

198. Zur Herstellung der Cocarboxylase und des Aneurin-triphosphorsäure-esters

von M. Viscontini, G. Bonetti und P. Karrer.

(13. VI. 49.)

Im Zusammenhang mit unseren früheren Untersuchungen über die Wirkungsweise der Cocarboxylase¹⁾ hatten wir auch eine einfache Synthese des Cocarboxylase-phosphates mitgeteilt. *Velluz, Amiard und Bartos*²⁾ haben diese Synthese hierauf weiter studiert und berichtet, dass sie dabei nicht das Phosphat des Aneurin-pyrophosphorsäure-esters (Cocarboxylase-phosphat) erhielten, sondern Aneurin-triphosphorsäure-ester und sie haben daraus die Schlussfolgerung gezogen, dass auch in dem synthetischen Präparat, das wir seinerzeit beschrieben hatten¹⁾, derselbe Triphosphorsäure-ester vorgelegen habe. Die genannten Autoren beachten bei dieser Schlussfolgerung zu wenig, dass sie die Isolierung der Substanz unter anderen Bedingungen als wir vornahmen. Wir teilen im folgenden genauere Einzelheiten über den Mechanismus der Phosphorylierung des Aneurins mit, aus denen hervorgeht, dass unter den von uns seiner Zeit angegebenen Versuchsbedingungen tatsächlich das Phosphat der Cocarboxylase entsteht.

So viel uns bekannt ist, wurde die direkte Phosphorylierung eines Alkohols durch erhitzte ortho-Phosphorsäure, welche wir für die Synthese der Cocarboxylase benutzten, zum ersten Male in jener Arbeit verwendet; dasselbe Verfahren haben fast gleichzeitig *Cherbuliez und Weniger*³⁾ unabhängig von uns für die Synthese von ortho-Phosphorsäure-estern gewisser primärer Alkohole benutzt.

Die genauere Untersuchung des Phosphorylierungsvorganges des Aneurins mit erhitzter ortho-Phosphorsäure hat gezeigt, dass, entsprechend den Angaben von *Velluz* und Mitarbeitern, zunächst ein Triphosphorsäure-ester des Vitamins entsteht. Beim Erhitzen der ortho-Phosphorsäure auf über 350° während einiger Zeit bildet sich aus dieser meta-Phosphorsäure, von welcher bekannt ist, dass sie in verschiedenen polymeren Formen existiert. Man kann sich vorstellen, dass eine trimere Form der meta-Phosphorsäure (die cyclisch konstituiert sein könnte) die Verbindung ist, welche das Aneurin direkt in den Triphosphorsäureester überführt. Verschiedene Variationen in den Versuchsbedingungen haben gezeigt, dass der Triphosphorsäure-ester des Aneurins stets als primäres Produkt der Reaktion gebildet

¹⁾ *Karrer und Viscontini*, Helv. **29**, 711 (1946).

²⁾ *Velluz, Amiard und Bartos*, Bl. **1948**, 871.

³⁾ *Cherbuliez und Weniger*, Helv. **29**, 2006 (1946).

wird, unabhängig von der Zeit, während welcher die ortho-Phosphorsäure vor der Umsetzung erhitzt worden war, wenn nur die Reaktionstemperatur, bei der die Entwässerung der ortho-Phosphorsäure erfolgte, über 350° lag.

Der Aneurin-triphosphorsäure-ester enthält keine Phosphationen. Er ist indessen gegen Säuren sehr empfindlich und verliert schon bei gewöhnlicher Temperatur unter der Einwirkung sehr verdünnter Säuren eine Molekel Phosphorsäure, wobei sich Salze der Cocarboxylase (Aneurin-diphosphorsäure-ester) bilden. Figur 1 zeigt den Verlauf einer solchen Hydrolyse bei Gegenwart von Salzsäure verschiedener Konzentration.

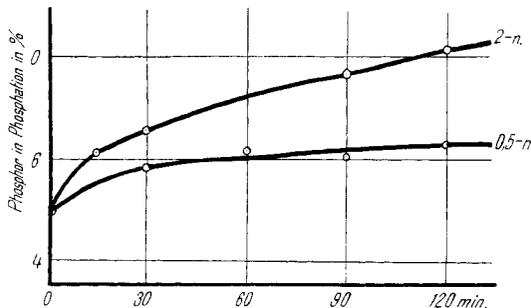


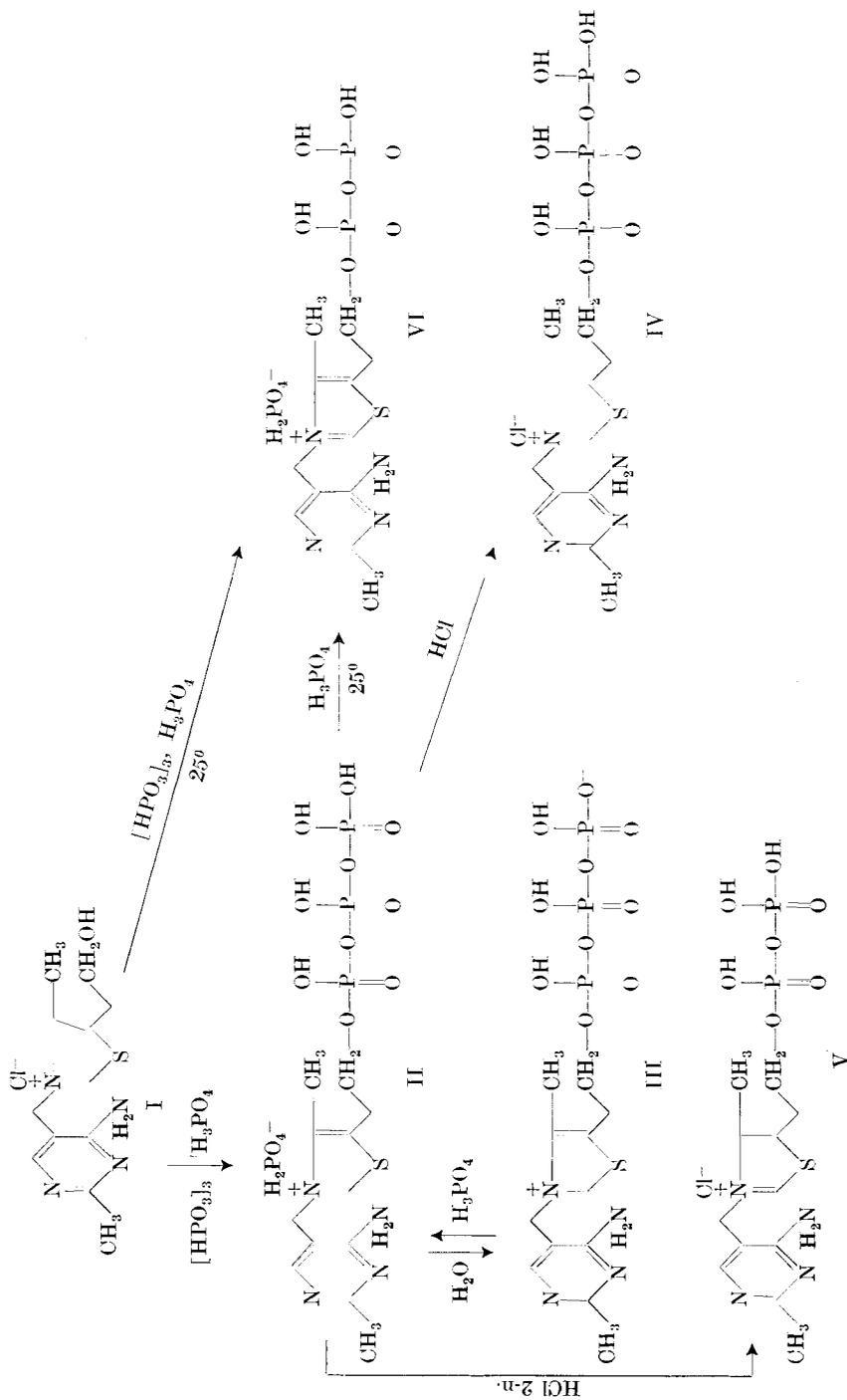
Fig. 1.

Verlauf der Hydrolyse des Aneurin-triphosphorsäure-ester-phosphats in 0,5-n. und 2-n. Salzsäure bei Zimmertemperatur.

Aneurin-diphosphat (Cocarboxylase) verliert, wie bekannt ist, ein Mol. Phosphorsäure erst unter schärferen Hydrolysebedingungen: es ist dazu notwendig, die Substanz mit einer verdünnten Mineralsäure (ca. n. Lösung) während ungefähr 10 Minuten auf dem Wasserbad zu erhitzen; dabei bildet sich Aneurin-monophosphorsäure-ester, welcher gegenüber Mineralsäuren noch viel beständiger ist.

Nach der Veresterung des Aneurins mit der durch Anhydrierung von ortho-Phosphorsäure entstandenen meta-Phosphorsäurelösung bildet sich demnach, wie *Velluz* und Mitarbeiter angeben und wie wir bestätigen können, zunächst Aneurin-triphosphat. Eine kurze Behandlung mit einer verdünnten Mineralsäure bei gewöhnlicher Temperatur führt aber die Verbindung in das entsprechende Salz des Aneurin-pyrophosphorsäure-esters (Cocarboxylase) über. Tafel 1 gibt eine Übersicht über verschiedene Umsetzungen dieses Triesters mit verdünnten Säuren. Wenn die Reinigung des Aneurin-triphosphates schnell und unter Vermeidung hydrolytischer Vorgänge bei Gegenwart von ortho-Phosphorsäure erfolgt, lässt sich das Phosphat des Aneurin-triphosphorsäure-esters (II) isolieren, welches neben 3 Mol. nichtionisierter Phosphorsäure 1 Mol. ionogen gebundene Phosphorsäure enthält. Wird die Fällung des Aneurin-triphosphorsäure-esters

Tafel I.



in Abwesenheit von freier Phosphorsäure ausgeführt, so lässt sich der Aneurin-triphosphorsäure-ester III isolieren, den *Velluz* und Mitarbeiter beschrieben haben. Wird das bei der Phosphorylierung des Aneurins entstandene Reaktionsprodukt in Gegenwart von verdünnter Salzsäure möglichst schnell ausgefällt, so erhält man das Hydrochlorid des Aneurin-triphosphorsäure-esters (IV). Die Hydrolyse des Triesters II mit verdünnter Salzsäure bei Zimmertemperatur führt zum Hydrochlorid der Cocarboxylase (V), während eine analoge Hydrolyse durch verdünnte Phosphorsäure das Phosphat der Cocarboxylase (VI) ergibt, welches wir schon beschrieben haben¹⁾. Letzteres entsteht direkt aus Aneurin, wenn man nach der Veresterung mit der erhitzten meta-Phosphorsäurelösung eine fraktionierte Fällung des Reaktionsproduktes aus saurer Lösung vornimmt, wie wir dies früher getan hatten¹⁾. Das seinerzeit von uns dargestellte Phosphat der Cocarboxylase haben wir erneut analysiert und in dem Präparat die ionisierte und nichtionisierte Phosphorsäure getrennt bestimmt. Die Analyse ergab 2 Mol. nichtionogen und 1 Mol. ionogen gebundene Phosphorsäure.

Die verschiedenen hier beschriebenen Verbindungen (Hydrochlorid der Cocarboxylase, Phosphat der Cocarboxylase und Phosphat des Aneurin-triphosphorsäure-esters) besitzen, wie Tafel II erkennen lässt, in äquivalenten Mengen praktisch die gleiche Aktivität wie Cocarboxylase.

Tafel II.

Vergleich der Cocarboxylase-Aktivitäten der in dieser Abhandlung beschriebenen Präparate.

Zeit	Hydrochlorid der Cocarboxylase, synthetisiert nach der Methode von <i>Weijlard</i> und <i>Tauber</i> ²⁾ 24 γ	Hydrochlorid der Cocarboxylase, synthetisiert durch Hydrolyse des Aneurin-triphosphorsäure-esters 24 γ
10 Minuten	29 mm ³ CO ₂	25 mm ³ CO ₂
20 Minuten	65 mm ³ CO ₂	59 mm ³ CO ₂
30 Minuten	73 mm ³ CO ₂	72 mm ³ CO ₂

Zeit	Hydrochlorid der Cocarboxylase, synthetisiert durch Hydrolyse des Aneurin-triphosphorsäure-esters 24 γ	Phosphat der Cocarboxylase 27 γ	Phosphat des Aneurin-triphosphorsäure-esters 31 γ
10 Minuten	71 mm ³ CO ₂	77 mm ³ CO ₂	69 mm ³ CO ₂
20 Minuten	99 mm ³ CO ₂	104 mm ³ CO ₂	108 mm ³ CO ₂

¹⁾ *Karrer* und *Viscontini*, *Helv.* **29**, 711 (1946).

²⁾ *Am. Soc.* **60**, 730, 2263 (1938).

Die Veresterung des Aneurins mit der erhitzten meta-Phosphorsäurelösung soll nicht bei Temperaturen über 110° C vorgenommen werden, da sonst Zersetzungserscheinungen beobachtet werden, welche die Reinheit der Produkte beeinträchtigen.

Die vorliegende Untersuchung wurde durch Mittel unterstützt, die von der *Stiftung für wissenschaftliche Forschung an der Universität Zürich* zur Verfügung gestellt worden sind und für die wir unseren besten Dank aussprechen.

Experimenteller Teil.

Das ionogene Phosphat wurde in den nachfolgend beschriebenen Verbindungen je-weilen nach der Methode von *Berenblum* und *Chain*¹⁾ bestimmt, das Gesamtphosphat in üblicher Weise als Phosphormolybdat.

Die Wirksamkeit als Cocarboxylase ermittelte man unter Verwendung eines mit Natriumdiphosphat aus gewaschener Bäckerhefe dargestellten Extraktes als Apofermentquelle.

Phosphat des Aneurin-triphosphorsäure-esters (II).

2 cm³ einer 84-proz. Lösung von Phosphorsäure werden auf offener Flamme erhitzt, bis sich die anfangs klare Flüssigkeit eben zu trüben beginnt. Hierauf lässt man die Masse sich abkühlen und bringt das Gefäss, welches die gebildete meta-Phosphorsäure enthält, in ein Ölbad, dessen Temperatur 100—105° beträgt. Nunmehr werden 500 mg Aneurinhydrochlorid in 3 Portionen unter Rühren eingetragen. Man hält die Reaktionsmasse während 15 Minuten bei 100°, kühlt sie hierauf ab und löst sie in einem Minimum von Eiswasser, welchem man 3 Tropfen der 84-proz. ortho-Phosphorsäurelösung zugefügt hatte. Hierauf wird durch einen Überschuss an Aceton das Reaktionsprodukt ausgefällt, die überstehende Flüssigkeit abdekantiert und der ölige Rückstand in möglichst wenig Eiswasser aufgelöst, dem man ca. 8 Tropfen der ortho-Phosphorsäurelösung zugesetzt hatte. Nachdem durch eine kleine Menge Adsorptionskohle die Lösung entfärbt worden ist, fällt man den Aneurin-phosphorsäure-ester erneut durch Zusatz von viel Aceton aus. Alle diese Operationen müssen in der Kälte und so schnell wie möglich ausgeführt werden.

Das farblose Öl, das sich am Boden des Gefässes gesammelt hatte, wird so lange mit einer Mischung von gleichen Volumen Aceton und Alkohol durchgerührt, bis es vollständig zu einer pulverigen Masse erstarrt ist. Solche Präparate sind sehr hygroskopisch. Die Ausbeute ist nahezu quantitativ.

Die Analyse ergibt, dass es sich um das Phosphat des Aneurin-triphosphorsäure-esters handelt.

$C_{12}H_{22}O_{14}N_4SP_4, H_2O$	Ber. C 23,23 H 3,57 N 9,05 P (gesamt) 19,80 P (ionogen) 4,95%
(620,3)	Gef. ,, 23,14 ,, 3,41 ,, 9,12 ,, ,, 19,98 ,, ,, 4,9%

Aneurin-triphosphorsäure-ester (III).

200 mg des vorherbeschriebenen Phosphats II wurden in reinem Wasser gelöst, worauf nach Zusatz eines Überschusses von Aceton ein farbloses Öl ausfiel, welches, wie im vorhergehenden Beispiel, durch Behandeln mit Aceton-Alkohol-Gemisch in feste Form gebracht werden konnte. Solche Präparate enthalten in der Regel keine Phosphat-ionen mehr; falls noch Spuren von solchen vorhanden waren, genügte eine weitere, in derselben Weise vorgenommene Umfällung, um diese zu entfernen.

$C_{12}H_{19}O_{10}N_4SP_3, H_2O$	Ber. C 26,70 H 4,10 N 10,39 P (gesamt) 17,23 P (ionogen) 0%
(522)	Gef. ,, 25,95 ,, 4,37 ,, 9,10 ,, ,, 17,95 ,, ,, 0%

¹⁾ Biochem. J. **32**, 295 (1938).

Löst man diesen Aneurin-triphosphorsäure-ester in Wasser, fügt einige Tropfen ortho-Phosphorsäurelösung hinzu und fällt erneut mit Aceton, so wird das Phosphat des Aneurin-triphosphorsäure-esters zurückgebildet.

Ber. N	9,03	P (gesamt)	19,80	P (ionogen)	4,95%
Gef. „	8,41	„ „	19,68	„ „	5,16%

Hydrochlorid des Aneurin-triphosphorsäure-esters (IV).

200 mg des Phosphats II wurden in 1 cm³ Eiswasser gelöst, 0,2 cm³ 2-n. Salzsäure hinzugefügt und durch Acetonzusatz ein farbloses Öl gefällt, welches durch Behandlung mit Alkohol-Aceton-Gemisch allmählich fest wurde. In der Verbindung lag das Hydrochlorid des Aneurin-triphosphorsäure-esters vor, welches in annähernd quantitativer Ausbeute entstanden war.

C ₁₂ H ₂₀ O ₁₀ N ₄ SP ₃ Cl, H ₂ O	Ber. N	10,02	Cl	6,35	P (gesamt)	16,63	P (ionogen)	0%
(558,8)	Gef. „	9,41	„	5,47	„ „	16,49	„ „	0%

Hydrochlorid der Cocarboxylase (V).

1 g des Phosphats des Aneurin-triphosphorsäure-esters (II) wurde in 4 cm³ 2-n. Salzsäure gelöst und die Lösung 2½ Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Hierauf haben wir die in der Lösung vorhandene Substanz durch Zusatz steigender Mengen Aceton fraktioniert ausgefällt. Die ersten Fraktionen enthielten noch Aneurin-triphosphorsäure-ester, während die späteren fast vollkommen aus dem Hydrochlorid des Aneurin-ortho-phosphorsäure-esters (Hydrolyse der Cocarboxylase) bestanden und gut kristallisiert waren. Die Zwischenfraktionen der Fällung liessen sich durch Umkristallisieren in Gegenwart von wenig Salzsäure ebenfalls in das reine Cocarboxylase-hydrochlorid überführen.

Die Ausbeuten an letzterer Verbindung betragen gegen 50% der Theorie.

C ₁₂ H ₁₉ O ₇ N ₄ SP ₂ Cl, 3 H ₂ O	Ber. N	10,90	Cl	6,90	P (gesamt)	12,0	P (ionogen)	0%
(514,8)	Gef. „	11,19	„	6,35	„ „	11,8	„ „	1,5%

Cocarboxylase-phosphat (VI).

Man lässt eine Lösung des Phosphats des Aneurin-triphosphorsäure-esters (II) in 15-proz. Phosphorsäurelösung 2 Stunden bei 25° stehen und fällt hierauf die in der Lösung vorhandene Aneurin-phosphorsäure-ester fraktioniert durch Acetonzusatz in ähnlicher Weise wie bei der eben beschriebenen Darstellung des Cocarboxylase-hydrochlorids. Während die ersten Fraktionen noch etwas zu viel ionogen gebundene Phosphorsäure enthalten, ergeben die späteren Fraktionen Analysenzahlen, welche recht genau dem Phosphat der Cocarboxylase entsprechen. Die Ausbeute an den letzteren Fraktionen übersteigt meistens 50% der Theorie.

C ₁₂ H ₂₁ O ₁₁ N ₄ SP ₃ , H ₂ O	Ber. N	10,36	P (gesamt)	17,20	P (ionogen)	5,46%
(540)	Gef. „	9,90	„ „	17,93	„ „	6,27%

Bei der Herstellung des Cocarboxylase-phosphates nach den Angaben unserer ersten Publikation¹⁾ vollzog sich die partielle Hydrolyse des primär gebildeten Aneurin-triphosphorsäure-esters zum Diphosphorsäure-ester (Cocarboxylase) nach der Auflösung des erhitzten Reaktionsgemisches in Wasser, dem etwas ortho-Phosphorsäure zugesetzt worden war. Wir haben damals diese Lösung, die ohne besondere Kühlung hergestellt worden ist und sich daher bei ihrer Bereitung leicht erwärmte, vor der Ausfällung der Aneurin-phosphorsäure-ester durch Aceton einige Zeit sich selbst überlassen, da wir nicht wussten, dass eine schnelle Aufarbeitung zu einem anderen Reaktionsprodukt führen könnte. Im Kontakt mit der erwähnten Phosphorsäurelösung hat sich aus dem Phosphat des Aneurin-triphosphorsäure-esters das Phosphat des Aneurin-diphosphorsäure-esters gebildet, das nachher durch fraktionierte Fällung mit Aceton in der beschriebenen Weise gereinigt worden ist.

¹⁾ Karrer und Viscontini, Helv. **29**, 711 (1946).

Zusammenfassung.

Die Phosphorylierung des Aneurins durch eine aus ortho-Phosphorsäure durch Erhitzen hergestellte Lösung von meta-Phosphorsäure wurde erneut untersucht. Hierbei ermittelte man die genaueren Bedingungen, unter welchen Aneurin-triphosphorsäure-ester und Aneurin-diphosphorsäure-ester (Cocarboxylase) erhalten werden können.

Aneurin-triphosphorsäure-ester und Aneurin-diphosphorsäure-ester besitzen praktisch dieselbe Wirksamkeit als Cocarboxylase. Ersterer geht durch Hydrolyse äusserst leicht in letzteren über.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

199. Metallindikatoren II.

Beziehungen zwischen Struktur und Komplexbildungsvermögen bei Verwandten des Murexids

von H. Gysling und G. Schwarzenbach.

(14. VI. 49.)

Im Artikel „Metallindikatoren I“ haben wir gezeigt, dass das Purpureation I mit Ca^{+2} und anderen zweiwertigen Metallionen einfache Komplexe der Zusammensetzung $[\text{MeFrb}]$ (Me = Metallion, Frb = Farbstoffion) bildet¹⁾, wobei sich die Stabilität der Assoziate mit verschiedenen Metallionen als sehr unterschiedlich erwies. Da offenbar nicht nur die Koordinationstendenz und der Ionenradius des betreffenden Metallions, sondern ausserdem die räumliche Anordnung der bei der Komplexbildung als Liganden dienenden Gruppen des Farbstoffions massgebend sind, möchten wir nun darüber berichten, wie sich das Komplexbildungsvermögen und die Lichtabsorption bei allmählicher Abwandlung des Farbstoffskelettes verändern. Es wurden dazu systematische Messungen an den in der Tabelle 1 aufgeführten Verbindungen ausgeführt.

Die Anionen I bis VII sind molekulare Resonanzsysteme mit einem zentralen Stickstoffatom ($-\text{N}=\leftrightarrow=\text{N}-$), welches mit demjenigen des Nitritions vergleichbar ist. Wir wollen diese Farbstoffe Azinfarbstoffe nennen. Bei den Anionen Ia, IIa, IIIa, IVa und VIIa ist das zentrale ($-\text{N}=\$) durch die Gruppe ($-\text{CH}=\$) ersetzt, weshalb wir diese Verbindungen als Methine bezeichnen wollen. Die Farbstoffe mit den Anionen von: I: Azin-bis-barbitursäure (Anion des Murexids),

¹⁾ Helv. **32**, 1314 (1949).