

# Über die Pantothenäsäure\*)

Von Dipl.-Ing. JOSEF MITTERMAIR

Institut für organische Chemie der Technischen Hochschule München

Im Laufe von Untersuchungen über die zum Wachstum von Hefe notwendigen Nährstoffe machte Roger J. Williams die wichtige Entdeckung, daß eine noch unbekannte saure Substanz die Fähigkeit besitzt, das Wachstum einer Hefe („Gebrüder Mayer“, *Saccharomyces Cerevisiae*) in auffallender Weise anzuregen<sup>1)</sup>. Bei Zusatz eines aus Reiskleie gewonnenen Extraktions zu einer synthetischen Nährstofflösung wurde eine außerordentliche Steigerung des Hefewachstums beobachtet, die auf die Anwesenheit eines neuen Wachstumsfaktors zurückgeführt wurde. Da Grund zu der Annahme bestand, daß dieser Faktor nicht nur ein Bestandteil der Reiskleie sei, wurden zahlreiche tierische und pflanzliche Materialien daraufhin untersucht. Tatsächlich wurde dabei gefunden, daß die verschiedensten Gewebeextrakte einen Stoff enthalten, der auf Hefe die gleiche wachstumsfördernde Wirkung ausübt wie der Reiskleieextrakt.

Von Williams u. Mitarb.<sup>1)</sup> konnte bewiesen werden, daß die entdeckten Wirkstoffe sämtlich miteinander identisch waren. Da also der neue Wachstumsfaktor ein äußerst weitverbreiteter, wenn nicht universeller Bestandteil der lebenden Materie zu sein schien, wurde er als „Pantothen-Säure“ bezeichnet. In jahrelanger schwieriger Arbeit wurde von Williams ihre Isolierung und Strukturaufklärung betrieben. Wertvolle Beiträge lieferten unter anderen Woolley u. Waisman<sup>2, 13)</sup> sowie E. T. Stiller<sup>3)</sup>. Kurze Zeit nach der Strukturaufklärung erfolgte die erste Totalsynthese durch Williams<sup>4, 5)</sup> und durch Stiller<sup>3)</sup>. Fast gleichzeitig veröffentlichten Reichstein u. Grüßner<sup>6)</sup> sowie R. Kuhn u. Th. Wieland<sup>7)</sup> die Ergebnisse ihrer synthetischen Arbeiten. Damit ist die Forschung über die Pantothenäsäure zu einem gewissen Abschluß gelangt. Es soll daher im folgenden eine kurze Übersicht über die bis jetzt vorliegenden Forschungsergebnisse geboten werden.

## Untersuchung von Gewebeextrakten auf Pantothenäsäure.

Zur Untersuchung gelangten Reiskleie, Rindsleber, Krabbeneier, Seegeleier, Austern, Regenwürmer, Algen (*Spyrogyra* u. *Oscillatoria*), *aspergillus niger*, Bakterien (*B. subtilis*), Eiweiß, Tomaten, Kartoffeln u. a. Extrakte aus diesen Materialien erwiesen sich als wirksam bei der Anregung des Hefewachstums. Ob nun diese Wirksamkeit der Anwesenheit eines einzigen Faktors zuzuschreiben war oder ob es sich um mehrere verschiedene Stoffe mit gleicher biologischer Wirkung handelte, mußte erst bewiesen werden. Am geeignetsten erschien dabei Williams die Anwendung der fraktionierten Elektrolyse<sup>1)</sup>.

Von den angeführten Materialien wurden wasserlösliche Extrakte hergestellt, u. zw. extrahierte man mit 80%igem Methanol, dampfte im Vakuum zur Trockne ein und nahm den Rückstand mit Wasser auf. Eine bestimmte Menge des Extraktions wurde dann zur Füllung eines 8zelligen Apparates für fraktionierte Elektrolyse<sup>8)</sup> benutzt und für 30—48 h bei 1500 V elektrolysiert. Dann wurde in jeder Zelle mit Hilfe der Chinhydron-Elektrode der pH-Wert bestimmt und außerdem der Inhalt auf seine biologische Wirksamkeit untersucht.

Bei sämtlichen Versuchen erwies sich das Material aus den Zellen mit einem pH von 3,6 als wirksamstes in bezug auf Wachstumsanregung. Der Wachstumsfaktor war also eine Säure. Elektrolysen des Methyl- und Äthylesters, über deren Darstellung später berichtet wird, zeigten keine Wanderung der aktiven Fraktion gegen das basische Ende des elektrolytischen Systems. Da also die Ester der Pantothenäsäure keine basischen Eigenschaften zeigten, schien diese keine amphotere Substanz zu sein. Es trat sogar eine schwache

\*) Nach einem Vortrag im Colloquium der chemischen Abteilung der T. H. München am 3. Oktober 1940.

<sup>1)</sup> R. J. Williams, C. N. Lyman, G. H. Goodyear, J. H. Truesdail u. D. Holaday, J. Amer. chem. Soc. **55**, 2012 [1933].

<sup>2)</sup> Woolley, Waisman u. Elvehjem, J. biol. Chemistry **129**, 673 [1939].

<sup>3)</sup> E. T. Stiller, St. A. Harris, J. Finkelstein, J. C. Keresztesy u. K. Folkers, J. Amer. chem. Soc. **63**, 1785 [1940].

<sup>4)</sup> Williams u. Mayor, Science, [New York] **91**, 246 [1940].

<sup>5)</sup> R. J. Williams, H. K. Mitchell, H. H. Weinstock jr. u. E. E. Snell, J. Amer. chem. Soc. **62**, 1784 [1940].

<sup>6)</sup> Helv. chim. Acta **23**, 650 [1940].

<sup>7)</sup> Ber. östsch. chem. Ges. **73**, 971 [1940].

<sup>8)</sup> Williams u. Truesdail, J. Amer. chem. Soc. **53**, 4171 [1931].

Verschiebung der Ester nach der sauren Seite ein, was mit dem Verhalten einer Polyoxyäure im Einklang stand. Weiterhin wurden mit den verschiedenen Extraktions-Diffusionsversuchen unternommen und dabei gut übereinstimmende Werte für die Diffusionskonstante gefunden. Um weitere Beweise für das gleichartige Verhalten der Wirkstoffe zu erlangen, wurden die Extrakte verschiedenen Reaktionen unterworfen, die gestatteten, auf die Anwesenheit von reaktionsfähigen Gruppen zu schließen. Energische katalytische Hydrierung sowie Oxydation mit ammoniakalischer Silberlösung hatten keinen Einfluß auf die biologische Wirksamkeit. Salpetrige Säure wirkte hingegen zerstörend, ebenso trat bei Veresterung ein Verschwinden der Aktivität ein. Durch längeres Erhitzen im alkalischen Medium trat ebenfalls Inaktivierung ein, während Erhitzen im neutralen oder schwach sauren Medium ohne Einfluß blieb; in stark saurer Lösung wurde auch ein beträchtlicher Anteil der Aktivität vernichtet.

Das Verhalten der aktiven Substanz aus den verschiedenen Ausgangsmaterialien war bei allen durchgeführten Versuchen trotz der Beimengung von Verunreinigungen aller Art so einheitlich, daß es als sehr unwahrscheinlich erschien, daß mehrere Stoffe für die Wachstumsanregung verantwortlich sein sollten. Es konnte also als sicher angenommen werden, daß eine einzige Substanz, die Pantothenäsäure, in allen Extraktions anwesend ist und die wachstumsfördernde Wirkung ausübt.

## Physiologische Wirkung auf verschiedene Organismen.

Während anfänglich die wachstumsfördernde Wirkung der Pantothenäsäure nur an einer Hefe beobachtet wurde, stellte sich bei späteren Untersuchungen heraus, daß auch zahlreiche andere Organismen in ihrem Wachstum von Pantothenäsäure günstig beeinflußt werden. Snell, Strong u. Petersen<sup>9)</sup> entdeckten die Wirksamkeit der Pantothenäsäure bei Milchsäurebakterien<sup>10)</sup>. Jukes<sup>11, 12)</sup> sowie Woolley u. Waisman<sup>13)</sup> waren mit der Isolierung des sog. Filtratfaktors oder Hühnchen-Antidermatitisfaktors beschäftigt, eines Vitamins, bei dessen Fehlen in der Nahrung bei Hühnern Dermatitis auftritt. Sie konnten eine außerordentliche Ähnlichkeit zwischen diesem Faktor und der Pantothenäsäure feststellen und später auch die Identität der beiden Stoffe sicherstellen.

Von Subbarow u. Rane<sup>14)</sup> wurde aus Leber ein Stoff isoliert, der für das Wachstum der Ratte notwendig ist, der sog. Rattenfiltratfaktor. Dieser zeigte ebenfalls weitgehende Übereinstimmung in seinen Eigenschaften mit der Pantothenäsäure, so daß die Identität der beiden Faktoren wahrscheinlich wurde. Der Rattenfiltratfaktor konnte mit positivem Erfolg auch zum Anregen des Wachstums bei Diphtheriebazillen und Streptokokken (*streptococcus haemolit.*) verwendet werden.

## Testmethoden.

Bis jetzt ist keine chemische Nachweismethode für Pantothenäsäure bekanntgeworden. Das Fehlen eines einfachen Nachweisverfahrens erwies sich bei der Isolierung und Strukturaufklärung als äußerst hemmend, da man einzig auf die umständlichen biologischen Methoden angewiesen war. Williams benutzte als Test die Wachstumsgeschwindigkeit einer Hefe („Gebrüder Mayer“). Zur genauen Bestimmung der Hefemenge wurde von ihm eine besondere Methode ausgearbeitet, die allgemein zur Bestimmung von Mikroorganismen in Suspensionen dient<sup>15)</sup>.

Die Hefesuspension wird dabei in einer passenden Zelle zwischen einer Lichtquelle und ein besonderes gebautes Thermoelement gebracht und die von letzterem erzeugte E. M. K. mit Hilfe eines empfindlichen

<sup>9)</sup> Ebenda **60**, 2825 [1938]; J. Bacteriol. **38**, 293 [1939].

<sup>10)</sup> E. F. Müller, diese Ztschr. **53**, 204 [1940].

<sup>11)</sup> Lepkovsky u. Jukes, J. biol. Chemistry **114**, 109 [1936]; Th. H. Jukes, ebenda **117**, 11 [1937].

<sup>12)</sup> Th. H. Jukes, J. Amer. chem. Soc. **61**, 975 [1939].

<sup>13)</sup> Woolley, Waisman, Mickelson u. Elvehjem, J. biol. Chemistry **125**, 715 [1938]; Woolley, Waisman u. Elvehjem, J. Amer. chem. Soc. **61**, 977 [1939].

<sup>14)</sup> Ebenda **61**, 1616 [1939]; Subbarow u. Hutchings, ebenda **61**, 1615 [1939]; Woolley u. Hutchings, J. Bacteriol. **39**, 287 [1940].

<sup>15)</sup> Williams, McAllister u. Rochm, J. biol. Chemistry **88**, 315 [1929].

Galvanometers gemessen. Die Methode gestattet, Mengen von feuchter Hefe zwischen 0,0001 mg und 4 mg pro Kubikzentimeter mit befriedigender Genauigkeit zu bestimmen. Als Vergleichsmaterial benutzt Williams ein Standardpräparat, das durch Extraktion von Reiskleie mit Methanol dargestellt wird und mit „Stärke 1“ bezeichnet wird. Als eine „Einheit“ von Pantothenensäure definiert er den Betrag, der 1 g dieses Standardpräparats äquivalent ist.

Kuhn u. Wieland führen den Test an einem Milchsäurebakterium aus (*Streptobakterium plantarum*)<sup>16</sup>). Als Streptobakterium-Einheit (Sbm E) wird diejenige Menge Wuchsstoff bezeichnet, die unter festgelegten Bedingungen je Kubikzentimeter vorhanden sein muß, damit maximale Zellvermehrung eintritt. Dabei wird im lichtelektrischen Photometer nach Lange die Trübung als Maß der im Laufe von 4 Tagen gebildeten Zellmenge gemessen.

#### Isolierung der Pantothenensäure aus Leber.

Als reichhaltigstes Ausgangsmaterial für die Gewinnung der Pantothenensäure erwies sich die Leber<sup>17,18</sup>. Diese enthält jedoch nur etwa 40 Teile Pantothenensäure auf 1 Million. 250 kg Leber ergeben nach einem äußerst umständlichen und zeitraubenden Verfahren nur 3 g rohe Pantothenensäure (~40%ig), von der die restlichen Verunreinigungen nur mit den größten Schwierigkeiten abgetrennt werden können. Die Säure ist äußerst leicht in Wasser löslich, auch wurde noch kein Derivat oder Salz gefunden, das nicht diese leichte Wasserlöslichkeit aufwies. Auch nach sorgfältiger Reinigung kristallisiert die Pantothenensäure nicht. Das wichtigste Problem bei der Isolierung war zunächst die Abtrennung von verschiedenen Zuckern und wasserlöslichen basischen Stoffen. Dies wurde durch Extraktion des Brucinsalzes mit Chloroform erreicht, wobei diese Verunreinigungen ungelöst blieben. Von Williams wurde meist Schafleber benutzt, auch Rinds- oder Schweineleber ist brauchbar.

Zunächst wird die Leber der Autolyse überlassen und mit Dampf koaguliert und filtriert. Zur Entfernung organischer Basen wird über Fullererde filtriert, das Filtrat bei pH 3,6 an Norit absorbiert und mit Ammoniak wieder eluiert. Nach Überführung in das Brucinsalz wird mit Chloroform extrahiert. Nach langwierigen Fraktionierungsarbeiten wird in das Calciumsalz übergeführt und dieses weiter zahlreichen Reinigungsoperationen, deren Beschreibung zu weit führen würde, unterworfen. Auf diese Weise wird Ca-Pantothenat in Form eines farblosen Lackes erhalten, der nur schwierig in wasserfreien Zustand zu bringen ist.

Im Vergleich zum Standard-Reiskleieextract besitzt ein derartiges Material eine Stärke von 11000. 0,0005 γ auf 1 cm<sup>3</sup> Hefekultur rufen noch einen deutlichen Wachstumseffekt hervor.

Im Gegensatz zu Williams benutzten R. Kuhn u. Th. Wieland nicht Säugetierleber, sondern Thunfischleber als Ausgangsmaterial, von der ihnen über 4000 kg zur Verfügung standen.

Der entfettete Leberextrakt wird im Vakuum eingeeignet, inaktive Begleitstoffe durch Mercuriacetat ausgefällt, dann an Kohle adsorbiert und mit Pyridin-Methanol-Wasser eluiert. Anschließend erfolgt eine Fällung mit Phosphorwolframsäure, das Filtrat wird nach Entfernung von Uridin mit methylalkoholischem Baryt gefällt, wobei nahezu der gesamte Wirkstoff ausfällt. Durch Wiederholung der Phosphorwolframsäurefällung läßt sich die Reinheit weiter steigern. Eine weitere Anreicherung gelingt dann durch Chromatographie an Aluminiumoxyd, das mit verd. Salzsäure vorbehandelt ist.

Nach dieser Methode werden Präparate von 1500000 bis 3000000 SbmE/g erhalten<sup>16</sup>.

#### Strukturaufklärung.

Untersuchung der Pantothenensäure auf reaktionsfähige Gruppen: Um einen Einblick in den chemischen Aufbau der Pantothenensäure zu erhalten, mußten verschiedene neuartige Untersuchungsmethoden herangezogen werden, die teilweise für diesen Zweck erst entwickelt wurden. Hierzu gehört die Oxydations-Äquivalent-Analyse<sup>19</sup>. Zahlreiche Bestimmungen an Pantothenensäure-Präparaten verschiedener Stärke zeigten, daß alles Material aus den letzten Stufen der Fraktionierung aus Leber leicht oxydierbar ist. Ausgedrückt in Milligramm Sauerstoff, die von 1 mg Ca-Pantothenat verbraucht werden, beträgt das Oxydationsäquivalent

<sup>16</sup> Ber. dtsch. chem. Ges. **73**, 962 [1940].

<sup>17</sup> Williams, Truesdail, Weinstock, Rohrmann, Lyman u. McBurney, J. Amer. chem. Soc. **60**, 2719 [1938]; Mitchell, Weinstock, Snell, Stanbury u. Williams, ebenda **62**, 1776 [1940].

<sup>18</sup> Stiller, Keresztesy u. Finkelstein, ebenda **62**, 1779 [1940].

<sup>19</sup> R. J. Williams, ebenda **59**, 288 [1937]; Williams, Rohrmann u. Christensen, ebenda **59**, 291 [1937]; Christensen, Williams u. King, ebenda **59**, 293 [1937].

bei Material von Stärke 5000—11000 zwischen 1,05 und 1,185, wobei wegen des langsam ansteigenden Wertes bei zunehmender Reinheit der Substanz der letzte Wert ziemlich nahe am theoretischen Wert liegen dürfte. Auf Grund von drei Analysen für Ca und N berechnete sich das Molekulargewicht der freien Säure zu 195, 201 und 209. Die Abwesenheit von Schwefel, Phosphor und Halogen war durch Analysen bereits bestätigt. Das reinste Präparat wurde der Elementaranalyse unterworfen. Die Analysendaten stimmten gut auf die Summenformel  $(C_8H_{14}O_5N)_2Ca$  für das Calciumsalz. Diese Formel verlangt ein Oxydationsäquivalent von 1,21. Das Molekulargewicht der freien Säure berechnet sich zu 205.

Die An- oder Abwesenheit verschiedener charakteristischer Gruppen wurde nun durch zahlreiche Reaktionen bewiesen<sup>20</sup>.

Carboxylgruppe: Das Verhalten der Pantothenensäure im elektrischen Feld hatte ihre Dissoziationskonstante zu  $3,9 \cdot 10^{-5}$  ergeben<sup>21</sup>. Das stimmt annähernd mit derjenigen einer β- oder γ-Oxysäure überein. Da außer C, H, N und O kein Element anwesend ist, muß es sich um eine Carbonsäure handeln. Die Veresterung der Carboxylgruppe wird am besten durch einstündiges Stehenlassen bei 30° in einem Überschuß von Methanol- $n/10$ -Schwefelsäure durchgeführt. Die physiologische Wirksamkeit verschwindet dann völlig. Beim Verseifen des Esters durch 1—2stündiges Stehen in  $n/20$ -Sodalösung bei 30° wird die Aktivität zu 95—99% wieder hergestellt. Die Veresterung gelingt auch mit Diazomethan. Eine elektrometrische Titration mit Ca-Hydroxyd ergab die Anwesenheit einer Carboxylgruppe auf das Äquivalentgewicht von 205. Reinigungsversuche der Pantothenensäure durch Destillation ihrer Ester im Hochvakuum verliefen negativ.

Amino- und Iminogruppe: Analysen nach van Slyke ergaben bei den verschiedenen Pantothenensäure-Präparaten die Abwesenheit von Aminostickstoff. Überdies trat bei Behandlung mit salpetriger Säure unter van Slyke-Bedingungen keine Zersetzung der Wirksamkeit ein. Ebenso deuten das negative Ergebnis bei der Umsetzung mit p-Brom-benzolsulfonylchlorid und der Mangel an ausgeprägten basischen Eigenschaften auf die Abwesenheit von Amino- und Iminogruppen hin<sup>20</sup>.

Amidgruppe: Daß jedoch die Pantothenensäure schwach basische Eigenschaften besitzt, wurde in Elektrolyseversuchen gezeigt, bei denen sie mit Glucose und Asparaginsäure an das Anodenende eines 5zügigen Apparates für fraktionierte Elektrolyse gebracht wurde. Nach 24stündigem Stromdurchgang war die schwach basische Asparaginsäure zu 10,8% gegen die Kathode zu gewandert und die Pantothenensäure zu 11,8%. Die Glucose war nur zu ~2% gewandert, so daß es sich bei den beiden Säuren wirklich um einen elektrischen Transport handelte. Elektrolysen von Methylpantothenat ergaben eine etwas stärkere Verschiebung zur Kathode. Eine gewöhnliche Amidgruppe erschien unwahrscheinlich, vermutlich war eine substituierte Amidgruppe anwesend<sup>20</sup>. Mikrobestimmungen nach Zeisel ergaben kein destillierbares Jodid; damit war die Abwesenheit von Methoxyl, Methylimino- und homologen Gruppen bewiesen<sup>20</sup>.

Hydrierversuche unter energischen Bedingungen zeigten keine messbare Minderung der Aktivität, ebenso blieben Bromierungsversuche ohne Einfluß. Eine olefinische Doppelbindung war also nicht nachweisbar. Energische Hydrierung mit Platinoxyd, Behandlung mit Natrium und Natriumamalgam blieben ohne Einfluß auf die Wirksamkeit, Oxydationsversuche mit ammoniakalischer Silberlösung, Wasserstoffsuperoxyd und Permanganat sowie Behandlung mit Phenylhydrazin fielen negativ aus und bewiesen das Fehlen von Aldehyd- und Ketogruppen<sup>20</sup>.

Bei der Untersuchung der UV.-Absorption wurden keine Banden beobachtet, die auf das Vorhandensein eines aromatischen Kerns schließen ließen.

Hydroxylgruppen: Aus der außerordentlich großen Löslichkeit in Wasser wurde bereits geschlossen, daß die Pantothenensäure mehrere Hydroxylgruppen enthalten müsse. Durch Behandlung mit verschiedenen Reagentien, die bei Abwesenheit von Aminogruppen als mehr oder weniger spezifisch für

<sup>20</sup> R. J. Williams, H. H. Weinstock jr., E. Rohrmann, J. H. Truesdail, H. K. Mitchell u. C. E. Meyer, J. Amer. chem. Soc. **61**, 454 [1939].

<sup>21</sup> Williams u. Moser, ebenda **56**, 169 [1934]; R. J. Williams, J. biol. Chemistry **110**, 589 [1935].

Hydroxylgruppen angesehen werden können, wurde der experimentelle Beweis dafür erbracht. Mit Essigsäure-anhydrid, Acetylchlorid, Phosphorpentachlorid, Chloracetylchlorid, Thionylchlorid usw. trat vollständiges Verschwinden der biologischen Wirksamkeit ein<sup>20</sup>). Eine quantitative Mikromethode zur Bestimmung von Hydroxylgruppen<sup>22</sup>) ergab die Anwesenheit von zwei Hydroxylgruppen in der Pantothenäsäure.

Beim Stehenlassen der Pantothenensäure in Acetaldehyd-Salzsäure bei Zimmertemperatur wurde die physiologische Wirksamkeit zu 98 % zerstört, durch saure Hydrolyse konnte sie zu 50% wieder hergestellt werden. An Stelle von Acetaldehyd konnte auch Aceton oder Benzaldehyd verwendet werden. Es scheint dabei die Bildung von Kondensationsprodukten ähnlich der Acetoglucose einzutreten. Derartige Kondensationen können mit  $\alpha\beta$ -,  $\alpha\gamma$ - oder  $\alpha\delta$ -Glykolen eintreten. Für eine  $\alpha$ -Oxysäure ist jedoch die Pantothenensäure zu schwach, auch fiel der Eisenchloridnachweis auf  $\alpha$ -Oxysäuren negativ aus<sup>23)</sup>.

Nachweis von  $\beta$ -Alanin als Spaltstück der Pantothensäure. Einen wesentlichen Fortschritt in der Strukturaufklärung brachte die Entdeckung, daß auch winzige Mengen  $\beta$ -Alanin auf die Anregung des Hefewachstums wirksam sind<sup>23</sup>). Es lag die Annahme nahe, daß zwischen  $\beta$ -Alanin und Pantothensäure nahe Verwandtschaft bestehen müsse, und es wurde festgestellt, daß von „Gebr. Mayer“-Hefe in einem pantothensäurehaltigen Medium keine weitere Pantothensäure produziert wird; setzt man jedoch etwas  $\beta$ -Alanin hinzu, so wird Pantothensäure gebildet. Das  $\beta$ -Alanin scheint also für bestimmte Organismen nur insofern wirksam zu sein, als es ihnen als Baustein für die Synthese der viel wirksameren Pantothensäure dient<sup>24</sup>). Von Williams wurde nun für die Pantothensäure eine Peptidbindung in Betracht gezogen; dafür sprach neben dem schwach basischen Charakter die leichte Zerstörung der Wirksamkeit durch Säuren und Alkalien. Bemerkenswerterweise wird jedoch dabei nicht die gesamte Wirksamkeit vernichtet. Wegen der Übereinstimmung der physiologischen Wirksamkeit von  $\beta$ -Alanin und der verbleibenden schwachen Aktivität nach der Zerstörung der Pantothensäure durch Säuren oder Basen lag der Schluß nahe, daß dabei durch hydrolytische Aufspaltung einer Peptidbindung  $\beta$ -Alanin aus Pantothensäure entsteht. Durch Formoltitration konnte dann die Bildung einer Aminosäure bei der Hydrolyse nachgewiesen werden. Schließlich gelang es auch, das entstehende Alanin quantitativ zu bestimmen und durch Überführung in  $\beta$ -Naphthylsulfo- $\beta$ -alanin, das mit synthetischem Material keine Schmelzpunktsdepression gab, zu identifizieren. Damit war der experimentelle Beweis erbracht, daß  $\beta$ -Alanin ein Bestandteil der Pantothensäure war<sup>25</sup>).

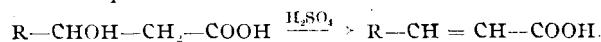
Von R. Kuhn u. Th. Wieland wurde bei der sauren Hydrolyse von Pantothenäurepräparaten aus Thunfischleber<sup>16)</sup> neben  $\beta$ -Alanin auch noch 1-Leucin gefunden. Welche biologische Bedeutung dem Leucinderivat zukommt, lässt sich nicht sagen.

Isolierung von  $\alpha$ -Oxy- $\beta,\beta$ -dimethyl- $\gamma$ -buttersäure-lacton. Zur vollständigen Strukturaufklärung der Pantothen-säure war jetzt noch nötig, den Aufbau des stickstoffreien Spaltstückes zu klären<sup>26</sup>). Analysen von reinem Ca-Pantothenat wiesen darauf hin, daß außer  $\beta$ -Alanin noch eine Carbonsäure mit 5 C-Atomen und 2 OH-Gruppen vorhanden sein müsse<sup>27</sup>). Die Anwendung neuer Mikromethoden für  $\alpha$ - und  $\beta$ -Oxysäuren gestattete einen näheren Einblick. Bei Hydrolyse der Pantothenäure mit verd. Alkali fiel der Eisenchlorid-nachweis für  $\alpha$ -Oxysäuren positiv aus, bei saurer Hydrolyse hingegen negativ, was auf die Bildung eines  $\alpha$ -Oxylactons zurückgeführt wurde. Es wurde eine quantitative Mikro-bestimmung nach folgendem Schema durchgeführt:



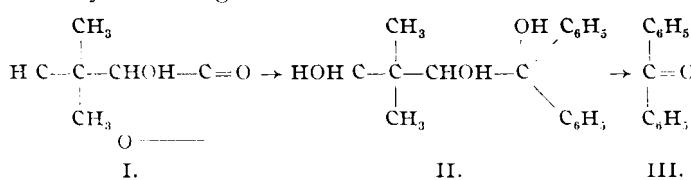
Das frei werdende CO wird dabei volumetrisch gemessen. Mit diesem Versuch konnte die Anwesenheit einer  $\alpha$ -Oxygruppe nachgewiesen werden. Die Abwesenheit einer  $\beta$ -Oxygruppe

ergab sich aus dem negativen Verlauf folgender Reaktion, die auch als quantitative Mikromethode arbeitet:

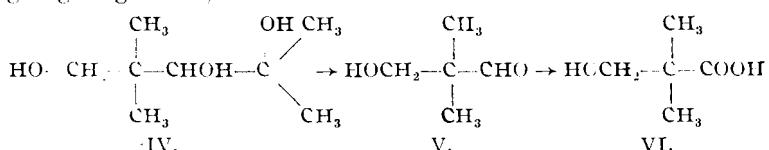


Die Wasserabspaltung wird dabei durch Titration mit  $\text{KMnO}_4$  in Aceton verfolgt.

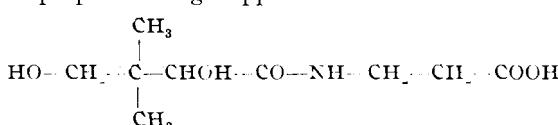
Die genaue Struktur der Oxysäure wurde dann am Forschungsinstitut von Merck & Co., Inc., Rahway, New Jersey, in Zusammenarbeit der einzelnen Forschungsstellen, die mit ihrem gesamten Material dorthin übersiedelten, aufgeklärt<sup>28). Zunächst gelang es nicht, das Oxylacton bei der Spaltung der Pantothenäure in kristallisiertem Zustand zu erhalten, erst aus besonders gereinigtem Material konnte schließlich durch Hydrolyse mit normalem Alkali, nachträglichem Ansäuern und Erhitzen zur Lactonisierung und darauf folgende Ätherextraktion des neutralen Reaktionsproduktes in 55—60%iger Ausbeute ein kristallisiertes Produkt erhalten werden. Es wurde durch Molekularsublimation gereinigt und aus Äther-Petroläther umkristallisiert. Der Schmelzpunkt betrug dann 91—92°, die spezifische Drehung  $[\alpha]_D^{25} = -49.8^{\circ}$ . Analyse und Molekulargewichtsbestimmungen wiesen auf die Summenformel  $C_6H_{10}O_3$ . Eine freie Carboxylgruppe konnte durch Titration nicht nachgewiesen werden, erst nach Erwärmen wurde 1 Äquivalent Alkali verbraucht, was auf die Anwesenheit einer Lactongruppe hindeutet. Die Stabilitätsverhältnisse dieses Lactons wiesen auf ein  $\gamma$ -Lacton hin. Der Körper besaß ein aktives Wasserstoffatom<sup>29)</sup> und eine Hydroxylgruppe, die durch Bildung eines Monoacetats charakterisiert wurde. Ferner wurden das p-Nitro-benzoat und das 3,5-Dinitro-benzoat dargestellt. Bei der Oxydation mit kaltem alkalischen Bariumpermanganat wurden ziemlich rasch 5 Sauerstoffatome aufgenommen, dann viel langsamer ein weiteres Sauerstoffatom verbraucht; als einziges Oxydationsprodukt konnte dabei eine geringe Menge Aceton erhalten werden, das als p-Nitro-phenylhydrazon nachgewiesen wurde. Auf Grund der experimentellen Befunde wurde Formel I für das Oxylacton aufgestellt</sup>



Mit Phenylmagnesiumbromid konnte das Lacton I in das kristallisierte Oxydiphenylcarbinol II übergeführt werden. Durch Oxydation mit Bleitetraacetat wurde daraus Benzoephon III erhalten. Das Oxydiphenylcarbinol muß also ein 1,2-Glykol sein und das Lacton infolgedessen eine Hydroxylgruppe in  $\alpha$ -Stellung zur Carbonylgruppe der Lactonbrücke besitzen. Der weitere Aufbau des Lactons konnte dann durch seine Überführung in das Oxyliumethylcarbinol IV mit Methylmagnesiumjodid bewiesen werden. Bei Oxydation mit Bleitetraacetat entstand der Aldehyd V, der durch Oxydation mit alkal. Silberhydroxyd in die  $\alpha$ -Dimethyl- $\beta$ -oxy-propionsäure VI überging. Diese besaß einen Schmelzpunkt von 124—125° und ergab im Mischschmelzpunkt mit synthetischem Material keine Depression. Damit war die Struktur des Oxy-lactons, des zweiten Bestandteils der Pantothenäure, endgültig aufgeklärt<sup>28)</sup>.



Nach den vorliegenden analytischen Arbeiten setzte sich also die Pantothenäure zusammen aus  $+\alpha,\gamma$ -Dioxy- $\beta,\beta$ -dimethyl-buttersäure, die mit einer Peptidbindung mit  $\beta$ -Amino-propionsäure gekuppelt ist:



<sup>22</sup>) H. K. Mitchell u. R. J. Williams, J. Amer. chem. Soc. **60**, 2723 [1938].

<sup>24)</sup> *H. K. Mitchell u. R. J. Williams, Jr.* Amer. chem. Soc. **60**, 2723 [1938].  
<sup>25)</sup> *H. K. Weinstock, H. K. Mitchell, G. F. Pratt u. R. J. Williams*, ebenda **61**, 1421 [1939].  
<sup>26)</sup> *MacLean u. Klotz*, ebenda **60**, 2086 [1938].

<sup>24)</sup> *Mueller* u. *Klotz*, ebenda **60**, 3086 [1938].

<sup>26)</sup> *H. K. Mitchell, H. H. Weinstock jr., E. E. Snell, S. R. Stanbury u. R. J. Williams,*

ebenda 62, 1776 [1940].  
(2) *Williams v. Murray, Supreme [New York]*, 61, 246 [1940].

28) E. T. Stiller, *Kerogenes und Finkulsteine*, J. Amer. chem. Soc. **82**, 1779 [1940].

<sup>23)</sup> R. J. Williams, ebenda **58**, 1819 [1936].

### Partialsynthesen der Pantothenäure.

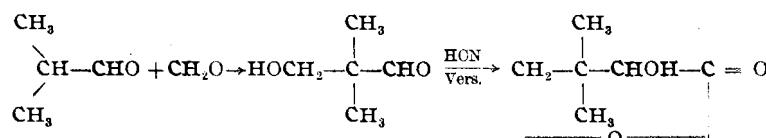
Bevor noch die genaue Struktur des Lactons bekannt war, gelang Williams eine Teilsynthese der Pantothenäure. Er kondensierte durch Spaltung von Pantothenäure erhaltenes Lacton mit  $\beta$ -Alaninmethylester und erhielt eine biologisch wirksame Lösung von synthetischer Pantothenäure<sup>30)</sup>.

Wolley u. Waisman gelang ebenfalls die Teilsynthese des Antidermatitfaktors, der sich als identisch mit Pantothenäure erwies. Sie spalteten den Faktor durch alkalische Hydrolyse und isolierten das entstandene Alanin. Das verbleibende Spaltstück, die noch unbekannte Oxysäure, wurde in ihr acetyliertes Chlorid übergeführt und dieses mit  $\beta$ -Alaninmethylester kondensiert. Nach vorsichtiger alkal. Verseifung des Esters wurde im Hühnerversuch volle Wirksamkeit festgestellt. Die Hühner werden dazu auf eine vitamin-B-freie Diät gesetzt, bis deutliche Symptome der Dermatitis auftreten. Durch Dosen von natürlicher oder synthetischer Pantothenäure tritt Heilung der Dermatitis und deutliche Wachstumszunahme auf<sup>31)</sup>.

Als dann die Struktur des Oxylactons bereits feststand, führten E. Stiller u. Mitarbeiter zunächst eine Partialsynthese aus kristallisiertem analytischen Lacton und  $\beta$ -Alaninmethylester durch und erhielten die Pantothenäure als schwach gelbliches Öl, das schwierig von den letzten Spuren Lösungsmittel befreit werden kann. Die spezifische Drehung beträgt  $[\alpha]_D^{25} = +37,5^\circ$ . Sie stellten auch ein mikrokristallines Calciumsalz von der Drehung  $[\alpha]_D^{25} = +24,3^\circ$  her<sup>32)</sup>.

### Totalsynthese der Pantothenäure.

$\alpha$ -Oxy- $\beta$ , $\beta$ -dimethyl- $\gamma$ -buttersäurelacton war bereits von Glaser<sup>33)</sup> sowie von Kohn u. Neustädter<sup>34)</sup> synthetisiert worden mit Hilfe einer Cyanhydrinsynthese aus  $\alpha$ -Dimethyl- $\beta$ -oxy-propionaldehyd. Dieses Aldol hat L. Wessely<sup>34)</sup> beschrieben. Es wurde durch Kondensation von Isobutyraldehyd mit Formaldehyd in guter Ausbeute erhalten:



Das Aldol wurde in die Bisulfitverbindung übergeführt und diese in das Cyanhydrin. Nach Verseifung konnte das Lacton isoliert werden. Das synthetische Lacton stellte ein Gemisch der beiden optischen Antipoden dar und wurde mit Hilfe der Chininsalze gespalten. Das synthetische linksdrehende Lacton hatte den gleichen Schmelzpunkt, Mischschmelzpunkt und dieselbe spez. Drehung und lieferte das gleiche p-Nitrobenzoat wie das natürliche Lacton<sup>35)</sup>.

Das synthetische linksdrehende, rechtsdrehende und racemische Lacton wurden nunmehr mit  $\beta$ -Alaninester kondensiert und ergaben die synthetische linksdrehende, rechtsdrehende und racemische Pantothenäure. Diese wurden als viscose Öle erhalten, die nur sehr schwer frei von Lösungsmitteln zu bekommen waren. Die drei Säuren bilden mikrokristalline Calciumsalze ohne charakteristischen Schmelzpunkt. Versuche mit Bakterien zeigten, daß die rechtsdrehende synthetische Säure die volle Aktivität des natürlichen Vitamins aufwies, während die linksdrehende Säure inaktiv war, wenn sie aus einem genau gereinigten rechtsdrehenden Lacton dargestellt war. Die Racemform besaß die halbe Aktivität der natürlichen Säure. Die synthetische rechtsdrehende Pantothenäure wurde ferner noch auf ihre Wirksamkeit an Hühnern untersucht. 15 und 20 mg auf je 100 g Diätnahrung riefen bei den Hühnern Wachstumszunahme und Heilung der durch Maigeldiät erzeugten Dermatitis hervor. Eine einmalige Dosis von 800  $\gamma$  bewirkte bei Ratten, die pantothenäurefrei ernährt wurden, eine rasche und bemerkbare Gewichtszunahme, während die gleiche Dosis der linksdrehenden Form unwirksam blieb<sup>36)</sup>.

Von Williams, Mitchell u. Weinstock wurde noch eine außerordentlich einfache Methode zur Kondensation von

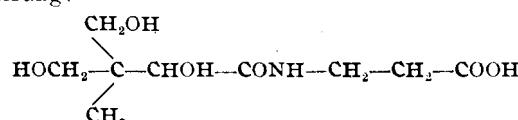
$\beta$ -Alanin mit dem Oxylacton beschrieben<sup>37)</sup>. Durch Erhitzen des trockenen Lactons mit dem trockenen Natriumsalz von  $\beta$ -Alanin wurde mit nahezu theoretischer Ausbeute direkt das Natriumsalz der racemischen Pantothenäure erhalten. Das Verfahren hat den Vorteil, daß die Verwendung der leicht polymerisierenden Alaninester überflüssig ist, daß ferner die Verseifung des Esters wegfällt, da ja sofort das Natriumsalz entsteht; schließlich ist auch die auf trockenem Wege dargestellte Pantothenäure viel trockener als ein durch Wasserentzug aus einem naß dargestellten Salz erhältliches Präparat

Von Reichstein u. Gräßner wurde beinahe gleichzeitig mit den amerikanischen Autoren eine Totalsynthese der Pantothenäure beschrieben<sup>38)</sup>. Sie stellten ebenfalls auf dem oben beschriebenen Wege das (dl)- $\alpha$ -Oxy- $\beta$ , $\beta$ -dimethyl- $\gamma$ -butyrolacton her. Durch Erwärmen des Lactons mit  $\beta$ -Alaninmethylester in Methanol erhielten sie in ausgezeichneter Ausbeute den Methylester der racemischen Pantotensäure, der durch vorsichtige alkal. Verseifung in die freie Säure übergeführt wurde. Das synthetische racemische Lacton wurde auch mit Hilfe der Chininsalze in die optischen Antipoden gespalten und diese ebenfalls mit  $\beta$ -Alaninmethylester kondensiert. Der aus dem linksdrehenden Lacton dargestellte Pantothenäureester zeigte eine spezifische Drehung  $[\alpha]_D^{15} = +37,1 \pm 1^\circ$ . Über die Ergebnisse der biologischen Untersuchungen haben die Verfasser noch nichts veröffentlicht. An einem Essigbakterium erwies sich (dl)-Pantothenäure sowohl als Ester als auch als Natriumsalz wirksam.

Nach einer etwas anderen Methode wurde von R. Kuhn u. Th. Wieland gearbeitet<sup>7,33)</sup>. Durch Kondensation von  $\alpha$ , $\gamma$ -Dioxy- $\beta$ , $\beta$ -dimethyl-buttersäurelacton mit  $\beta$ -Alaninbenzylester und darauffolgende katalytische Hydrierung stellten sie racemische Pantothenäure her und verwendeten das kristallisierte Chininsalz zur Spaltung in die Antipoden. Das chromatographisch gereinigte racemische Vitamin besaß eine biologische Wirksamkeit von 2000000 SbmE/g. Durch Umsetzung der wässrigen, mit Barytwasser versetzten Lösung mit Chininsulfat wurden die Chininsalze der beiden optisch aktiven Formen erhalten, die durch Kristallisation aus Aceton-Methanol oder Methyläthylketon getrennt werden konnten. Aus dem schwerlöslichen Chininsalz konnte die linksdrehende Pantothenäure ( $[\alpha]_D^{25} = -27^\circ$  in Wasser) und aus dem leicht löslichen Salz die rechtsdrehende Pantothenäure ( $[\alpha]_D^{25} = +27^\circ$  in Wasser) isoliert werden. Die biologische Wirksamkeit der rechtsdrehenden Säure betrug 45000000–50000000 SbmE/g. Die linksdrehende Säure erwies sich im Streptobakteriumtest als mindestens 30mal weniger wirksam als ihr Spiegelbild. Im Rattenversuch wurde bei filtratfaktorfreier ernährten Ratten eine Gewichtszunahme von 10–12 g pro Woche bei Dosen von 15  $\gamma$  pro Tag an rechtsdrehender Pantothenäure erzielt<sup>7,35)</sup>.

### Oxypantothensäure und Homopantothensäure.

Von H. Mitchell, E. Snell u. R. Williams<sup>36)</sup> wurde ferner noch eine Oxypantothensäure synthetisiert mit folgender Formulierung:



Durch Kondensation von n-Propionaldehyd mit Formaldehyd wurde der Aldehyd  $\text{CH}_3 \cdot \text{C} \cdot (\text{CH}_2\text{OH})_2 \cdot \text{CHO}$  erhalten und daraus das entsprechende Oxynitril dargestellt und verseift. Das entstandene Lacton wurde dann mit  $\beta$ -Alanin gekuppelt. Die Oxypantothensäure wurde an verschiedenen Mikroorganismen auf ihre biologische Wirksamkeit untersucht. Der Körper besitzt ebenfalls eindeutig wachstumsanregende Wirkung. Die Aktivität wechselt jedoch stark mit den verschiedenen Mikroorganismen (Hefen, Streptokokken, Milchsäurebakterien) und den Versuchsbedingungen, während bei Kontrollversuchen an den gleichen Organismen synthetische Pantothenäure überall die gleiche Wirksamkeit zeigte.

Kuhn u. Wieland isolierten bei der hydrolytischen Spaltung von Pantothensäure außer dem  $\alpha$ , $\gamma$ -Dioxy- $\beta$ , $\beta$ -dimethyl-

<sup>30)</sup> Williams, Science [New York] **89**, 486 [1939], cf. <sup>5)</sup>.

<sup>31)</sup> Woolley, Waisman u. Elvehjem, J. Amer. Chem. Soc. **61**, 977 [1939].

<sup>32)</sup> Mh. Chem. **25**, 46 [1904].

<sup>33)</sup> Ebenda **39**, 295 [1918].

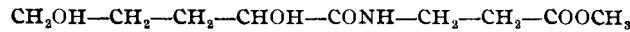
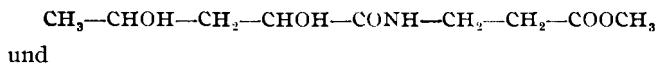
<sup>34)</sup> Ebenda **21**, 216 [1907].

<sup>35)</sup> Ber. dtsh. chem. Ges. **73**, 1134 [1940].

<sup>36)</sup> J. Amer. chem. Soc. **62**, 1791 [1940].

buttersäurelacton noch eine kristallisierte Verbindung  $C_7H_{12}O_3$ , das vermutlich ein Homologes dieses Lactons darstellt. Die durch Kondensation des Lactons  $C_7H_{12}O_3$  mit  $\beta$ -Alaninbenzylester gewonnene „Homopantothensäure“ erwies sich im Streptobakteriumtest als unwirksam. Von den gleichen Forschern wurde auch das Leucinhomologe der Pantothensäure synthetisiert. Dieses vermochte sogar in 500facher Dosis im Streptobakteriumtest die Pantothensäure nicht zuersetzen<sup>16).</sup>

Die von Reichstein u. Grünauer synthetisierten Produkte:



zeigten an Ratten nur die schwache Wirksamkeit von  $\beta$ -Alanin, während sie an einem Essigbakterium, das auf  $\beta$ -Alanin nicht anspricht, vollkommen unwirksam blieben<sup>16).</sup>

Subbarow u. Rane stellten aus 2,5-Dioxy-valeriansäure und  $\beta$ -Alanin ein synthetisches Material her, das an Streptokokken fast die gleiche Wirksamkeit zeigte wie Pantothensäure<sup>14, 57).</sup>

Es ist nun zu hoffen, daß viele biologische Fragen, die wegen der schwierigen Isolierung und Reindarstellung der Pantothensäure aus natürlichen Quellen bis heute noch ungelöst sind, durch die Verwendung synthetischen Materials in Kürze geklärt werden.

Eingeg. 28. Oktober 1940. [A. 101.]

<sup>17)</sup> Woolley u. Hutchings, J. Bacteriol. 89, 287 [1940].

## Analytisch-technische Untersuchungen

### Einige Beobachtungen bei der Verdampfung wässriger NaCN-Lösungen

Von Dr. E. v. PAPP und J. POGANY, Budapest

Aus dem Laboratorium der Hydroxygen A.-G.

Da die wässrige Lösung von Alkalicyaniden sich schon bei Zimmertemperatur zersetzt, sind die Verluste beim Eindampfen so groß, daß sie bei der industriellen Darstellung keinesfalls vernachlässigt werden können.

Als Ursache kann nach den einschlägigen Literaturangaben die Hydrolyse bezeichnet werden.

Da die Hydrolyse in verdünnten Lösungen in stärkerem Maße auftritt als in konzentrierten, arbeitet z. B. Nossalewitsch<sup>1)</sup> bei Verdampfungsversuchen mit wenigstens 4,5 n-Lösungen; konzentriertere Lösungen anzuwenden, hat keinen Zweck, da bei höheren Konzentrationen der Grad der hydrolytischen Spaltung kaum mehr abnimmt. Einige Patentschriften<sup>2)</sup> beschreiben das schnelle Eintrocknen der Lösung auf Trockentrommeln von 140–300°, um das Salz in gelöstem Zustand kürzere Zeit auf hoher Temperatur zu halten und so die Hydrolyse weitgehend zu vermeiden.

Die Hydrolyse ist eine umkehrbare Reaktion und kann als solche durch einen Überschuß von OH<sup>-</sup>-Ionen zurückgedrängt werden. Es wurden daher zunächst Versuche mit verschiedenen Zusätzen an Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> angestellt (Nr. 1–5). Die Ergebnisse zeigen aber, daß die Zersetzung von NaCN auf diese Weise nicht beeinflußt werden kann.

(Der Verdampfungsverlust der Lösungen mit 15 und 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ist größer, weil das Verdampfen über Nacht unterbrochen wurde und das Salz sich so längere Zeit in Lösung befand.)

Auch Verkürzung der Verdampfungszeit hat keine unenntenswerte Wirkung (Nr. 6 u. 7 Verdampfen im Luftbad; Nr. 8 u. 9 Tropfenweises Verdampfen in einer heißen Quarzröhre bzw. Nr. 10 in einer heißen Porzellanschale). Setzt man dagegen etwas Alkohol zu der Lösung hinzu, so läßt sich der Zersetzunggrad nicht unbeträchtlich vermindern (Nr. 11–13). Man darf daher vermuten, daß außer der Hydrolyse auch die Oxydation der Cyanide an der Luft für die Verluste verantwortlich ist. Die Reaktion: NaCN + O → NaOCN kann ja bei der Verdampftstemperatur leicht eintreten und damit die Cyanidausbeute beeinträchtigen.

Um Oxydation zu vermeiden, wurden deshalb die folgenden Verdampfungsversuche in Stickstoffatmosphäre ausgeführt (Nr. 14–15) und außerdem Glycerin zugesetzt, mit dem bisher die günstigsten Ergebnisse erreicht wurden (Nr. 16 u. 17).

Wie die Zahlen zeigen, könnte man also nach dieser Vorschrift schon größere Mengen von NaCN-Lösungen eindampfen, ohne allzu große Verluste befürchten zu müssen; von Nachteil ist aber, daß man unter völligem Luftabschluß, also in geschlossenen Gefäßen und mit konstantem Stickstoffstrom arbeiten muß, was natürlich die Eindampfkosten erhöht.

Um nun das Eindampfen womöglich ohne Luftabschluß durchführen zu können, wurde die Wirkung einiger kräftiger anorganischer Reduktionsmittel auf den vorliegenden Fall untersucht. Es ergab sich, daß sie, schon in Mengen von einigen zehntel Prozent der Lösung vor dem Eindampfen zugesetzt, die Oxydation von NaCN größtenteils verhindern können (Nr. 18–20).

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß die beim Eindampfen von NaCN-Lösungen auftretenden Verluste hauptsächlich von der Oxydation und nur in geringem Maße von der Hydrolyse herrühren; außerdem bietet die Anwendung kräftiger Reduktionsmittel die Möglichkeit, technisch reine NaCN-Lösungen in einfachen Verdampfapparaten ohne nennenswerte Verluste zu verarbeiten.

Eingeg. 8. August 1940. [A. 102.]

<sup>1)</sup> Chem. Ztbl. 1935 II, 1089.

<sup>2)</sup> Brit. Pat. 411 177, Amer. Pat. 2 029 828, Amer. Pat. 2 042 540.