophosphorsäure und Pyrophosphorsäure auflöst. Der Acetonauszug wird abgossen und der im Becherglas verbliebene Rückstand in gleicher Weise nochmals mit 50 cm³ Aceton ausbezogen. Dann löst man den Rückstand in 4 Liter n. Salzsäure und fällt die Aneurinester und das nicht in Reaktion getretene Aneurin durch Zusatz von ca. 100 cm³ 25-proz. Natriumwolframatlösung aus. Der Niederschlag wird abzentrifugiert, zweimal mit 0,8-n. Salzsäure gewaschen und mit 2 Liter Aceton verrührt, in welchem sich die Phosphor-

¹⁾ Biochem. J. **32**, 1501 (1938). — Nature **141**, 831 (1938).

²⁾ Bioch. Z. **294**, 188 (1937).

³⁾ Am. Soc. **60**, 2263 (1938).

⁴⁾ Am. Soc. **63**, 1160 (1941).

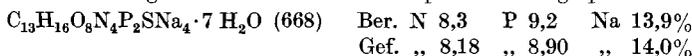
Gewinnung scheidet sich nach weiterem Zusatz von Aceton ein Gemisch von Aneurin-orthophosphat und Aneurin ab, das durch fraktionierte Krystallisation aus Wasser-Acetongemisch in die beiden Komponenten zerlegt werden kann.

Das auf diesem Weg dargestellte Aneurin-monophosphat ist identisch mit dem von *Lohmann* und *Schuster*¹⁾ durch kompliziertere Reinigungsmethoden gewonnenen Präparat. Es hat keine Cocarboxylasewirkung.

Darstellung des Natriumsalzes der Thioform des Aneurin-pyrophosphats (Cocarboxylase).

Man bringt 0,100 g Cocarboxylase in ein Zentrifugenröhrchen, fügt 3 bis 4 Tropfen Wasser hinzu und hierauf unter Eiskühlung tropfenweise 5-proz. Natriumäthylatlösung bis zur vollständigen Lösung der Cocarboxylase. Die Lösung nimmt gelbe Farbe an. Hierauf setzt man 1 cm³ absoluten Alkohol sowie einige Tropfen Äther zu, wobei das Natriumsalz der Thioform des Aneurin-pyrophosphates als gelblicher, amorpher Niederschlag ausfällt. Man zentrifugiert diesen ab, suspendiert ihn von neuem in 1 cm³ absolutem Alkohol, versetzt wieder mit wenigen Tropfen Äther und zentrifugiert ein zweites Mal. Schliesslich wird die Fällung ein drittes Mal mit Alkohol und wenig Äther behandelt, abgenutscht, mit Äther gewaschen und im Vakuum getrocknet. Ausbeute 0,1 g.

Dieses Tetranatriumsalz der Thioform der Cocarboxylase ist ein gelbes, sehr hygroskopisches Pulver, das sich besonders in Berührung mit feuchter Luft nicht unbeschränkt hält und nach Tagen infolge Zersetzung etwas nach Schwefelwasserstoff riecht. Da es sich auch beim Trocknen bei höherer Temperatur unter Entfärbung zu zersetzen scheint, haben wir es exsikkatortrocken analysiert. Es enthielt in diesem Zustand etwa 7 Mol H₂O; das Atomverhältnis von N:P:Na war das von der Formel verlangte, ein Beweis, dass bei der Herstellung dieses Salzes keine Phosphorsäure abgespalten worden war.



Darstellung des Natriumsalzes der Disulfidform des Aneurin-pyrophosphates (Cocarboxylase)²⁾.

0,080 g des frisch bereiteten vorbeschriebenen Salzes der Thioform der Cocarboxylase werden in der kleinst möglichen Menge destillierten Wassers gelöst und hierauf unter Kühlung eine verdünnte alkoholische Jodlösung tropfenweise zugesetzt, bis sich eben ein minimaler Jodüberschuss nachweisen lässt. Sollte sich während des Zusatzes der alkoholischen Jodlösung ein Niederschlag bilden, so bringt man diesen durch Zusatz einiger Tropfen Wasser wieder in Lösung. Nach beendeter Oxydation wird die Flüssigkeit im Vakuum zur Trockene gebracht, der Rückstand mit absolutem Alkohol verrieben, in diesem 24 Stunden liegen gelassen, vom Alkohol befreit und mit frischem Alkohol nochmals ausgezogen. Hierauf nutsch man das Pulver ab, wäscht mit Alkohol und Äther und trocknet im Vakuum. Ausbeute 0,065 g.

Dieses Natriumsalz des Cocarboxylase-disulfids zeigt keine Cocarboxylasewirkung. Da es von der Herstellung noch Spuren von Natriumjodid enthalten kann, haben wir uns überzeugt, dass 10% NaJ, der Cocarboxylase zugesetzt, deren Wirksamkeit nicht vermindert.

Darstellung von Cocarboxylase-phosphat.

Man erhitzt 5 g 85-proz. Orthophosphorsäure in einem Becherglas, bis sich an dessen Wandungen Krystalle zu bilden beginnen. Dann bringt man das Becherglas in ein Ölbad von 145° und trägt, nach erfolgtem Temperatenausgleich, 4 g Aneurin (Chlorid) auf einmal in die Phosphorsäure ein. Durch Rühren wird die Reaktionsmasse homogen gemacht und hierauf 15 Minuten bei der genannten Temperatur gehalten. Nach dem Erkalten löst man sie in 50 cm³ Wasser, fügt 3—4 Tropfen 85-proz. Phosphorsäure hinzu und versetzt mit 150 cm³ Aceton. Nach einigen Stunden hat sich aus dieser Lösung ein

¹⁾ Bioch. Z. **294**, 188 (1937).

²⁾ Vgl. dazu die Darstellung des Aneurin-disulfids: *Zima* und *Williams*, B. **73**, 941 (1940).

braunes, sehr viscoses Öl abgeschieden. Dieses löst man in 15 cm³ Wasser, entfärbt die Flüssigkeit mit etwas Kohle, filtriert und versetzt sie mit 80 cm³ Aceton. Nach mehrstündigem Stehen hat sich am Boden des Gefäßes ein Öl gesammelt, welches bei mehrtägigem Aufbewahren unter Aceton, das man mehrmals erneuert, fest und mikrokristallin wird. Diese Substanz besteht aus dem rohen, noch nicht ganz reinen Cocarboxylasephosphat, dessen Cocarboxylasewirkung ca. 80% derjenigen der reinen Cocarboxylase beträgt. Ausbeute 3,5 g (ca. 55% der Theorie).

C ₁₂ H ₂₁ O ₁₁ N ₄ SP ₃ , H ₂ O (540)	Ber. C 27,5	H 4,44	N 10,0	P 17,06%
	Gef. „ 26,5	„ 4,26	„ 10,35	„ 17,20%

Aus den Mutterlaugen dieser Fraktion lässt sich durch weiteren Zusatz von Aceton (200 cm³) und von Äther (50 cm³) eine zweite Fällung (2,1 g) von noch weniger einheitlichem Cocarboxylase-phosphat erhalten, dessen Phosphorgehalt 16,43% betrug. Es wird zur Überführung in reinere Cocarboxylase zweckmässig nochmals mit Phosphorsäure in der oben angegebenen Weise verestert.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

91. Ein neuer Abbau des Gitoxigenins.

Glykoside und Aglykone, 12. Mitteilung¹⁾

von Kuno Meyer.

(29. III. 46.)

Gitoxigenin (VII) unterscheidet sich von Digitoxigenin (V) durch eine zusätzliche HO-Gruppe in 16-Stellung²⁾. Sicher ist, dass die Ringe A und B in beiden Aglykonen gleich gebaut sind, denn *Jacobs* und *Gustus*^{c)} konnten durch eine Reihe von Abbaureaktionen, bei denen diese 2 Ringe nicht verändert wurden, aus beiden Aglykonen dieselbe Digitoxanol-disäure (II) erhalten, die weiter zur Ätiocholansäure (IV) abgebaut wurde³⁾. Kürzlich wurde durch Abbau von Digitoxigenin (V) zur 3β-Oxy-ätio-cholansäure (I) gezeigt¹⁾, dass die HO-Gruppe in (V) β-ständig angeordnet ist und dass (V) in 17-Stellung dieselbe Konfiguration besitzt wie die Gallensäuren. Obwohl es höchstwahrscheinlich, wenn auch nicht bewiesen⁴⁾ war, dass Gitoxigenin (VII) auch bezüglich der Ringe C und D gleich gebaut ist wie Digitoxigenin (V), wurde doch der Abbau des Gitoxigenindiacetats (VIII) mit KMnO₄ nach der früher beschriebenen Methodik^{f)} durchgeföhrt. Die einzelnen Reaktionen verliefen zwar normal, doch führten sie zu einem unerwarteten Endresultat, das bisher noch nicht abgeklärt werden konnte. Daher sind eine Reihe von Formeln vorläufig als hypothetisch zu betrachten. Sie sollen später noch auf ihre Richtigkeit geprüft werden.

¹⁾ 11. Mitt. *F. Hunziker, T. Reichstein*, *Helv.* **28**, 1472 (1945).

²⁾ *W. A. Jacobs, E. L. Gustus*, *J. Biol. Chem.* **79**, 553 (1928); **82**, 403 (1929); **88**, 531 (1930).

³⁾ *W. A. Jacobs, E. L. Gustus*, *Sci.* **80**, 434 (1934); *J. Biol. Chem.* **108**, 497 (1934).

⁴⁾ Bei der von *Jacobs* und *Gustus*^{c)} angewandten Reaktionsfolge sind verschiedene Isomerisierungen an den Ringen C und D sowie am C-Atom 20 möglich.