

D. Zusammenfassung.

Wir stellten 2 Vertreter der 2-Alkoxy-4-(pipecolino-acetyl-amino)-chinoline und das 2-n-Butoxy-4-(β -diäthylamino-propionyl-amino)-chinolin („Isomeres Percain“) her und untersuchten diese Verbindungen auf ihre pharmakologischen Eigenschaften. Die Umkehrung der Säureamidbrücke in der Percain-Moleköl bewirkt eine starke Senkung der lokalanästhetischen Wirkung und zugleich eine Verminderung der Verträglichkeit. Verglichen mit den entsprechenden Diäthylamino-acetyl-Derivaten des 2-Alkoxy-4-amino-chinolins bewirkte die Vergrösserung des Acylrestes eine Verdoppelung der lokalanästhetischen Wirkung.

Während der Ersatz der Diäthylamino-Gruppe durch eine Pipecolino-Gruppe bei den Benzoesäureestern eine Verbesserung der Wirkung und der Verträglichkeit bewirkt, ergab der gleiche Ersatz bei den 2-Alkoxy-4-(diäthylamino-acetylamino)-chinolinen eine Erniedrigung der Oberflächenanästhesie und der Verträglichkeit bei etwas erhöhter Infiltrationsanästhesie-Wirkung.

Pharmazeutisches Institut der Eidg. Techn.
Hochschule, Zürich und
Wissenschaftliche Forschungsabteilung
der *Dr. A. Wander AG.*, Bern.

167. Beitrag zum Studium der Triphosphorsäureester. Das Verhalten des Thiamin-triphosphorsäureesters (T.T.P.) in wässriger Lösung

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

(30. V. 51.)

Wir haben schon in einer früheren Arbeit¹⁾ die Unbeständigkeit des T.T.P. in wässriger Lösung erwähnt. Die Anwendung des Papierchromatogrammverfahrens erlaubt, einige genauere Ergebnisse über den Verlauf der Hydrolysen hinzuzufügen.

Um die Papierchromatogramme des Thiamins und seiner Phosphorsäureester erfolgreich durchführen zu können, haben wir uns auf die folgenden Eigenschaften dieser Derivate gestützt:

1. Die Löslichkeit des Thiamins und seiner Derivate in Äthanol nimmt in folgender Reihenfolge ab: Thiamin, Thiamin-monophosphorsäureester (T.M.P.), Thiamin-diphosphorsäureester (T.D.P.), Thiamin-triphosphorsäureester (T.T.P.). Man kann bei ihrer chromatographischen Trennung eine 80-proz. Äthanollösung anwenden und erhält dann

¹⁾ M. Viscontini, G. Bonetti & P. Karrer, *Helv.* **32**, 1478 (1949); siehe auch L. Velluz, G. Amiard & J. Bartos, *Bl.* **1948**, 871.

Chromatogramme, die zufriedenstellende Ergebnisse liefern. Die absteigenden Chromatogramme geben die besten Resultate. Die erhaltenen R_F -Werte, welche sich entsprechend verschiedener experimenteller Bedingungen etwas verändern können, haben folgende Grössenordnung:

Thiamin 0,4; T.M.P. 0,2; T.D.P. 0,1; T.T.P. 0,05.

2. Thiamin und seine phosphorylierten Ester zeigen bei $pH = 7$ ein Absorptionsminimum bei $250 \text{ m}\mu$ (Fig. 1); trotzdem ist ihre Extinktion bei $250 \text{ m}\mu$ genügend gross, um sie auf dem Papier mit einer Niederdruck-Quecksilberdampflampe, deren Spezialfilter nur die Resonanzlinie $254 \text{ m}\mu$ durchlässt, erkennbar zu machen. Die für den Nachweis von Purin- und Pyrimidinderivaten schon angegebene Methode¹⁾ kann man auf alle die Substanzen anwenden, welche die Wellenlänge $254 \text{ m}\mu$ stark absorbieren. Die Flecken des Thiamins und des T.M.P. sind klar und scharf begrenzt. Im Gegensatz hierzu zeigen diejenigen der T.D.P. und T.T.P. Streifen, die wir Hydrolysen zuschreiben, welche sich während der Chromatographie abspielen. So zeigt T.T.P. gleichzeitig den Flecken des T.D.P., von welchem er sich nur sehr schwer trennen lässt.

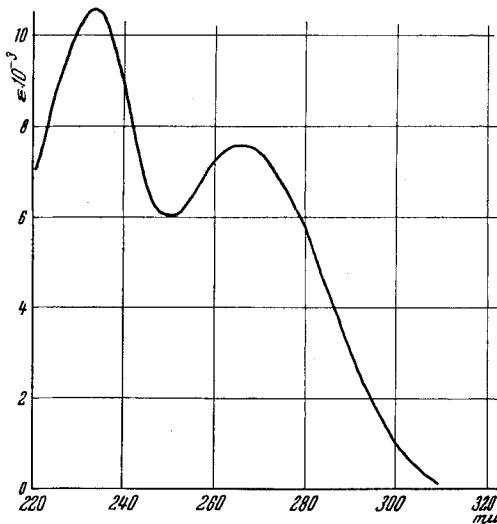


Fig. 1.

UV.-Spektrum von Thiamin und seinen Estern in einer 1-proz. wässrigen Natriumacetatlösung.

Eine wässrige Lösung von T.T.P. ist bei Laboratoriumstemperatur ziemlich beständig. Erst nach mehreren Stunden lässt sich freie Orthophosphorsäure in der Lösung nachweisen. Die Chromatogramme dieser Lösungen zeigen die charakteristischen Flecken der T.T.P. und T.D.P. Der Fleck vom T.M.P. erscheint nur, wenn freie Orthophosphorsäure in der Lösung nachgewiesen werden kann.

Bei 100° geht die Hydrolyse ziemlich rasch vor sich (Fig. 2). Das Papierchromatogramm zeigt, dass T.T.P. dabei T.D.P. liefert, und der so gebildete Diester geht mit beinahe gleicher Geschwindigkeit in T.M.P. über. Die Cocarboxylase ist also nur ein vorübergehendes Zwischenprodukt der Hydrolyse. Dies ist der Grund für die relative

¹⁾ E. Chargaff, B. Magasanik, R. Doniger & E. Vischer, Am. Soc. 71, 1513 (1949).

Schwierigkeit der Isolierung der Cocarboxylase und die Erklärung, weshalb zahlreiche fraktionierte Ausfällungen nötig sind, um ein ziemlich reines Produkt herzustellen. Mit Hilfe der Papierchromatogramme kann man leicht ersehen, wie der Gehalt an T.T.P. in Lösung

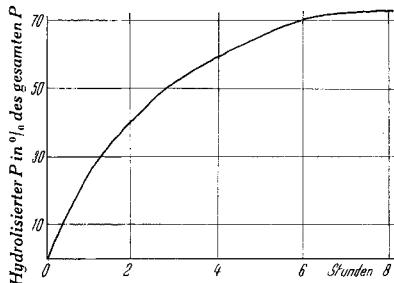
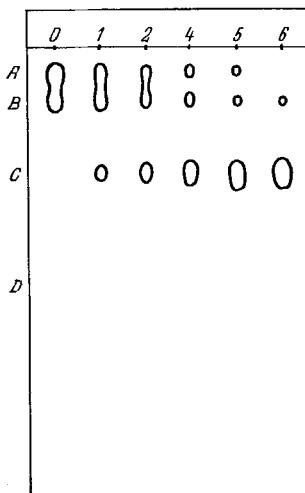


Fig. 2.

Hydrolyse einer $1,2 \cdot 10^{-3}$ molaren wässrigen Thiamin-triphosphor-säureester-Lösung bei 100° . Man sieht, dass unter diesen Bedingungen 2 Mol Orthophosphorsäure nach einer etwa 6ständigen Hydrolyse abgespalten worden sind.

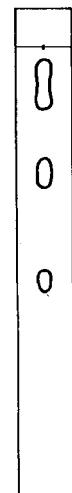
geringer wird und wie sich darin T.M.P. anreichert, ohne dass die Lösung jemals eine grosse Konzentration an Cocarboxylase aufweist (Fig. 3).



Papierchromatogramm von verschiedenen Stadien der Hydrolyse bei 100° , deren Verlauf in Figur 2 dargestellt ist. Die Ziffern geben die Zeit in Stunden der Hydrolyse an.

- A = T.T.P.
- B = T.D.P.
- C = T.M.P.
- D = Thiamin

Fig. 3.



Papierchromatogramm der Hydrolyse einer konzentrierten T.T.P.-Lösung nach 15 Min. Sieden. Die Anwesenheit des Thiamins ist auf diesem Chromatogramm deutlich zu sehen.

- A = T.T.P.
- B = T.D.P.
- C = T.M.P.
- D = Thiamin

Fig. 4.

Will man die Hydrolyse der T.T.P. bis zum freien Thiamin fortführen, so ist es zweckmässig, mit viel konzentrierteren Lösungen von T.T.P. zu arbeiten. Die Hydrolyse verläuft dann, als ob man in Gegenwart von Mineralsäuren arbeiten würde; nach viertelstündigem Sieden kann man das Thiamin leicht nachweisen (Fig. 4).

Die vorliegende Arbeit wurde in dankenswerter Weise von der *Stiftung für wissenschaftliche Forschung an der Universität Zürich* und den *Arbeitsbeschaffungskrediten des*

Bundes unterstützt. An dieser Stelle wollen wir auch Herrn Prof. Leuthardt, Physiologisch-chemisches Institut der Universität Zürich, für die Benutzung einer Mineral-Light-Lampe unseren besten Dank aussprechen.

Experimenteller Teil.

Phosphor wurde nach der Methode von *Berenblum & Chain*¹⁾ bestimmt. Die Spektren wurden in 1-proz. wässriger Natriumacetat-Lösung aufgenommen.

Die Erfahrung hat gezeigt, dass man T.T.P. leichter herstellen kann, wenn man die nachfolgende Methode anwendet, die kleine Abweichungen von den von uns früher angegebenen Vorschriften aufweist²⁾:

Thiamin-triphosphorsäureester-phosphat: Zu 2 cm³ auf 100° erhitzter Metaphosphorsäure, hergestellt nach unseren früheren Angaben, fügt man 500 mg Thiamin-dihydrochlorid. Nach viertelstündigem Erhitzen auf 100° kühlt man das Gemisch schnell ab und löst es in einem Minimum an Eiswasser, dem man einige Tropfen Orthophosphorsäure zugefügt hat, auf. Diese Lösung giesst man auf einmal in 100 bis 150 cm³ eines Gemisches von Äthanol-Aceton (1:1 Vol.). Es bildet sich sofort ein flockiger Niederschlag, den man abzentrifugiert, wäscht und dann in möglichst wenig Wasser, das etwas Orthophosphorsäure enthält, auflöst. Daraus fällt man T.T.P. wiederum aus und wiederholt die Fällung so oft, bis die Verbindung den richtigen Phosphorgehalt besitzt. Dieses Verfahren vermeidet die Bildung öliger Niederschläge, deren Kristallisation mühsam ist. In wenigen Stunden erhält man so eine gute Ausbeute an reinem T.T.P.-phosphat.

Thiamin-triphosphorsäureester: Um das Orthophosphorsäureion aus dem T.T.P.-phosphat zu entfernen, verfährt man nach unserer schon früher gegebenen Vorschrift²⁾: es ist zweckmäßig, dass dabei die wässrigen Lösungen in das Äthanol-Aceton-Gemisch gegossen werden und nicht umgekehrt. Diese Umfällungen sind zu wiederholen, bis die Orthophosphorsäureionen völlig verschwunden sind. Auch hier ist die Ausbeute noch gut.

Thiamin-triphosphorsäureester-hydrochlorid: Man erhält dieses Salz, indem man HCl statt H₃PO₄ während der Reinigung des T.T.P. hinzufügt. Auch hier sollen die wässrigen Lösungen auf einmal in das Äthanol-Aceton-Gemisch gegossen und diese Behandlung bis zur Erreichung genauer Analysenwerte wiederholt werden.

Die Hydrolysen wurden durchgeführt:

1. Während 8 Stunden bei 100° mit einer Lösung von 28,3 mg T.T.P.-hydrochlorid in 42,5 cm³ H₂O, d.h. einer 0,066-proz. oder einer 1,2·10⁻³-molaren Lösung.

2. Während 1/4 Stunde bei 110° mit einer Lösung von 220 mg T.T.P.-hydrochlorid in 20 cm³ H₂O, d.h. einer 1,1-proz. oder einer 2·10⁻²-molaren Lösung.

Papierchromatogramme. Man hat die absteigende Methode auf *Whatman*-Papier Nr. 1 mit einem Gemisch Äthanol-Wasser (4:1 Vol.) als Lösungsmittel angewendet. Nach dem Trocknen bei 100° wurden die Substanzen mit der „Mineral-Light“-Lampe nachgewiesen.

Zusammenfassung.

Wir beschreiben eine Methode zur Trennung von Thiamin und seinen Phosphorsäureestern mittels Papierchromatogramm und zeigen damit das Verhalten wässriger Thiamin-triphosphorsäureester-Lösungen bei Laboratoriumstemperatur und bei 100°. Unter diesen Bedingungen wird T.T.P. allmählich in Cocarboxylase und gleichzeitig die Cocarboxylase in T.M.P. mit ähnlicher Geschwindigkeit hydrolysiert. Daraus erklärt sich die relative Schwierigkeit der Reinherstellung der Cocarboxylase.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

¹⁾ Biochem. J. **32**, 295 (1938).

²⁾ Helv. **32**, 1478 (1949).