

168. Beitrag zum Studium der Triphosphorsäureester.
Das Verhalten des Thiamin-triphosphorsäureesters und des
Thiamin-diphosphorsäureesters (Cocarcboxylase) in alkalischer
Lösung

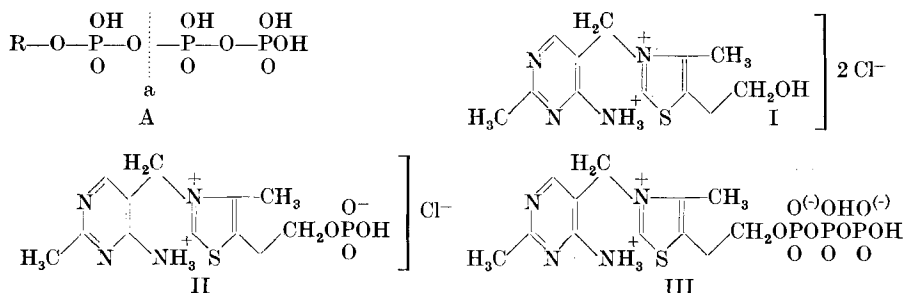
von M. Viscontini, G. Bonetti, C. Ebnöther und P. Karrer.

(30. V. 51.)

Aus einer wässrigen Lösung von Thiamin-triphosphorsäureester fällt Bariumhydroxyd 1 Mol Bariumpyrophosphat aus, sobald das pH der Lösung den Wert 6—7 erreicht. Dieselbe Spaltung tritt auch ein, wenn man die Thiamin-triphosphorsäurelösung mit Bariumacetat versetzt. Das Papierchromatogramm der Mutterlauge zeigt dann die Anwesenheit von Thiamin-monophosphorsäureester an. Letzteren haben wir als Hydrochlorid isoliert und durch seinen Schmelzpunkt, seine Analyse, sein Spektrum und sein Chromatogramm nachgewiesen.

Thiamin-triphosphorsäureester (A) wird somit durch Bariumhydroxyd leicht bei a gespalten unter Bildung von Pyrophosphat und Thiamin-monophosphat. Diese Hydrolyse lässt sich durch potentiometrische Titration des Thiamin-triphosphorsäureesters mit Natriumhydroxyd verfolgen. Eine Schwierigkeit dieser Titration wird durch den Umstand hervorgerufen, dass die Lauge den Thiazoliumring des Thiamins allmählich aufspaltet. Um diese Schwierigkeit möglichst zu unterdrücken, führt man die Titration so schnell wie möglich mit einer Glaselektrode aus. Die Rücktitration zeigt dann ungefähr die für die Öffnung des Thiazoliumringes verbrauchte Lauge an; eine dritte alkalische Titration bestätigt die vollständige Reversibilität dieser Vorgänge.

Wir haben die Titrationskurven des Thiamin-triphosphorsäureesters mit denjenigen des Thiamin-monophosphorsäureester-hydrochlorids und des Thiamin-dihydrochlorids verglichen.



Thiamin-dihydrochlorid I besitzt eine einzige saure Funktion, das Proton der Ammoniumgruppe des Pyrimidinkerns. Die Neutralisationskurve (Fig. 1, Kurve A) zeigt das Vorhandensein einer einzigen sauren Funktion¹⁾.

Im Thiamin-monophosphat-hydrochlorid müssen sich 2 saure Gruppen nachweisen lassen: eine mittelstark saure Funktion, die vom Proton der Ammoniumgruppe im Pyrimidinring stammt und eine schwächer saure Funktion, welche durch das zweite Proton des Phosphorsäureesters ausgelöst wird. Die Titrationskurve (Fig. 1, Kurve B) zeigt diese beiden sauren Funktionen deutlich.

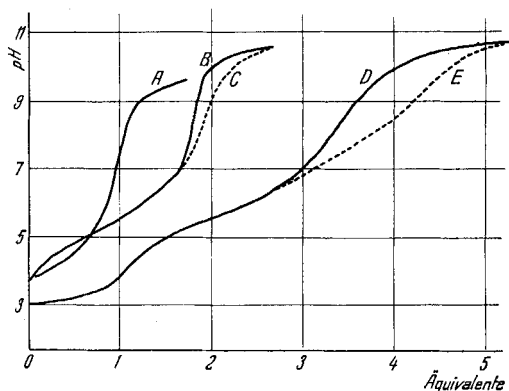


Fig. 1.

Titrationen mit 0,1-n.-NaOH des Thiamins und seiner phosphorylierten Ester:

- | | |
|---------------------------------------|-----------------------------------|
| A = Thiamin-dihydrochlorid | C = Rücktitration mit 0,1-n. HCl |
| B = Thiamin-monophosphat-hydrochlorid | D = Thiamin-triphosphorsäureester |
| | E = Rücktitration mit 0,1-n. HCl. |

Der Thiamin-triphosphorsäureester III besitzt entsprechend seiner Formel 3 stärkere und 1 schwächere saure Funktion (Neutralisation des Thiazolium-Stickstoffs, Proton der Ammoniumgruppe im Pyrimidinring und Protonen im Phosphorsäurerest). Es wäre daher zu erwarten, dass die Titrationskurve des Thiamin-triphosphorsäureesters eine starke, eine mittlere und eine schwach saure Funktion anzeigen würde; sie könnte dann aus derjenigen des Thiamin-monophosphorsäureester-hydrochlorids durch Translation eines Äquivalents erhalten werden. In Wirklichkeit hat die Titrationskurve eine andere Gestalt (Kurve D); sie lässt erkennen, dass nicht 3, sondern 5 Äquivalente Lauge für die Titration notwendig sind. Schon Velluz und Mitarbeiter²⁾ haben diesen grossen Verbrauch an Lauge beobachtet und schreiben ihn der Öffnung des Thiazoliumringes zu; sie vermuteten auch, dass oberhalb pH 11 1 Mol Pyrophosphorsäure abgespalten werden könnte.

¹⁾ Vgl. hierzu R. R. Williams & A. E. Ruehle, Am. Soc. **57**, 1856 (1935).

²⁾ Bl. **1948**, 871.

Andere Beobachtungen aus unserem Laboratorium, über welche wir später berichten werden, scheinen zu zeigen, dass auch andere Triphosphorsäureester mit unverzweigter Phosphorsäurekette in alkalischer Lösung sehr leicht in Pyrophosphat und den Monophosphorsäureester der Grundsubstanz gespalten werden. Diese Unbeständigkeit solcher Triphosphorsäureester ist um so seltsamer, als die relativ grosse Beständigkeit der meta-Phosphorsäure selbst in alkalischer Lösung bekannt ist.

Cocarboxylase, ein Pyrophosphorsäureester, bildet mit Bariumhydroxyd ein lösliches Bariumsalz. In stark alkalischer Lösung zersetzt sich dieses Salz unter Abscheidung von Bariumpyrophosphat langsam. Diese Hydrolyse erfolgt viel weniger schnell als diejenige des Thiamin-triphosphorsäureesters, bei welcher die oben beschriebene Spaltung zwischen dem ersten und dem zweiten Phosphorsäurerest der Kette erfolgt.

Für die Unterstützung dieser Arbeit sind wir der *Stiftung für wissenschaftliche Forschung an der Universität Zürich* und den *Arbeitsbeschaffungskrediten des Bundes* zu Dank verpflichtet. Weiterhin danken wir Herrn Prof. Dr. F. Leuthardt, Zürich, und Herrn Prof. Dr. G. Schwarzenbach, Zürich, für die Überlassung von Apparaten, die bei unserer Arbeit Benutzung fanden.

Experimenteller Teil.

Für die Aufnahme der Titrationskurven hat man 100 cm³ der 10⁻³-molaren Lösung der Phosphorsäureester mit 0,1-n. NaOH neutralisiert. Die Phosphorbestimmungen haben wir nach der Methode von *Berenblum & Chain*¹⁾ vorgenommen.

Die Papierchromatogramme wurden in derselben Art erstellt, wie sie in unserer vorstehenden Abhandlung beschrieben ist.

Hydrolyse des Thiamin-triphosphorsäureesters mit Ba(OH)₂. 200 mg Thiamin-triphosphorsäureester wurden in 10 cm³ Wasser aufgelöst, die Lösung auf 0° abgekühlt und tropfenweise eine gesättigte Lösung von Ba(OH)₂ hinzugefügt, bis kein Niederschlag mehr entstand. Ein Überschuss von Ba(OH)₂ löst einen Farbumschlag nach hellgelb aus und ist zu vermeiden. Hierauf hat man den entstandenen Niederschlag abzentrifugiert und mit Wasser, Äthanol und Äther gewaschen. Er bestand aus Bariumpyrophosphat, das wie bekannt mehr oder weniger Kristallwasser einschliessen kann. Ausbeute 230 mg.

P in freiem PO ₄ ^{'''}	0,7%
P in PO ₄ ^{'''} nach Hydrolyse ²⁾	11,4%
P gesamt	11,9%

Die oben erwähnten 230 mg Barium-pyrophosphat enthielten 27,5 mg P; theoretisch können aus 200 mg Thiamin-triphosphorsäureester 25 mg P als Pyrophosphat abgespalten werden. Der ungereinigte Niederschlag von Bariumpyrophosphat enthält noch geringe Mengen von Thiamin-Derivaten, die sich spektroskopisch nachweisen lassen (2–5%) und anscheinend am Pyrophosphat adsorbiert sind. Die Reinigung des Bariumpyrophosphat-Niederschlags haben wir nach zwei Methoden vorgenommen:

1. Man löste 120 mg des rohen Bariumpyrophosphats in einem Minimum von n.HCl auf, fügte tropfenweise Bariumacetatlösung hinzu, zentrifugierte den entstandenen Niederschlag ab und wusch ihn mit Wasser, Äthanol und Äther. Er bestand aus saurem Bariumpyrophosphat, das keine organische Substanz mehr einschloss. Ausbeute 50 mg.

¹⁾ Biochem. J. **32**, 295 (1938).

²⁾ Alle Hydrolysen wurden mit n.HCl während 10 Minuten bei 100° durchgeführt.

Ba, 1,5 HP₂O₇, 3 H₂O

Ber.	P in PO ₄ ^{'''}	0 %	Gef.	P in PO ₄ ^{'''}	0,2%
	P in PO ₄ ^{'''} nach Hydrolyse	14,3%		P in PO ₄ ^{'''} nach Hydrolyse	14,0%
	P gesamt	14,3%		P gesamt	14,0%
	Ba	47,3%		Ba	48,0%

2. 100 mg des rohen Bariumpyrophosphats wurden in einem Minimum von n. HCl aufgelöst. Dazu fügte man wenig BaCl₂ und hierauf Ammoniumhydroxyd bis zur alkalischen Reaktion. Der gebildete gallertartige Niederschlag wurde abzentrifugiert, mit Wasser, Äthanol und Äther gewaschen. Er bestand aus neutralem Bariumpyrophosphat und war frei von organischer Substanz. Er enthielt bei verschiedenen Darstellungen verschiedene Mengen von Kristallwasser. Ausbeute 95 mg.

Ba₂P₂O₇, 6 H₂O

Ber.	P in freiem PO ₄ ^{'''}	0 %	Gef.	P in freiem PO ₄ ^{'''}	0,2%
	P in PO ₄ ^{'''} nach Hydrolyse	11,1%		P in PO ₄ ^{'''} nach Hydrolyse	10,8%
	P gesamt	11,1%		P gesamt	11,6%
	Ba	49,3%		Ba	48,0%

Isolierung von Thiamin-monophosphorsäureester. Die Mutterlauge der Fällung des durch Hydrolyse des Thiamin-triphosphorsäureesters entstandenen Bariumpyrophosphates wurde mit Salzsäure angesäuert und hierauf durch verdünnte Schwefelsäure von dem darin enthaltenen Bariumion quantitativ befreit. Papierchromatogramme dieser Lösung zeigten die Anwesenheit von Thiamin-monophosphat an, während sich freies Thiamin darin nicht nachweisen liess. Zur Isolierung der Thiamin-monophosphorsäure wurde die Lösung im Vakuum auf 2–3 cm³ eingengt und mit einem Gemisch gleicher Teile Äthanol und Äther versetzt. Der so entstandene amorphe Niederschlag liess sich durch Auflösen in wenig Wasser und fraktionierte Ausfällung reinigen. Die zweiten und dritten Niederschläge bei der Fraktionierung ergaben kristallisiertes Thiamin-monophosphorsäure-hydrochlorid. Smp. 200°; dieser Schmelzpunkt stimmt mit dem von *Lohman & Schuster*¹⁾ angegebenen überein. Das Papierchromatogramm wies einen einzigen Fleck auf, der dem reinen Thiamin-monophosphorsäureester entsprach.

C₁₂H₁₈O₄N₄SPCl, 3 H₂O

Ber.	N	12,9 %	Gef.	N	12,7%
	P als freies PO ₄ ^{'''}	0 %		P als freies PO ₄ ^{'''}	0 %
	P in PO ₄ ^{'''} nach Hydrolyse	0 %		P in PO ₄ ^{'''} nach Hydrolyse	0,2%
	P gesamt	7,15%		P gesamt	6,8%

Bariumpyrophosphat aus Cocarboxylase. 150 mg Cocarboxylase-hydrochlorid wurden in 10 cm³ Wasser aufgelöst und die Lösung auf 0° abgekühlt. Dann fügte man bis zum Auftreten einer gelben Farbe tropfenweise eine gesättigte Lösung von Ba(OH)₂ hinzu. Enthielt die Cocarboxylase noch Spuren von Thiamin-triphosphat, so bildete sich sofort eine geringe Menge eines Niederschlags von Bariumpyrophosphat. Die von diesem Niederschlag abgetrennten Mutterlaugen blieben einige Tage bei Zimmertemperatur stehen, wobei man von Zeit zu Zeit durch Zusatz von Ba(OH)₂-Lösung die Reaktion der Flüssigkeit auf pH 11 hielt. Allmählich schied sich ein Niederschlag von Bariumpyrophosphat aus, der abzentrifugiert, mit Wasser, Äthanol und Äther gewaschen und zur Analyse gebracht worden ist.

Gef.	P als PO ₄ ^{'''}	0 %
	P in PO ₄ ^{'''} nach Hydrolyse	9,8%
	P gesamt	10,0%

Dieses Rohprodukt haben wir in derselben Weise wie oben beschrieben gereinigt und teils in saures, teils neutrales Bariumpyrophosphat übergeführt.

¹⁾ Biochem. Z. **294**, 188 (1937).

Ba, 1,5 HP₂O₇, 5 H₂O (471)

Ber.	P als PO ₄ ^{'''}	0 %	Gef.	P als PO ₄ ^{'''}	0 %
	P in PO ₄ ^{'''} nach Hydrolyse	13,1%		P in PO ₄ ^{'''} nach Hydrolyse	12,9%
	P gesamt	13,1%		P gesamt	13,0%
	Ba	43,7%		Ba	41,4%

Ba₂P₂O₇, 6 H₂O (556,7)

Ber.	P als PO ₄ ^{'''}	0 %	Gef.	P als PO ₄ ^{'''}	0 %
	P in PO ₄ ^{'''} nach Hydrolyse	11,1%		P in PO ₄ ^{'''} nach Hydrolyse	11,6%
	P gesamt	11,1%		P gesamt	11,9%
	Ba	49,3%		Ba	48,9%

Zusammenfassung.

Alkalien spalten Thiamin-triphosphorsäure sofort in 1 Mol Pyrophosphorsäure und 1 Mol Thiamin-monophosphat. Cocarboxylase (Thiamin-diphosphorsäureester) wird durch Ba(OH)₂ bei Zimmer-temperatur sehr langsam in Thiamin und Pyrophosphat zerlegt.

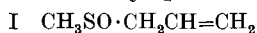
Zürich, Chemisches Institut der Universität.

169. Über zwei einfache, optisch aktive Sulfoxyde

von P. Karrer, N. J. Antia und R. Schwyzer.

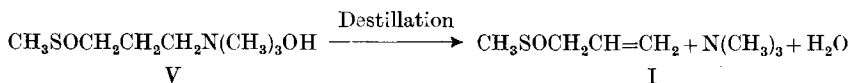
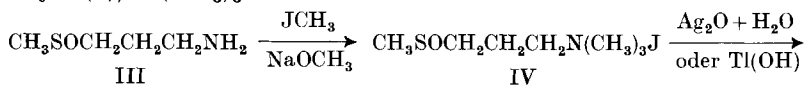
(30. V. 51.)

Im Zusammenhang mit unseren Arbeiten über Sulforaphen¹⁾, Sulforaphan¹⁾ und dessen synthetischen Homologen²⁾ haben wir einige einfachste optisch aktive Sulfoxyde dargestellt, da bisher nur solche mit funktionellen Gruppen als Substituenten bekannt waren. Die synthetischen Verbindungen sind *l*-Methyl-allyl-sulfoxyd (I) und *d*-Methyl-[buten-(3)-yl-(1)]-sulfoxyd (II).



Beide Substanzen wurden auch als *d, l*-Formen synthetisiert. Der für die Synthese eingeschlagene Weg war folgender:

Methyl-(γ -aminopropyl)-sulfoxyd (III) racemisch und als *l*-Form, wurde zum quartären Salz (3-[Methyl-sulfoxyd]-propyl)-trimethylammoniumjodid (IV) methyliert, dieses durch Silberoxyd und Wasser oder durch Thalliumhydroxyd in die quartäre Base V verwandelt und letztere im Hochvakuum erhitzt, wobei sie in Methyl-allyl-sulfoxyd (I), N(CH₃)₃ und Wasser zerfiel:

¹⁾ H. Schmid & P. Karrer, *Helv.* **31**, 1087, 1497 (1948).²⁾ P. Karrer, E. Scheitlin & H. Siegrist, *Helv.* **33**, 1237 (1950).