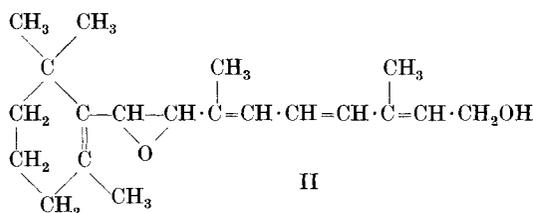
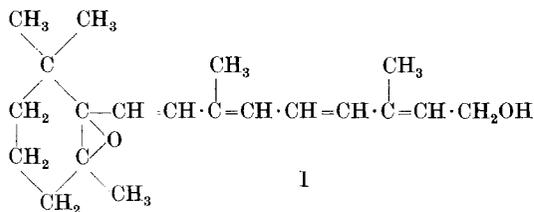


## 73. Über Vitamin A-Epoxyd (Hepaxanthin) II

von P. Karrer und E. Jucker.

(5. II. 47.)

Durch Oxydation von Vitamin A mit Phtalpersäure gelangten wir zu einem Vitamin A-Epoxyd<sup>1)</sup>, das in seinem Verhalten vollkommen mit dem in Leberölen vorkommenden „Hepaxanthin“ übereinstimmte. Für diese Verbindung wurde, in Analogie zu den vielen synthetisch gewonnenen und natürlich vorkommenden Carotinoid-epoxyden, Formel I in Vorschlag gebracht; es muss allerdings bemerkt werden, dass der Unterschied in der Lage der Absorptionsmaxima des Vitamins A und seines Epoxydes (Hepaxanthin) (53 m $\mu$ ) grösser ist als derjenige zwischen den Absorptionsmaxima der Carotinoid-Farbstoffe und ihrer Mono-epoxyde (8 m $\mu$ ), so dass auch die Möglichkeit in Betracht zu ziehen ist, dass im Vitamin A-Epoxyd der Sauerstoff nicht an der Doppelbindung des  $\beta$ -Jononringes, sondern an die folgende Äthylendoppelbindung angelagert wurde, entsprechend Formel II:



Für die erste Untersuchung stand uns nur ein unreines Vitamin A-Präparat zur Verfügung, und wir haben daher damals in Aussicht gestellt<sup>1)</sup>, das Studium dieser Oxydationsreaktion an einem reineren Präparat später fortzusetzen. Dazu ergab sich nunmehr die Gelegenheit, nachdem wir durch die freundliche Vermittlung von Herrn Dr. J. G. Baxter krystallisiertes Vitamin A von der *Distillation Products, Inc.*, Rochester, hatten beziehen können.

<sup>1)</sup> P. Karrer, E. Jucker, *Helv.* **28**, 717 (1945).

Die Oxydation dieses reinen Vitamin A-Präparates mit 1 Äquivalent Phtalpersäure führte, wie in den früheren Versuchen, zu einem Vitamin A-Epoxyd  $C_{20}H_{30}O_2$ , welches in seinen spektralen Eigenschaften und der Art der *Carr-Price*'schen Reaktion mit dem früher beschriebenen Präparat und mit dem Hepaxanthin aus Leberölen übereinstimmte. Das Maximum des U.V.-Absorptionsspektrums liegt bei  $275\text{ m}\mu$ ; die Extinktion ist auffallend niedrig (vgl. Fig. 1).

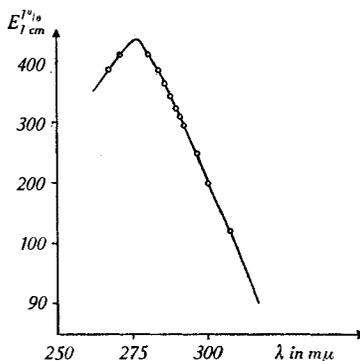


Fig. 1.  
Vitamin A-Epoxyd.

Neben diesem Hauptprodukt der Oxydation liess sich durch chromatographische Trennung an einer Aluminiumoxydsäule in kleinerer Menge eine zweite Substanz fassen, die wir vorläufig als „Verbindung Y aus Vitamin A“ bezeichnen. Ihr spektrales Verhalten ist von demjenigen des Vitamins A und Vitamin A-Epoxyds völlig verschieden. Ihr Absorptionsmaximum liegt wesentlich längerwellig als diejenigen der beiden andern Verbindungen, nämlich bei  $339\text{ m}\mu$ . Bei der *Carr-Price*-Reaktion beobachtet man eine Bande bei  $575\text{ m}\mu$ ; im Gegensatz zu jener des Vitamin A-Epoxydes bleibt diese aber bestehen und wird nicht durch eine solche bei  $620\text{ m}\mu$  abgelöst.

Über die chemische Natur der neuen Substanz kann zur Zeit nichts gesagt werden; sie liegt noch nicht rein vor, denn die Analyse führte zu C-Werten, die  $1,4\%$  tiefer liegen als der für die Formel  $C_{20}H_{30}O$  berechnete. Trotzdem steht es ziemlich sicher fest, dass sie nur ein O-Atom enthält; denn ausser der Analyse spricht dafür der Umstand, dass sie im Chromatogramm unter dem Vitamin A-Epoxyd liegt, was bei grösserem Sauerstoffgehalt nicht möglich wäre.

Das längerwellige Absorptionsmaximum ( $21\text{ m}\mu$  gegenüber Vitamin A) beweist das Vorliegen eines stärkeren Chromophors (vgl. Fig. 2). Man wäre versucht, an den Vitamin A-Aldehyd zu denken, der ein geringeres Haftvermögen als Axerophytol und ein längerwelliges Absorptionsspektrum haben muss, wenn nicht die Formel

des Vitamin A-Aldehyds schon für das Retinin<sub>1</sub> in Anspruch genommen worden wäre<sup>1)</sup>, welches andere spektrale Eigenschaften als unsere „Verbindung Y aus Vitamin A“ besitzt. Diese Fragen bedürften einer erneuten Prüfung.

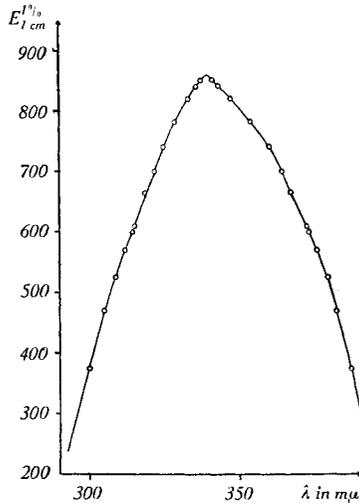


Fig. 2.  
Verbindung Y.

Wir haben schon in unserer letzten Mitteilung<sup>2)</sup> über Vitamin A-Epoxyd berichtet, dass dieses durch Chloroform, das sehr geringe Mengen Chlorwasserstoff enthält, in eine Verbindung übergeführt wird, welche in der Lage der Absorptionsbande im Ultraviolett- und im Blauspektrum (*Carr-Price*-Reaktion) mit Axerophthol übereinstimmt. Auch diese Reaktion ist indessen nicht einheitlich. Im Chromatogramm liessen sich neben geringen Mengen von Zersetzungsprodukten 2 Verbindungen abtrennen. Die eine, die wir als „Substanz Z aus Vitamin A-Epoxyd“ bezeichnen, stimmte in ihrer Zusammensetzung und ihrem spektralen Verhalten mit Axerophthol weitgehend überein, ist aber trotzdem von letzterem verschieden. Dies ergibt sich aus der biologischen Prüfung. Die von Herrn Prof. Dr. *H. von Euler* (Stockholm) durchgeführte Untersuchung der Verbindung auf Vitamin A-Wirkung ergab, dass sie selbst in Dosen von 100  $\gamma$  wirkungslos ist. „Substanz Z aus Vitamin A-Epoxyd“ muss daher eine von Axerophthol verschiedene Struktur besitzen.

Die zweite Substanz, die unter der Wirkung des chlorwasserstoffhaltigen Chloroforms aus Vitamin A-Epoxyd entsteht und die wir vorläufig als „Substanz X aus Vitamin A-Epoxyd“ bezeichnen,

<sup>1)</sup> *Ball, Goodwin und Morton*, *Bioch. J.* **40**, *Proceed.* LIX (1946).

<sup>2)</sup> *Helv.* **28**, 717 (1945).

ergab Analysenwerte, welche mit der Formel  $C_{20}H_{30}O_2$  harmonierten. Ihr U.V.-Spektrum ist dreibandig: 333,5, 350, 367,5  $m\mu$ , also längerwellig als dasjenige des Axerophytols. Die mit Antimontrichlorid-Chloroform erzeugte Blaufärbung weist eine Bande bei 619  $m\mu$  auf.

Die Carotinoid-epoxyde werden durch HCl-Chloroform bekanntlich grösstenteils in furanoide Oxyde umgelagert. Diesen kann unsere „Substanz X aus Vitamin A-Epoxyd“ in der Konstitution nicht entsprechen, denn diese Umlagerung würde eine Verschiebung der Absorptionsbande nach kürzeren Wellenlängen bedingen, während die Verhältnisse hier gerade umgekehrt liegen. So müssen wir auch die Frage nach der Konstitution der Verbindung X vorläufig offen lassen.

Die vorliegende Untersuchung hat keine Ergebnisse gezeigt, welche die Konstitution des Vitamin A-Epoxyds eindeutig beweisen. Für letzteres bleiben die Formeln I und II nach wie vor zur Diskussion. Eine erneute Prüfung der Verbindung auf Vitamin A-Wirkung, für die wir Herrn Prof. *H. v. Euler* (Stockholm) zu Dank verpflichtet sind, ergab, dass sie nur sehr geringe Vitamin A-Wirkung besitzt; 50  $\gamma$  sind eine ungenügende Dosis, mit 100  $\gamma$  wuchsen die Ratten normal.

### Experimenteller Teil.

#### 1. Oxydation von Vitamin A mit Phtalmonopersäure.

1,0 g kristallisiertes Vitamin A wurde in 300  $cm^3$  absolutem Äther gelöst, in der Kälte mit der berechneten Menge Phtalpersäure (auf 1 Mol Vitamin A 1 Atom aktiver Sauerstoff) versetzt und ca. 40 Stunden bei Raumtemperatur (etwa 15°) im Dunkeln stehen gelassen. Der Verlauf der Oxydation wurde durch Entnahme von Proben und Ausführung der *Carr-Price*-Reaktion verfolgt. Nach Verlauf der genannten Zeit schüttelte man die gebildete Phtalsäure mit sehr verdünnter Natronlauge aus, wusch die ätherische Lösung mit destilliertem Wasser alkalifrei und trocknete sie über frisch geglühtem Natriumsulfat. Sodann wurde das Lösungsmittel im Teilvakuum bei 20–30° abdestilliert, der gelbe Rückstand in absolutem, frisch destilliertem Benzol aufgenommen und an Aluminiumoxyd (*Merek*, nach *Brockmann*) chromatographiert. Infolge der guten Haftfestigkeit der Oxydationsprodukte an Aluminiumoxyd kommt man zur Adsorption mit einer kleinen Säule von 20  $\times$  2 cm aus, was sich auf die Ausbeute und die Reinheit der Präparate vorteilhaft auswirkt. Das Chromatogramm wurde mit Benzol entwickelt und zeigte folgenden Bau:

|                   |                 |                                       |
|-------------------|-----------------|---------------------------------------|
| 1. (oberste) Zone | 2 cm orange     | Blauspektrum: 620 $m\mu$ verschwommen |
| 2.                | 5 „ gelb        | „ : 575 $m\mu^*$ ) 620 $m\mu$         |
| 3.                | 3 „ gelb-orange | „ : 575 $m\mu$ (Produkt Y)            |
| 4.                | 4 „ hellgelb    | „ : 620 $m\mu$                        |

\*) Nach einigen Sekunden beginnt sich bei 620  $m\mu$  eine Bande zu bilden, während die Bande bei 575  $m\mu$  ausbleicht. Nach ca. einer Minute ist nur noch die Bande bei 620  $m\mu$  sichtbar.

Die Aufarbeitung des Chromatogramms geschah auf die übliche Weise, indem man durch Elution mit methanolhaltigem Äther den einzelnen Zonen die adsorbierten Stoffe entzog. Sodann dampfte man das Lösungsmittel im Teilvakuum bei etwa 30° ab und untersuchte die einzelnen Fraktionen.

Schicht 1 ergab nur Spuren einer orange-gelb gefärbten Substanz mit sehr unscharfem Blauspektrum. Vermutlich handelt es sich um höhere Oxydationsprodukte. Zur näheren Untersuchung reichte die erhaltene Menge nicht aus. Aus der 2. Zone erhielt man ca. 400 mg Vitamin A-Epoxyd, das nach erneuter Adsorption an Aluminiumoxyd analysenrein war und das charakteristische Ultraviolett-Spektrum besass (vgl. Fig. 1). Die Ausbeute betrug ca. 300 mg.

Schicht 3 lieferte nach der üblichen Aufarbeitung 120 mg einer gelb-orangen Verbindung, welche im folgenden als Verbindung „Y“ bezeichnet wird. („Y“ ist von uns schon bei der ersten Oxydation von Vitamin A beobachtet worden<sup>1)</sup>). Die Verbindung befand sich im Calciumhydroxyd-Chromatogramm in der Zone 4a und 4b, konnte damals aber infolge Materialmangel vom Vitamin A nicht getrennt und näher untersucht werden. In einer späteren Oxydation (unveröffentlicht) trat „Y“ wieder auf und zeigte das gleiche spektrale Verhalten wie das jetzige, weitgehend gereinigte Produkt.

Zur weiteren Reinigung haben wir „Y“ einer erneuten chromatographischen Adsorption unterworfen, wobei eine geringe Menge Vitamin A durchgewaschen werden konnte. Nach Elution mit methanolhaltigem Äther und Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum verblieben ca. 70 mg gelb-oranges Öl, welches folgende Eigenschaften besass: Beim Versetzen einer Chloroform-Lösung der Verbindung mit Antimontrichlorid tritt rot-violette Färbung auf mit einer Bande bei 575 m $\mu$ . Diese Bande bleibt — zum Unterschied von Vitamin A-Epoxyd — bestehen. Diese rot-violette Färbung bleicht nach kurzer Zeit aus.

„Y“ löst sich gut in Benzol, Äther und Alkohol, etwas schlechter in Petroläther. Die Elementaranalyse ergab folgende Werte:

C: 82,37%    H: 9,53%

Im Ultraviolett besitzt „Y“ ein Absorptionsmaximum bei 339 m $\mu$  (vgl. Fig. 2).

Nach der üblichen Aufarbeitung der 4. Schicht des Hauptchromatogramms erhielt man ca. 100 mg Vitamin A, das bei der Oxydation unverändert geblieben war.

## 2. Umlagerung des Vitamin A-Epoxyds.

400 mg Vitamin A-Epoxyd wurden in 100 cm<sup>3</sup> Chloroform, das sehr wenig HCl enthielt, gelöst und während 7 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Alsdann schüttelte man wiederholt mit verdünnter wässriger Natronlauge aus, trocknete die gelb-orange gefärbte Lösung über Natriumsulfat und destillierte das Lösungsmittel im Teilvakuum bei 30—40° ab. Den verbliebenen, gelb-orangen Rückstand löste man in Benzol und adsorbierte diese Lösung an eine Säule von Aluminiumoxyd (20 × 2 cm). Das Chromatogramm wurde mit dem gleichen Lösungsmittel entwickelt und zeigte folgenden Bau:

|                   |                 |              |   |
|-------------------|-----------------|--------------|---|
| 1. (oberste) Zone | 2 cm orange     | Blauspektrum | 617 m $\mu$ (unscharf)                              |
| 2.                | 3 „ gelb        | „            | 575 m $\mu$ 620 m $\mu$ *                           |
| 3.                | 6 „ gelb        | „            | 620 m $\mu$ (sehr scharf)                           |
| 4.                | 3 „ gelb-orange | „            | 618 m $\mu$ (unscharf)                              |
| 5.                | 6 „ orange-gelb | „            | 620 m $\mu$ (sehr scharf)<br>(wurde durchgewaschen) |

\*) Die Bande bei 575 m $\mu$  beginnt nach einigen Sekunden auszubleichen, und es bildet sich eine Bande bei 620 m $\mu$ , welche nach etwa einer Minute allein sichtbar ist.

<sup>1)</sup> P. Karrer, E. Jucker, Helv. **28**, 721 (1945).

Die Aufarbeitung des Chromatogramms geschah auf die übliche Weise.

1. Zone: Diese Schicht enthielt eine stark haftende Verbindung, die zur weiteren Reinigung erneut an Aluminiumoxyd chromatographiert wurde. Auf diese Art gewann man ca. 30 mg eines zähen Harzes, das nur ein ganz unscharfes Blauspektrum bei ca. 616  $m\mu$  zeigte. Die Elementaranalyse der Verbindung lieferte folgende Werte:

$$\begin{array}{l} \text{C: } 74,79; 74,25 \quad \text{H: } 9,27; 9,57\% \\ \text{akt. Wasserstoff: } 0,509\% \end{array}$$

2. Zone: Diese Schicht enthielt noch Spuren unverändertes Epoxyd.

3. Zone: Nach der üblichen Aufarbeitung erhielt man aus dieser Schicht ca. 70 mg eines gelb-orangen, viskosen Öles, das dasselbe Verhalten gegenüber Antimontrichlorid wie Vitamin A zeigte, im Gegensatz zu diesem aber bedeutend stärker an Aluminiumoxyd haftet (Vitamin A wird unter den angewandten Bedingungen aus der Säule durchgewaschen, während das beschriebene Produkt nur schwach wandert). Nach erneuter, zweimaliger Adsorption an Aluminiumoxyd hatten wir ca. 30 mg Substanz, die sich chromatographisch einheitlich verhielt. Auch im optischen Verhalten dieser Verbindung, die im folgenden als „Substanz X“ bezeichnet wird, lassen sich gegenüber Vitamin A grössere Unterschiede erkennen, indem „X“ ein gut ausgebildetes Dreibandenspektrum (in Äthanol) mit Maxima bei 333,5, 350, 367,5  $m\mu$  besitzt. (Vgl. Fig. 3.) Die Elementaranalyse von „X“ lieferte auf  $C_{20}H_{30}O_2$  stimmende Werte:

$$\begin{array}{l} C_{20}H_{30}O_2 \quad \text{Ber. C } 79,47 \quad \text{H } 9,93 \quad 1 \text{ aktiv. H} = 0,33\% \\ \text{Gef. } ,, 79,07 \quad ,, 9,75 \quad ,, ,, = 0,46\% \end{array}$$

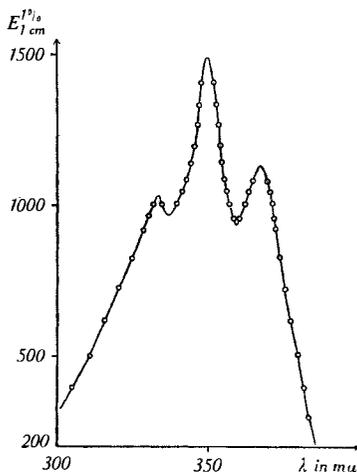


Fig. 3.

Umlagerungsprodukt X.

*Carr-Price*-Reaktion: blau, mit einer scharfen Bande bei 619  $m\mu$ .

Zone 4: Diese Schicht enthielt nur unbedeutende Mengen von verunreinigter „Substanz X“.

5. Zone: Aus dieser Schicht liessen sich ca. 250 mg „der Substanz Z aus Vitamin A-Epoxyd“ gewinnen, die zur weiteren Reinigung nochmals an einer Säule von Aluminiumoxyd chromatographiert wurde. Man erhielt auf diese Weise 170 mg der Substanz Z, die

im Ultraviolett ein Absorptionsmaximum bei 326—327 m $\mu$  zeigte (Fig. 4). Die Elementaranalyse ergab folgende Werte:

|                                   |        |       |   |        |
|-----------------------------------|--------|-------|---|--------|
| C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O | Ber. C | 83,83 | H | 10,58% |
|                                   | Gef. „ | 83,39 | „ | 10,26% |

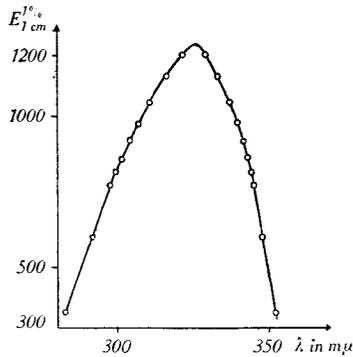


Fig. 4.

Substanz Z aus Vitamin A-Epoxyd.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

#### 74. Studien zur Darstellung von $\gamma$ -Globulin und dessen Komponenten von Ch. Wunderly.

(7. II. 47.)

Die komplexe Struktur der Serumproteine hat von zwei Seiten her eine neue Bestätigung erfahren. Einmal die Aussalzungskurven von *Roche, Derrien* und *Mandel*<sup>1)</sup> sowie *Derrien* (1946)<sup>2)</sup>. Dieselben haben durch entsprechend abgestufte Konzentrationen von  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  bei p<sub>H</sub> 6 und 37° die Serumproteine in 121 Fraktionen aufgetrennt. Werden die Punkte, welche sich aus diesen Löslichkeiten ergeben, in üblicher Weise auf einer Kurve vereinigt, so werden im Bereich der Albumine fünf und im Bereich der Globuline 7 Unstetigkeiten gefunden. Daraus folgt, dass die Fraktionen, wie sie mit analoger, wenn auch in weniger umfassender Weise *Butler* und Mitarb.<sup>3)</sup>, ferner *Kydd*<sup>4)</sup> (1934) und *Richards*<sup>5)</sup> (1938) erhalten hatten, nicht homogen

<sup>1)</sup> *Roche, Derrien* und *Mandel*, C. r. Soc. Biol. **138**, 515, 600, 634, 676, 677 (1944); **139**, 101 (1945), C. r. **220**, 572 (1945).

<sup>2)</sup> *Derrien*, Bull. Soc. Chim. biol. **26**, 1091 (1944); Th. Sc. Marseille **1946**, 143.

<sup>3)</sup> *Butler* und *Montgomery*, J. Biol. Chem. **99**, 173 (1932); *Butler, Blatt* und *Southgate*, J. Biol. Chem. **109**, 755 (1935).

<sup>4)</sup> *Kydd, D. M.*, J. Biol. Chem. **107**, 747 (1934).

<sup>5)</sup> *Richards, M. M.*, J. Biol. Chem. **122**, 727 (1938).