

Zur Kenntnis der Netzhautstoffe

V. Isolierung von Vitamin C aus der Netzhaut

Von

O. BRUNNER und W. KLEINAU

Aus dem I. Chemischen Universitätslaboratorium in Wien

(Eingegangen am 26. 5. 1937. Vorgelegt in der Sitzung am 17. 6. 1937.)

In einer vorhergehenden Arbeit¹ haben wir über den Vitamin-C-Gehalt der Netzhaut berichtet und diesen durch Titration der Netzhautextrakte mit 2,6-Dichlorphenolindophenol ermittelt. Da die Entfärbung des TILLMANSCHEN Reagens (2,6-Dichlorphenolindophenol), wie EULER und KLUSSMANN² gezeigt haben, nicht streng spezifisch für Ascorbinsäure ist, sondern auch durch andere reduzierende Substanzen des Tierkörpers wie Sulfhydrylverbindungen, Redukton usw. hervorgerufen wird, haben wir damals die Titrations auf Grund der Arbeiten von MARTIUS und EULER³ bei einer Wasserstoffionenkonzentration von $p_H = 2.5$ vorgenommen, da in diesem Konzentrationsbereich die letztgenannten Substanzen zum größten Teile ausgeschaltet werden. Immerhin erschien es uns zur Sicherstellung unserer Befunde dringend erwünscht, den Beweis für das Auftreten der Ascorbinsäure in der Netzhaut auf direktem Wege erbringen und den Nachweis dieses Vitamins durch seine Isolierung in exakter Weise durchführen zu können.

Wir haben daher versucht die Ascorbinsäure in Anlehnung an die von HINSBERG und AMMON⁴ bei der Isolierung aus anderen physiologischen Ausgangsmaterialien geübte Methodik in Form des 2,4-Dinitro-phenyl-osazons der Dehydro-ascorbinsäure aus der Netzhaut des Rindes zu isolieren und zu identifizieren. Wie im nachfolgenden experimentellen Teil ausführlich beschrieben wird, gelang es uns tatsächlich diese Verbindung in Form schöner roter Kriställchen zu gewinnen, welche bei 268° schmolzen und

¹ O. BRUNNER und W. KLEINAU, Mh. Chem. 68 (1936) 261 bzw. S.-B. Akad. Wiss. Wien (IIb) 145 (1936) 481.

² EULER und KLUSSMANN, Svensk Kemisk Tidskrift 44 (1932) 292.

³ MARTIUS und EULER, Biochem. Z. 271 (1934) 9.

⁴ HINSBERG und AMMON, Biochem. Z. 288 (1936) 102.

sich im Gemisch mit einem entsprechenden aus Cantan hergestellten Vergleichspräparat identisch erwiesen.

Die Ausbeute an reinem Produkt betrug 20 mg aus 225 Rindernetzhäuten. Dies entspricht 28 % der durch Titration ermittelten Ascorbinsäuremenge. Zieht man die geringe Substanzmenge sowie die ganz bedeutenden Schwierigkeiten der sorgfältigen Reinigung des Produktes in Betracht, so ist diese Ausbeute als überaus günstig zu bezeichnen.

Experimenteller Teil.

225 Rinderaugen wurden durch einen Frontalschnitt knapp hinter der Ora serrata eröffnet, die Netzhäute herauspräpariert und in 8 %ige Trichloressigsäure eingelegt. Die Extraktion erfolgte unter ständigem Durchleiten von Stickstoff. Nach einigen Stunden wurde abgesaugt, die Netzhäute in einer großen Porzellanreißschale mit gereinigtem ausgeglühtem Seesand zerrieben und neuerlich mit 8 %iger Trichloressigsäure extrahiert. Nach dem Absaugen wurden die gesamten Filtrate vereinigt und ihr Gesamtvolumen gemessen (324 cm^3). Nun wurden hievon 10 cm^3 abpipettiert und zur Bestimmung der zur Oxydation erforderlichen Menge Jodlösung mit letzterer titriert. Die Hauptmenge wurde sodann mit Kaliumbicarbonat neutralisiert, hierauf mit 70 cm^3 7 %iger Salzsäure versetzt und sodann unter Eiskühlung mit der errechneten Menge Jodlösung aufoxydiert.

Die so erhaltene Flüssigkeit wurde nun mit einer Lösung von 3 g 2,4-Dinitro-phenyl-hydrazin in 200 cm^3 7 %iger Salzsäure versetzt und das Reaktionsgemisch im Luftthermostaten bei einer Temperatur von 42° mehrere Tage sich selbst überlassen. Die Osazone fielen als schöne rote voluminöse Kristallmasse aus. Sie wurden abgesaugt, mit kaltem Wasser gewaschen und über Kaliumhydroxyd im Vakuum getrocknet. Zur Reinigung und Trennung wurden die trockenen Osazone nun zunächst mit kaltem Alkohol, darauf mit kaltem Oxalsäurediäthylester so lange behandelt, bis die Lösung nur mehr ganz schwach gefärbt war, und sodann der verbliebene Rückstand aus heißem Oxalester unter Rückflußkühlung umgelöst. Hierbei ging das 2,4-Dinitrophenylosazon der Dehydroascorbinsäure nunmehr in Lösung, während ein weiteres Osazon ungelöst im Rückstand blieb. Zum Schlusse wurde das Osazon der Dehydroascorbinsäure

noch mehrmals in ganz wenig Dioxan gelöst und nach dem Filtrieren mit tief siedendem Petroläther (Sdp. 30—40°) gefällt. Nach sorgfältigem Trocknen im Vakuum schmolz die so erhaltene Substanz im Vakuumröhrchen bei 268° (BERLBLOCK, korr.).

Der Mischschmelzpunkt mit einem entsprechenden aus „Cautan“ (BAYER) hergestellten Vergleichspräparat, welches bei 271° schmolz, ergab keine Depression.

2'630 mg Subst.: 3'830 mg CO₂, 0'720 mg H₂O.

C₁₈H₁₄O₁₂N₈. Ber. C 40'44, H 2'64.

Gef. „ 39'72, „ 3'06.

Die vorstehende Arbeit wurde seitens der Akademie der Wissenschaften in Wien durch Gewährung einer Subvention aus den Mitteln der ZACH-Stiftung gefördert. Wir gestatten uns auch an dieser Stelle unseren ergebensten Dank hiefür zum Ausdruck zu bringen.

Auch der I. G. Farbenindustrie A. G., Leverkusen am Rhein (bzw. Vedepha, Wien) sind wir für die liebenswürdige Überlassung von „Cautan (Bayer)“ zu Dank verpflichtet.