

**Antithiamin-Wirkstoffe aus
Blattfiedern von *Pteridium aquilinum*
(L.) Kuhn**

VON DER
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
IN ZÜRICH

ZUR ERLANGUNG DER WÜRDE EINES
DOKTORS DER TECHNISCHEN WISSENSCHAFTEN

GENEHMIGTE
PROMOTIONSARBEIT

VORGELEGT VON

Anton Koller

dipl. Ing.-Chem. ETH
von Littau (Kt. Luzern)

Referent: Herr Prof. Dr. H. Deuel

Korreferent: Herr Prof. Dr. C. Martius

Zürich 1961

L. Speich, Reproduktionsanstalt, Brandschenkestraße 47/49

Meinen lieben Eltern gewidmet

Ich danke Herrn Prof. T. Wikén, ehemals Vorstand des Institutes für landwirtschaftliche Bakteriologie und Gärungsbiologie der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich, und Herrn Prof. Dr. H. Deuel, Vorstand des Agrikulturchemischen Institutes der Eidgenössischen Technischen Hochschule, für das grosse Interesse und die vielseitigen Anregungen, die zum Gelingen dieser Arbeit wesentlich beigetragen haben.

Herrn Dr. J. C. Somogyi, Direktor des Institutes für Ernährungsforschung, Rüslikon, danke ich für die anregenden Diskussionen und für das reiche Versuchsmaterial, das er mir zur Verfügung gestellt hat, sowie für die grosse Hilfe, die er mir bei der Durchführung dieser Arbeit erwiesen hat. Herrn Dr. R. Bach, Agrikulturchemisches Institut der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich, danke ich für die Unterstützung, die er mir bei der Abfassung und Korrektur dieser Arbeit erwiesen hat.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	2
3	Ergebnisse	7
31	Ausgangsmaterialien der Antithiamin-Wirkstoffe	7
32	Bestimmung der Aktivität der Antithiamin-Wirkstoffe	7
33	Reinigung der Antithiamin-Wirkstoffe	10
331	Behandlung mit Anionenaustauscherharzen	11
332	Behandlung mit Salzsäure	18
333	Chromatographische Methoden	24
334	Papierelektrophorese	25
335	Herstellung eines Brucinsalzes	26
336	Behandlung mit Kationenaustauscherharz	28
337	Zusammenfassung der Reinigungsversuche Schema der Reinigung der Antithiamin-Wirkstoffe aus Adlerfarnkraut und Bezeichnung der Präparate	31 35
34	Stabilität der Antithiamin-Wirkstoffe	36
341	Thermostabilität	36
342	Stabilität gegen Säure und Lauge	37
35	Wirkungsmechanismus der Antithiamin-Wirkstoffe	39
351	Einfluss der Mengenverhältnisse	39
352	Einfluss von Kochsalz	42
353	Einfluss von Luftsauerstoff	43
354	Versuche zur Spaltung der Thiamin-Antithiamin- Wirkstoff-"Additionsverbindung"	44
355	Einfluss von organischen Aminen	47
356	Aktivität von Verbindungen bekannter Konstitution	58
4	Diskussion	59
41	Ausgangsmaterialien der Antithiamin-Wirkstoffe	59
42	Bestimmung der Aktivität der Antithiamin-Wirkstoffe	59
43	Reinigung der Antithiamin-Wirkstoffe	60
44	Stabilität der Antithiamin-Wirkstoffe	62
45	Wirkungsmechanismus der Antithiamin-Wirkstoffe	63
5	Experimenteller Teil	67
51	Herstellung der Ausgangsmaterialien der Antithiamin- Wirkstoffe	67
52	Bestimmung der Aktivität der Antithiamin-Wirkstoffe	67
53	Reinigung der Antithiamin-Wirkstoffe	69
531	Behandlung mit Anionenaustauscherharzen	70
532	Behandlung mit Salzsäure	71
533	Chromatographische Methoden	73
534	Papierelektrophorese	75
535	Herstellung eines Brucinsalzes	75
536	Behandlung mit Kationenaustauscherharz	77

54	Bestimmung der Stabilität der Antithiamin-Wirkstoffe	77
541	Bestimmung der Thermostabilität	77
542	Bestimmung der Stabilität gegen Säure und Lauge	78
55	Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus der Antithiamin-Wirkstoffe	78
551	Bestimmung des Einflusses der Mengenverhältnisse	78
552	Bestimmung des Einflusses von Kochsalz	79
553	Bestimmung des Einflusses von Luftsauerstoff	80
554	Versuche zur Spaltung der Thiamin-Antithiamin-Wirkstoff-"Additionsverbindung"	80
555	Bestimmung des Einflusses von organischen Aminen	82
556	Bestimmung der Aktivität von Verbindungen bekannter Konstitution	84
	Zusammenfassung	85
	Summary	87
	Literatur	89

1 Einleitung

1936 hat Green an Silberföhsen, die mit rohen Karpfen gefüttert wurden, eine Krankheit beobachtet. Er vermutete (1937), dass es sich bei dieser Krankheit um eine Thiamin-Avitaminose handle. Als das synthetische Thiamin erhältlich war, bewiesen Green et al. (1941) die Richtigkeit dieser Vermutung. 1944 fanden Bhagvat und Devi als erste Antithiamin-Wirkstoffe in den Samen einiger Pflanzen (*Eleusine coracana*, *Phaseolus radiatus*, *Brassica juncea*, *Grossypium* sp., *Linum usitatissimum*). 1945 hat Ågren solche Wirkstoffe auch im Farnkraut (*Eupteris aquilina* L. = *Pteridium aquilinum* [L.] Kuhn) gefunden. Nach späteren Arbeiten (Haag, Weswig und Freed, 1947; Somogyi und von Muralt, 1949; Evans, Jones und Evans, 1950) gibt es darunter thermostabile und thermolabile Komponenten.

Nach Somogyi (1949 b) besitzt *Pteridium aquilinum* von allen Farnkraut-Arten die grösste Antithiamin-Wirkung. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb versucht, die Antithiamin-Wirkstoffe aus den Fiedern zweiter Ordnung der Blätter von *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn (Adlerfarnkraut) zu isolieren, ihre Aktivität und Stabilität zu bestimmen und Aufschluss über ihren Wirkungsmechanismus zu gewinnen.

Woolley (1941) extrahierte Eingeweide frischer Karpfen mit Kochsalzlösung. Der Extrakt inaktivierte Thiamin *in vitro* bei 37°C. Sealock, Livermore und Evans (1943) hielten den Wirkstoff für ein Enzym und nannten ihn "Thiaminase". Bonner und Buchmann (1938) hatten indessen schon früher ein Ferment aus Erbsenwurzeln, das Thiamin aus dem Pyrimidin- und Thiazolanteil aufbaut, mit "Thiaminase" bezeichnet. Somogyi und von Muralt (1949) schlugen für die Wirkstoffe, die Thiamin (Aneurin) inaktivieren, den Namen "Antianeurin-Faktoren" vor. Krampitz und Woolley (1944) zeigten, dass Thiamin durch Karpfeneingeweide-Extrakt in die Thiazol- und Pyrimidin-Komponente gespalten wird. Nach Sealock und Goodland (1944) hemmt Kupfer die Inaktivierung des Thiamins durch Karpfeneingeweide-Extrakt. Mangan vermag dagegen nach Reddy, Giri und Das (1948) die Thiamin-Inaktivierung durch die "Thiaminase" der Süßwassermuschel zu fördern. Sealock und Livermore (1949) haben mitgeteilt, dass *m*-Aminobenzylthiazolium-Salze die durch Fisch-"Thiaminase" verursachte Spaltung des Thiamins um 17,5 bis 50 % erhöhten. Ortho- und para-Verbindungen sollen die Spaltung des Thiamins dagegen hemmen. Nach Sealock und Davis (1949) fördern auch andere organische Amine, wie *m*-Nitroanilin und *m*-Aminobenzoesäure, die Thiamin-Inaktivierung durch die Fisch-"Thiaminase". Nach Reddy, Giri und Das (1948) sowie nach Somogyi (1949b) sind im Karpfeneingeweide-Extrakt zwei Wirkstoffe enthalten, die Thiamin inaktivieren. Yudkin (1949) berichtete sogar von drei "Thiaminasen". Übereinstimmend teilten alle Autoren mit, dass die Antithiamin-Wirkstoffe aus Karpfeneingeweide-Extrakt thermolabil sind. Somogyi (1950) fand auch in den Eingeweiden von Kaninchen und Hühnern Stoffe mit einer gewissen Antithiamin-Wirkung. Sie sind thermolabil und nicht dialysierbar, was Bär (1952) bestätigt hat. Matsukawa und Misawa (1949, 1950), Kimura und Aoyama (1951), Kimura und Liao (1952, 1953) und Fujita, Nose und Kuratani (1954) fanden Antithiamin-Wirkstoffe auch in drei Arten von Darmbakterien.

Ågren (1945) hat erstmals Antithiamin-Wirkstoffe pflanzlichen Ursprungs zu isolieren versucht. Er extrahierte *Populus tremula* L. (Espenblätter) und erhielt die gereinigten Antithiamin-Wirkstoffe als "nicht-kristalline" Substanz, die frei von Stickstoff, Phosphor und Schwefel war. Evans,

Jones und Evans (1950) konnten in *Equisetum arvense* Antithiamin-Wirkstoffe nachweisen. Forenbacher (1950, 1952) beobachtete an Pferden, die mit Heu, das 5 bis 50 % *Equisetum* enthielt, gefüttert wurden, eine Thiamin-Avitaminose.

Weswig, Freed und Haag führten 1946 erstmals "in vivo" - Versuche mit *Pteridium aquilinum* durch. Bei der Verfütterung von 40 % Farnkraut der Gesamtration nahmen die Versuchstiere (Ratten) während 10 Tagen noch zu und magerten in den folgenden 10 Tagen bis zur vollständigen Auszehrung ab. Durch grosse Dosen Thiamin (0,5 mg pro Tag) wurden die Tiere innert 14 Tagen wieder hergestellt. Diese Ergebnisse wurden von Haag, Weswig und Freed (1947), sowie von Thomas und Walker (1949) bestätigt. Bei der Verfütterung von *Pteridium aquilinum* zeigen sich bei Ratten (Roberts, Evans und Evans, 1949) und Pferden (Evans, W. C. und E. T. R. Evans, 1949; Evans, Evans und Roberts, 1951) ähnliche Symptome: Appetitlosigkeit, Gewichtsabnahme, erhöhte, unregelmässige Herzschläge, erhöhte Temperatur, stark erhöhter Brenztraubensäure- und niedriger Thiamin-Gehalt des Blutes. Während die Ratten innert 30 Tagen nach dem Beginn der Farnkraut-Diät sterben, zeigen die Pferde Lähmungserscheinungen, beginnen stark zu schwanken und leiden an Nasenbluten. Durch eine Thiamin-Therapie kann der Appetit von Ratte und Pferd wieder angeregt und der Nährzustand verbessert werden. Evans, E. T. R. und W. C. Evans (1949) glaubten, dass die sogenannte "Tannin-Fraktion" des Farnkrautes eine antagonistische Rolle gegenüber dem Thiamin spiele. Die Tatsache, dass das Nasenbluten bei Pferden (Evans, W. C. und E. T. R. Evans, 1949) und die durch Farnkrautpulver erzeugte Erkrankung bei Katzen (Evans, Evans und Hughes, 1954) durch Thiamin-Gaben nicht vollständig geheilt werden konnte, führte zur Annahme, dass die Antithiamin-Wirkstoffe für die Erkrankung nicht allein verantwortlich seien. In der Schweiz ist die mit "Blutharnen" verbundene "Romooserkrankheit" des Rindes in Gegenden bekannt, wo oft Farnkraut als Streue verwendet wird (Romoos, Napfgebiet, Emmental). Sieber (1950) fand in den Futterpflanzen der fraglichen Gegenden sowie im Harn von kranken Tieren eine gewisse Antithiamin-Wirkung. Hess (1950) führte Heilungsversuche mit Thiamin und mit verschiedenen Hefepräparaten durch. Er fand dabei eine Abnahme der Anämie und Konsolidierung des Nährzustandes. Das "Blutharnen" liess jedoch nicht oder nur vorübergehen nach.

Jacobsohn (1948) berichtete von einem thermolabilen Antithiamin-Wirkstoff in *Pteridium aquilinum*, Somogyi und von Muralt (1949) von thermostabilen Antithiamin-Wirkstoffen, deren Hauptteil die Dialysiermembran passierte. Somogyi (1949 b) fand, dass *Pteridium aquilinum* die grösste Antithiamin-Wirkung zeigt, gefolgt von *Aspidium filix mas*, *Nephrolepsis exaltata* und *Dryopteris austriaca*. Bönicke (1953) und Fujita, Okamoto und Nose (1955) haben die Thermostabilität der Antithiamin-Wirkstoffe aus *Pteridium aquilinum* ebenfalls bestätigt. Nach Haag, Weswig und Freed (1947) sind die Antithiamin-Wirkstoffe aus *Pteridium aquilinum* in getrocknetem Zustand thermostabil. In wässrigen Lösungen verlieren sie jedoch ihre Aktivität. Haag et al. berichteten ferner, dass diese Wirkstoffe in Äther, Petroläther, Aceton und Äthanol unlöslich sind.

Evans, Jones und Evans (1950) extrahierten ein thermolabiles Antithiamin-Präparat aus *Pteridium aquilinum* mit Chloroform - Wasser bei 0°C. 1952 teilten Evans und Jones mit, dass sich ein wässriger Extrakt von *Pteridium aquilinum* durch Dialyse in einen thermostabilen und einen thermolabilen Anteil trennen lasse. Beide Anteile sollen für die Antithiamin-Wirkung wichtig sein. Der thermostabile Anteil könne durch *m*-Aminobenzoesäure und 5-Aminosalicylsäure ersetzt werden. Watkin, Thomas und Evans (1953) bestätigten diese Versuche. Thomas, Watkin und Evans (1955) trennten einen wässrigen Extrakt aus *Pteridium aquilinum* durch isoelektrische Fällung bei pH 3 in einen Protein- und einen Nichtprotein-Anteil. Schafe, die mit dem Nichtprotein-Anteil gefüttert wurden, erkrankten unter ähnlichen Symptomen, wie sie auch bei Katzen auftraten, die *Pteridium aquilinum*-Pulver erhielten. Nach Somogyi (1951) wandern die wasserlöslichen Antithiamin-Wirkstoffe aus *Pteridium aquilinum* im elektrischen Feld anodisch. Nach Fujita, Okamoto und Nose (1955) ist die Antithiamin-Wirkung des Extraktes aus *Pteridium aquilinum* von der Temperatur und vom pH abhängig. 80 % der Aktivität bleibt auch bei mehrstündigem Kochen erhalten. Hasegawa (1955) isolierte aus Farnkraut, dessen Art nicht publiziert wurde, einen thermostabilen Antithiamin-Wirkstoff. Sein UV-Spektrum soll mit dem des Astragalins gut übereinstimmen, während die IR-Spektren, die Schmelzpunkte, die Mikroanalysen und die Rf-Werte Differenzen aufweisen. Von einem ähnlichen Antithiamin-Wirkstoff aus Farnkraut berichtete auch Nakabayashi (1955).

Fujita, Nose, Kozuka, Tashiro, Ueda und Sakamoto (1952) und Fujita (1954) untersuchten die Wirkung einer grössern Anzahl aromatischer und heterocyklischer Amine auf die Thiamin-Inaktivierung durch *Pteridium aquilinum*. Anilin und Pyridin förderten die Thiamin-Inaktivierung am stärksten.

Kenten (1957 a, 1957 b) reinigte einen wässrigen Extrakt von *Pteridium aquilinum* durch Fällung mit Ammoniumsulfat und Fraktionierung an Kalziumphosphat-Gel. Nach Kenten wirkt der thermolabile Antithiamin-Wirkstoff als Katalysator bei der Bildung von Heteropyrithiamin aus Thiamin und einem Überschuss an Pyridin. Hasegawa, Tamaki, Tanaka und Fujita (1957) isolierten aus einem Gemisch von Thiamin und Rutin (3-Rhamnoglucosid des Quercetins) "Rutinothiamin". Dieses soll ein "Disulfid-Typ" des Thiamins mit physiologischer Thiamin-Wirkung sein.

Nach Weakley, Eldridge und McKinney (1958) findet sich in *Eleusine coracana* ein thermostabiler Antithiamin-Wirkstoff, wie von Bhagvat und Devi (1944) mitgeteilt, nicht aber in *Glycine hispida* (Soja). Nach der Zugabe vom Dinatriumsalz der Äthylendiamintetraessigsäure (Komplexon III) oder bei Ausschluss des Luftsauerstoffes konnte keine Antithiamin-Aktivität von Sojabohnen-Präparaten mehr festgestellt werden. Die "scheinbare" Antithiamin-Wirkung von Sojabohnen-Präparaten muss auf eine durch Metalle katalysierte Oxydation des Thiamins zurückgeführt werden. Nakabayashi (1957) isolierte aus *Equisetum arvense* zwei thermostabile Substanzen, die Thiamin inaktivieren, Pentahydroxyanthrachinon und sein Glucosid. Sakamoto und Fujita (1956) isolierten aus den Blättern von *Ipomoea Batata* (Süßkartoffeln) durch Extraktion mit Methanol einen Antithiamin-Wirkstoff, den sie als Isoquercitrin identifizierten.

Agren (1946) fand, dass viele Phenole eine gewisse Antithiamin-Wirkung besitzen, während Äther inaktiv zu sein scheinen. Hasegawa (1955) und Hasegawa, Sakamoto, Nagayama und Fujita (1956) untersuchten eine Reihe von Flavonoiden und Phenolen auf ihre Antithiamin-Wirkung. Die grössten Aktivitäten unter den Flavonoiden wurden bei den 2-(3', 4'-Dioxyphenyl)-benzo- γ -pyron-Derivaten gefunden. Von den freien Phenolen zeigte das Brenzkatechin die grösste Antithiamin-Wirkung. Die Aktivitäten dieser Substanzen waren aber nicht proportional zu ihren Konzentrationen. Horwitt (1959) stellt in seiner zusammenfassenden Arbeit fest, dass unter den Antithiamin-

Wirkstoffen Flavonoide, Phenole und Tannine vorkommen.

Fujiwara und Watanabe (1952) beschrieben eine Verbindung, das Allithiamin, das aus Extrakten von *Allium sativum* und Thiamin entsteht. Das Allithiamin ergibt bei direkter Oxydation kein Thiochrom. Ebenso reagiert es mit diazotiertem p-Aminoacetophenon nicht. Diese Reaktionen verlaufen aber positiv, wenn das Allithiamin vorher mit Cystein oder Natriumhydro-sulfit reduziert wurde. Das Allithiamin hat die gleiche physiologische Wirkung wie das Thiamin. Seine Struktur wurde von Matsukawa und Yurugi (1952) abgeklärt. Matsukawa, Yurugi und Matsuoka (1953) sowie Matsukawa, Kawasaki, Iwatsu und Yurugi (1954) stellten mit Thiamin und andern *Allium*-Arten auch Homologe des Allithiamins her. Diese Homologen konnten mit synthetischen Verbindungen identifiziert werden.

3 Ergebnisse

31 Ausgangsmaterialien der Antithiamin-Wirkstoffe

Die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden mit Adlerfarn, *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn (= *Pteris aquilina*, *Eupteris aquilina*), der von Mitte bis Ende August bei Trubschachen im Emmental (Kanton Bern) geerntet worden war, durchgeführt. Von den Fiedern zweiter Ordnung der getrockneten Farnkrautblätter wurde ein wässriger Extrakt, Präparat I A¹⁾, hergestellt. Für einige Versuche wurde Präparat I A dialysiert. Daraus wurden Präparat I B (dialysierbarer Anteil) und Präparat I C (nicht-dialysierbarer Anteil) erhalten.

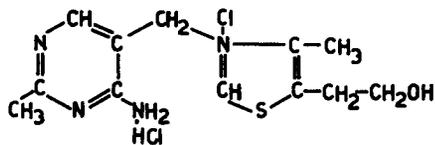
32 Bestimmung der Aktivität der Antithiamin-Wirkstoffe

Die Aktivität der Antithiamin-Wirkstoffe wurde hauptsächlich mit der Thiochrom-Methode, in einigen Kontroll-Versuchen auch mit der Melnick-Field-Methode, bestimmt.

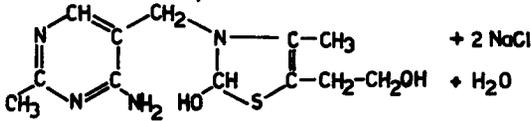
Bei der Thiamin-Bestimmung nach der Thiochrom-Methode wird das Thiamin in alkalischer Lösung von Kaliumferricyanid zu Thiochrom oxydiert, das intensiv blau fluoresziert. Nach Jansen (1936, 1938) wird das Thiochrom mit Isobutanol ausgeschüttelt, dessen Fluoreszenz gemessen und daraus die Thiamin-Menge berechnet.

Der genaue Mechanismus der Oxydation des Thiamins zum Thiochrom ist noch nicht abgeklärt. Gstirner (1951) gibt in seinem Buch folgenden möglichen Verlauf an: Das Thiaminchloridhydrochlorid wird zunächst durch die Lauge über das Thiaminchlorid und das N-Thiazoliumhydroxyd in die Pseudobase überführt; deren alkoholische Hydroxylgruppe wird mit Kaliumferricyanid zum Keton oxydiert, das mit der Aminogruppe des Pyrimidins einen Ring schliesst.

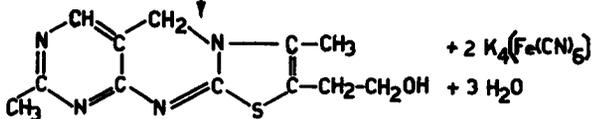
1) Schema der Reinigung der Antithiamin-Wirkstoffe und Bezeichnung der Präparate siehe Abschnitt 337, Seite 35.



Thiaminchlorid-hydrochlorid



Pseudobase



Thiochrom

Nach Peters und O'Brien (1955) bilden sich als erste Oxydationsprodukte Thiaminsulfid und Thiamindiazolan; in einer zweiten Stufe erfolgt dann Cyclisierung mit der 4-Aminogruppe, Spaltung des Disulfids in 2 Thiol-Radikale und intramolekulare Umlagerung zu Dihydrothiochrom, das rasch durch Luftsauerstoff zu Thiochrom oxydiert wird.

In den vorliegenden Versuchen wurden die Thiamin-Bestimmungen nach der von von Fellenberg (1942) verbesserten und von Somogyi (1949 c) standardisierten Thiochrom-Methode durchgeführt. Die Fluoreszenz wurde mit einem Fluorimeter, das aus einem Beckman-Kolorimeter (Modell C) entwickelt wurde, bestimmt (siehe Fig. 1). Das Fluorimeter wurde vor jeder Bestimmungsreihe mit Testlösungen bekannter Konzentrationen geeicht.

Zur Thiamin-Bestimmung wurden verschiedene kolorimetrische Methoden ausgearbeitet, die auf der Bildung von Azokörpern mit Thiamin beruhen. Prebluda und McCollum (1939) beschrieben die Bildung eines wasserun-

löslichen Farbstoffes des Thiamins mit diazotiertem *p*-Aminoacetophenon. Die Melnick-Field-Methode (1939) basiert auf dieser Azo-Farbreaktion. Auerbach (1940) sowie Ballard und Ballard (1949) haben die Methode noch modifiziert und vereinfacht. Die Intensität der Farbe wird in einem Beckman-Spektrophotometer DU bei 520 $m\mu$ gemessen. Den Wert der Extinktion *E* rechnet man mit Hilfe einer Eichkurve in Thiamin um.

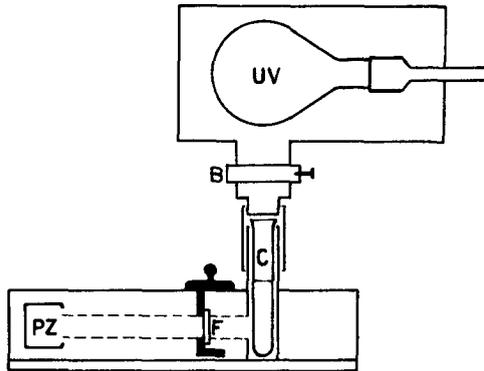


Fig. 1 Schnitt durch das Fluorimeter

UV = Philips-UV-Lampe
 HPW, 125 W, Typ 57202 E/70
 B = Blende
 C = Küvette mit Messlösung
 F = Blaufilter
 PZ = Photozelle

Der Thiamingehalt eines Substrates kann auch durch mikrobiologische Bestimmungen mit thiaminheterotrophen Pilzen ermittelt werden (Schopfer, 1949). Bei im übrigen optimaler Nährstoffversorgung hängt das Wachstum dieser Pilze direkt von der Thiaminversorgung ab. Aus dem Myzelwachstum in Mess- und Vergleichslösungen kann man daher direkt auf den Thiamingehalt der Messlösung schliessen. Schopfer (1949) und Bönicke (1953) ¹⁾ haben mit *Phycomyces Blakesleanus* gearbeitet, Hoff-Jørgensen und Hansen (1955) sowie später auch Bönicke (1959) mit *Kloeckera brevis*.

Die Antithiamin-Wirkung der verschiedenen Präparate wurde je nach

1) Die in dieser Arbeit erwähnten mikrobiologischen Bestimmungen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. R. Bönicke, Tuberkulose-Forschungs-Institut, Borstel, ü/Bad Oldesloe, Deutschland, durchgeführt. Ich danke ihm dafür bestens.

Versuch auf verschiedene Art angegeben. Die Aktivität eines Präparates gibt an wieviele Prozent des vorgelegten Thiamins durch das Präparat inaktiviert worden sind. "Aktivität" ist die allgemeinste Bezeichnung der Grösse der Antithiamin-Wirkung. Sie wurde stets von einer bestimmten Menge eines Antithiamin-Präparates vor und nach einer Behandlung der Antithiamin-Wirkstoffe bestimmt.

Die spezifische Aktivität (γ/mg), die am häufigsten verwendete Angabe der Grösse der Antithiamin-Wirkung, ist gleich der Menge Thiamin in γ die durch 1 mg Antithiamin-Präparat inaktiviert wird. Diese Inaktivierungsversuche wurden mit 3, 6 mg Antithiamin-Präparat und 100 γ Thiamin in 20 ml Versuchsgemisch, oder mit Bruchteilen davon, durchgeführt.

Die Halbwert-Menge (mg) ist gleich der Menge eines Antithiamin-Präparates, die von einer Vorlage von 100 γ Thiamin in 20 ml Versuchsgemisch 50 γ zu inaktivieren vermag. Die Halbwert-Mengen wurden mit "Inaktivierungskurven" berechnet, die durch 4 bis 5 Inaktivierungsversuche mit verschiedenen Mengen Antithiamin-Präparat aufgenommen worden waren. Die Halbwert-Aktivität ist gleich dem reziproken Wert der Halbwert-Menge. Eine ähnliche Aktivitäts-Bestimmung haben schon Matsukawa und Kawakami (1955) sowie Hasegawa, Sakamoto, Nagayama und Fujita (1956) vorgeschlagen.

Die gesamte Aktivität (γ) eines Antithiamin-Präparates oder einer Fraktion ist das Produkt seiner spezifischen Aktivität (γ/mg) mal Menge Trockensubstanz (mg).

33 Reinigung der Antithiamin-Wirkstoffe

Ein Schema der Reinigung der Antithiamin-Wirkstoffe und ein Verzeichnis der Präparate finden sich im Abschnitt 337, Seite 35.

Die Aktivitäten der Präparate I A, I B und I C vor und nach der Behandlung mit Kationenaustauscher Amberlite IRC-50 in der H-Form sind in Tab. 1 zusammengestellt. Die Vorlage betrug jeweils 100 γ Thiamin in 20 ml Gesamtvolumen.

Die Aktivität der Präparate I A, I B und I C wurde durch die Behandlung mit Kationenaustauscher praktisch nicht verändert.

Tab. 1 Aktivität der Präparate I A, I B und I C vor und nach der Behandlung mit Kationenaustauscher

Vorlage: 100 γ Thiamin; Gesamtvolumen: 20 ml

Präparat	Aktivität	
	vor der Behandlung des Präparates mit Kationenaustauscher	nach der Behandlung des Präparates mit Kationenaustauscher
	%	%
I A 0,75 ml	69	62
I B 5,0 ml	84	77
I C 3,0 ml	78	83

331 Behandlung mit Anionenaustauscherharzen

Da die Antithiamin-Wirkstoffe im elektrischen Feld anodisch wandern (Somogyi, 1951) und die Aktivitäten der Präparate I A, I B und I C vor und nach der Behandlung mit Kationenaustauscher gleich gross sind, darf angenommen werden, dass die Wirkstoffe Säuren sind. Es wurde deshalb versucht, die Wirkstoffe mit Anionenaustauscher aus dem Extrakt abzutrennen. Die Anionenaustauscher wurden für diese Versuche, ähnlich wie es Derungs und Deuel (1954) für die Trennung von Oligogalakturonsäuren vorgeschlagen haben, in der Formiatform angewendet. Die an den Anionenaustauschern adsorbierten Wirkstoffe wurden mit Ameisensäure steigender Konzentration eluiert (Somogyi und Koller, 1959, Somogyi, 1960).

Es wurden Versuche mit den stark basischen Anionenaustauschern Amberlite IR-4B und Dowex 1-x4, beide in der Formiatform, und mit dem schwach basischen Anionenaustauscher Dowex-3 in der Formiatform durchgeführt. Die Ionenaustauscher wurden mit metallionenfreiem Präparat I A 14 Std. ausgeschüttelt, mit Wasser gewaschen und über unbeladenen Ionenaustauscher geschichtet. An Amberlite IR-4B wurden 25 bis 26 % der Trockensubstanz vom metallionenfreien Präparat I A absorbiert, an Dowex-3 und Dowex 1-x4 über 30 %. Die an den Anionenaustauschern adsorbierten Wirkstoffe wurden mit 0,5-n., 1,0-n., 5-n. und 10-n. Ameisensäure eluiert (Somogyi und Koller,

1959). Die Aktivität der Eluate aus der Säule mit Amberlite IR-4B war am kleinsten; Amberlite IR-4B war für diese Versuche also ungeeignet. Die Resultate je eines Versuches mit Dowex 1-x4 und Dowex-3 sind aus Fig. 2 ersichtlich, in der der Trockensubstanzgehalt (= eluierte Menge, Fig. 2a), die spezifische Aktivität (Fig. 2b) und die gesamte Aktivität (Fig. 2c) jeder Fraktion dargestellt ist.

Bei der Fraktionierung des Antithiamin-Präparates I A an Dowex 1-x4 wurden mit 0,5-n. Ameisensäure sehr grosse Mengen aber mit kleiner spezifischer Aktivität eluiert. Die gesamte Aktivität dieser Fraktionen war ziemlich gross. Mit 1-n. Ameisensäure wurden nur sehr kleine Mengen mit kleiner spezifischer Aktivität und kleiner gesamter Aktivität eluiert. Mit 5-n. Ameisensäure wurden kleine Mengen eluiert; die spezifische Aktivität dieser Fraktion war gross, die gesamte Aktivität aber ziemlich klein. Auch mit 10-n. Ameisensäure wurden ziemlich kleine Mengen des Antithiamin-Präparates eluiert. Diese hatten eine mittelmässige bis kleine spezifische Aktivität, und ihre gesamte Aktivität war klein.

Bei der Fraktionierung des Antithiamin-Präparates I A an Dowex-3 wurden mit 0,5-n. und 1-n. Ameisensäure ziemlich grosse Mengen des Präparates aber mit kleiner spezifischer Aktivität und kleiner gesamter Aktivität eluiert. Mit 5-n. Ameisensäure wurden auch noch ziemlich grosse Mengen des Antithiamin-Präparates eluiert → Präparat III A. Die spezifische Aktivität dieser Fraktion war gross, die gesamte Aktivität weitaus am grössten von allen Fraktionen. Mit 10-n. Ameisensäure wurden nur noch kleine Mengen des Antithiamin-Präparates eluiert → Präparat III B. Dieses hatte eine grosse spezifische Aktivität, doch war die gesamte Aktivität klein.

Nach diesen Versuchen ist Dowex-3 für die Reinigung der Antithiamin-Wirkstoffe aus Farnkraut geeigneter.

Durch fortgesetzte Fraktionierung der Antithiamin-Wirkstoffe an Dowex-3, in der Formiatform, mit 0,5-n. und 1-n. Ameisensäure wurde versucht, die Fraktionen mit geringer spezifischer Aktivität noch schärfer abzutrennen und dadurch die Antithiamin-Präparate noch weiter zu reinigen. Wie aus Fig. 3 hervorgeht, nahmen die mit 0,5-n. Ameisensäure eluierten Mengen zuerst rasch und dann nur noch langsam ab, während die spezifische Aktivität

Leer - Vide - Empty

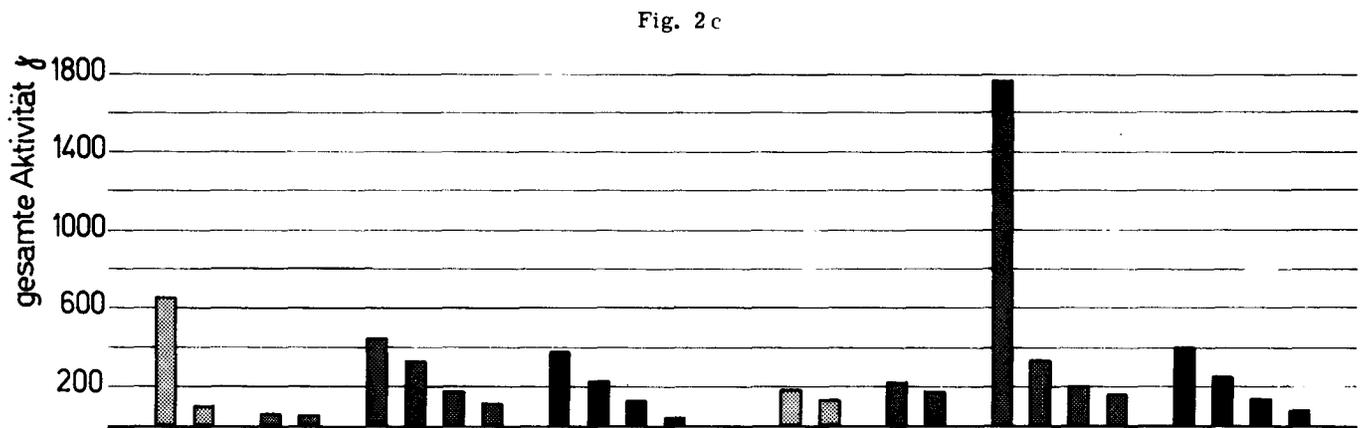
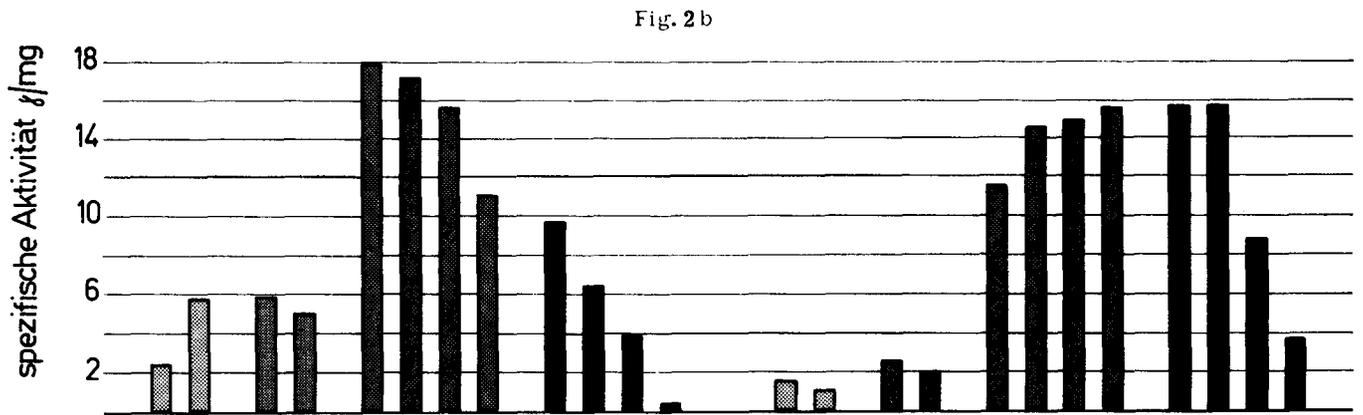
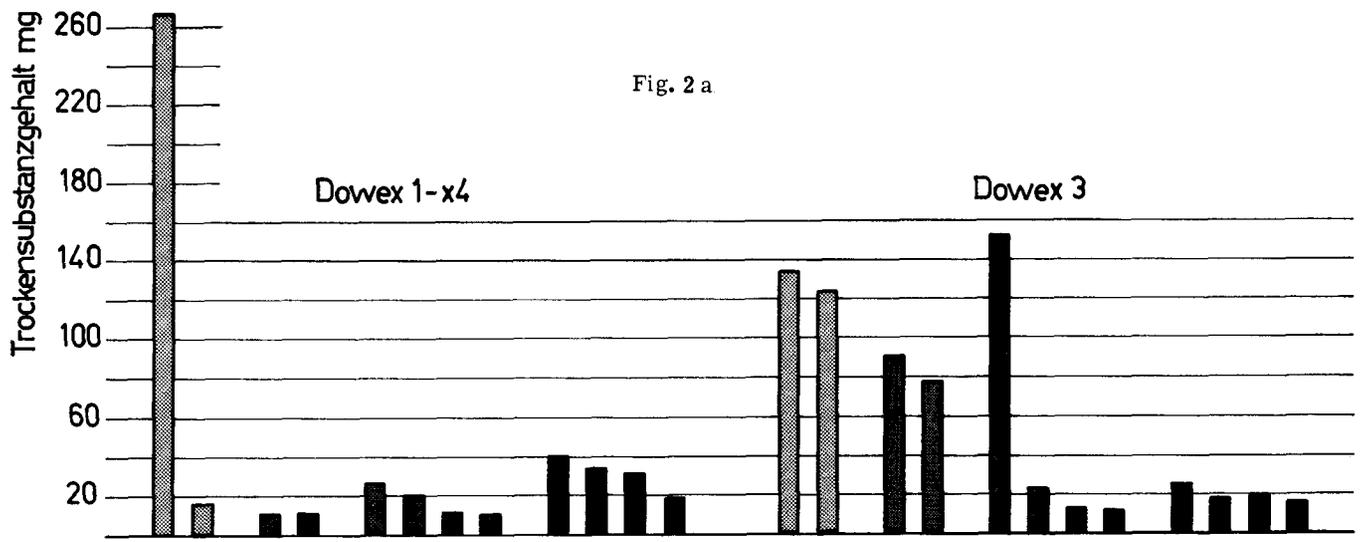


Fig. 2 Fraktionierung des Präparates I A an Anionenaustauschersäule durch Elution mit Ameisensäure steigender Konzentration

- a Trockensubstanzgehalt der Fraktionen
- b Spezifische Aktivität der Fraktionen
- c Gesamte Aktivität der Fraktionen

200 ml Präparat I A; 40 ml Dowex 1-x 4 bzw. Dowex-3 in der Formiatform;
Elution in Fraktionen von je 500 ml;

Fraktionen eluiert mit

	0,5-n. HCOOH		5-n. HCOOH
	1,0-n. HCOOH		10-n. HCOOH

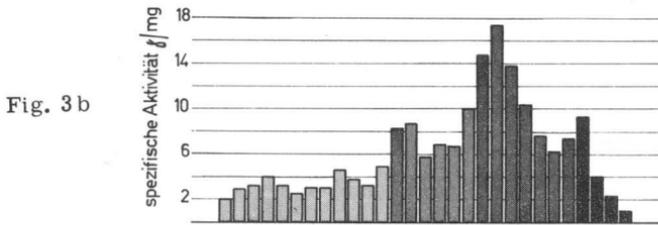
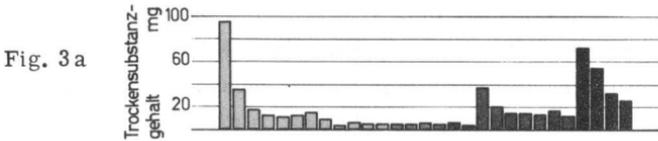


Fig. 3 Fraktionierung des Präparates I A an einer Dowex-3-Anionenaustauschersäule durch fortgesetzte Elution mit Ameisensäure steigender Konzentration

- a Trockensubstanzgehalt der Fraktionen
- b Spezifische Aktivität der Fraktionen

100 ml Präparat IA; 20 ml Dowex-3 in der Formiatform; Elution in Fraktionen von je 500 ml;

Fractionen eluiert mit 0,5-n. HCOOH 5-n. HCOOH
 1,0-n. HCOOH 10-n. HCOOH

von Anfang an klein war, aber eher etwas anstieg. Wurde nach der 12. Fraktion (6 l 0,5-n. Ameisensäure) auf 1-n. Ameisensäure umgestellt, so nahm die eluierte Menge pro Fraktion nicht zu, wohl aber die spezifische Aktivität. Mit 5-n. Ameisensäure wurden nur kleine Mengen des Präparates III A eluiert. Die spezifische Aktivität des Präparates III A war gross, fiel aber nach der zweiten Fraktion stark ab. Das mit 10-n. Ameisensäure eluierte Präparat III B hatte nur noch eine kleine spezifische Aktivität.

Nach diesen Ergebnissen wurde die Elution in den weitem Versuchen wie folgt standardisiert:

2 Fraktionen zu 500 ml	0,5-n. Ameisensäure	
2 Fraktionen zu 500 ml	1,0-n. Ameisensäure	
4 Fraktionen zu 500 ml	5,0-n. Ameisensäure	→ Präparat III A
4 Fraktionen zu 500 ml	10,0-n. Ameisensäure	→ Präparat III B

Versuche mit metallionfreien Präparaten I A, I B und I C führten genau zu den gleichen Ergebnissen. Für die weitem Versuche wurde deshalb ausschliesslich Präparat I A verwendet.

Wurden die Präparate III A und III B wieder vereinigt und erneut an frischem Dowex-3 in der Formiatform adsorbiert, so wurde durch eine zweite Elution die spezifische Aktivität nochmals erhöht (Fig. 4).

Auch bei der zweiten Elution konnten mit 0,5-n. und 1-n. Ameisensäure wieder kleine Mengen Wirkstoffe eluiert werden. Diese zeigten aber eine bedeutend höhere spezifische Aktivität als die entsprechenden Fraktionen der ersten Elution. Mit 5-n. und 10-n. Ameisensäure wurden ähnliche Mengen Wirkstoffe eluiert wie bei der ersten Elution (vgl. Fig. 2). Die spezifische Aktivität der mit 5-n. und der ersten Portion 10-n. Ameisensäure eluierten Wirkstoff-Fractionen war etwas höher als bei der ersten Elution, ebenso die gesamte Aktivität.

Die bisher beschriebenen Versuche zur Fraktionierung der Wirkstoffe an Anionenaustauschersäule wurden mit 1,8 cm weiten und 20 cm langen Perkolationsröhren durchgeführt. Die Kapazität dieser Säulen ist sehr gering. Für die Fraktionierung grösserer Mengen Wirkstoffe wurde eine 8,7 cm dicke und 50 cm lange Säule benutzt. Aus dem Präparat I A wurden die metallischen

Fig. 4 a

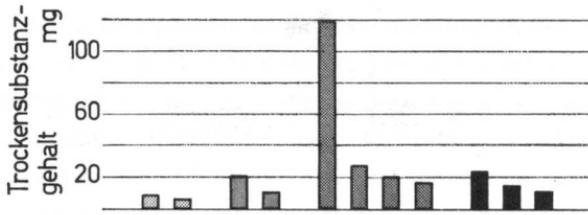


Fig. 4 b

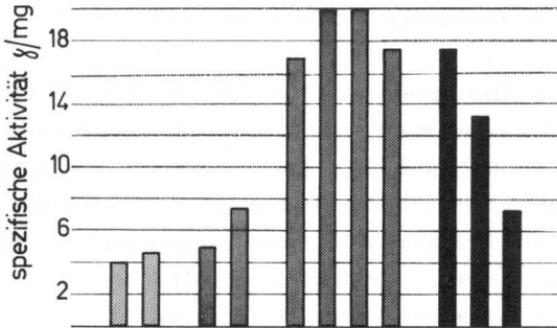


Fig. 4 c

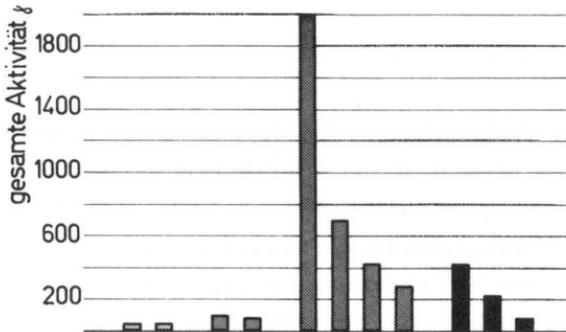


Fig. 4

Wiederholte Fraktionierung der Präparate III A und B an Dowex-3-Anionenaustauschersäule durch Elution mit Ameisensäure steigender Konzentration

- a Trockensubstanzgehalt der Fraktionen
- b Spezifische Aktivität der Fraktionen
- c Gesamte Aktivität der Fraktionen

280 mg Präparat III A + III B; spezifische Aktivität: 14,9 μ /mg; 10 ml Dowex-3 in der Formiatform; Elution in Fraktionen von je 500 ml;

Fractionen eluiert mit 0,5-n. HCOOH 5-n. HCOOH
 1,0-n. HCOOH 10-n. HCOOH

Kationen vor der Perkolation nicht mehr entfernt, da sie die Aktivität der Wirkstoffe nicht beeinflussen (vgl. Seite 11). Dagegen wurden die Trübstoffe aus dem Präparat I A mit Ameisensäure bei pH 3,5 ausgefällt und mit Celite abfiltriert, wobei eine klare Lösung, Präparat II, erhalten wurde. Die mit 0,5-n. und 1-n. Ameisensäure eluierten Fraktionen wurden verworfen. Bei den grossen Ansätzen waren die Mengen etwa 75-mal grösser als bei den kleinen Ansätzen. Zum Vergleich wurden die Ergebnisse der Fraktionierung mit den grossen Ansätzen durch 75 dividiert (Fig. 5).

Mit 5-n. Ameisensäure wurde in der ersten Portion etwas weniger, in den folgenden etwas mehr vom Präparat III A eluiert als beim kleinen Ansatz (Fig. 2, rechts), mit 10-n. Ameisensäure wurde in allen Portionen mehr Präparat III B eluiert. Die spezifische Aktivität des Präparates III A war kleiner, jene des Präparates III B war grösser als beim kleinen Ansatz; sie war auch grösser als jene des Präparates III A beim grossen Ansatz. Die gesamte Aktivität des Präparates III A und des Präparates III B war im grossen Ansatz annähernd gleich (2520 bzw. 2390 γ).

332 Behandlung mit Salzsäure

Von den Untersuchungen der Stabilität gegen Säure und Lauge (Abschnitt 342) war bekannt, dass die Antithiamin-Wirkstoffe aus Farnkraut gegen Lauge labil, gegen Säure aber sehr stabil sind. Es wurde deshalb versucht, die Antithiamin-Wirkstoffe nach einer Behandlung mit 1-n. Salzsäure während 3 Std. bei 100° C weiter zu reinigen. Dazu wurden Präparat III A und III B, sowie beide zusammen verwendet. Nach der Säurebehandlung wurden die Reaktionslösungen am Vakuum eingeeengt. Der Trockenrückstand wurde in Wasser aufgenommen. Dabei blieb ein unlöslicher, inaktiver Rückstand, der abfiltriert wurde. Der Wasserauszug wies eine bedeutende Antithiamin-Aktivität auf. Die Wirkstoffe, die vor der Behandlung mit Salzsäure ätherunlöslich waren, konnten mit Äther extrahiert werden \rightarrow Präparat IV, während im Wasser eine Fraktion mit einer sehr geringen Aktivität zurückblieb \rightarrow Präparat IV A. Eine ätherische Lösung von Präparat IV wurde nacheinander mit Natriumbikarbonat, \rightarrow Präparat V, bzw. Soda, \rightarrow Präparat V A, ausgezogen, wobei ein Ätherrückstand, \rightarrow Präparat V B, erhalten wurde. Die Mengen und spezifischen Aktivitäten der einzelnen Fraktionen eines Versuches aus einer Versuchsreihe von über 20 ähnlich verlaufenen

Fig. 5 a

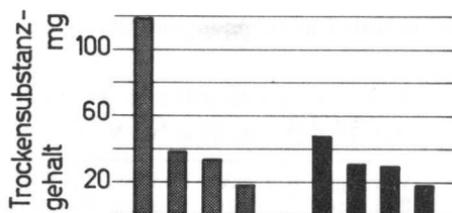


Fig. 5 b

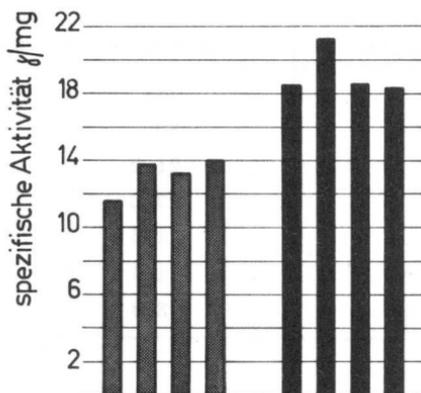
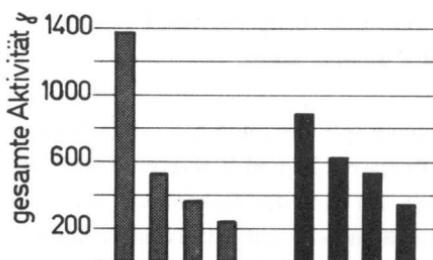


Fig. 5 c



- Fig. 5 Fraktionierung des Präparates II an einer Dowex-3-Anionenaustauschersäule durch Elution mit Ameisensäure steigender Konzentration im Grossversuch
- a Trockensubstanzgehalt der Fraktionen
- b Spezifische Aktivität der Fraktionen
- c Gesamte Aktivität der Fraktionen

Präparat II, hergestellt aus 8 000 ml Präparat I A;
3 000 ml Dowex-3 in der Formiatform; Elution in
Fraktionen von je 3 000 ml;

Fraktionen eluiert mit 5-n. HCOOH 10-n. HCOOH

Werte dividiert durch 75 (= umgerechnet auf Versuch
mit 40 ml Anionenaustauscher; vgl. Fig. 2)

Experimenten sind in Tab. 2 zusammengestellt.

Tab. 2 Ausbeute und spezifische Aktivität
der Fraktionen III B bis V

Vorlage: 100 bzw. 50 bzw. 25 γ Thiamin;
3,6 bzw. 1,8 bzw. 0,9 mg Präparat;
Gesamtvolumen: 20 bzw. 10 bzw. 5 ml

Präparat	Ausbeute	spezifische Aktivität
	mg	γ /mg
III B	80	20,5
IV A	21,2	7,3
IV	27,6	24,6
V	11,5	25,5
V A	1,1	3,8
V B	3,4	2,8

Die spezifische Aktivität von Präparat IV bzw. V war 20 bzw. 24 % grösser als jene von Präparat III B; die von Präparat IV A war klein und die von Präparat V A und V B sehr klein.

Die Behandlung mit 2-n. und 6-n. Salzsäure ergab ähnliche Resultate. Die Ausbeute an Präparat IV und V war nach der Behandlung mit 1-n. Salzsäure etwas besser als nach der Behandlung mit 6-n. Salzsäure, während die spezifischen Aktivitäten sehr gut miteinander übereinstimmten.

Die Präparate III A, III B, IV, IV A, V, V A und V B wurden papierchromatographisch untersucht. Die Chromatogramme wurden auf Schleicher & Schuell Chromatographiepapier, No. 2043 b, glatt, mit den Fließmitteln n-Butanol : Eisessig : Wasser (4:1:1) und n-Butanol : Methanol : Benzol : Wasser (1:2:1:1) in aufsteigender Anordnung durchgeführt. Um die Wanderungsorte der Antithiamin-Wirkstoffe sichtbar zu machen, wurden die entwickelten Chromatogramme mit Thiamin und anschliessend mit Kaliumferricyanid-Natronlauge besprüht. Das auf dem ganzen Blatt verteilte Thiamin wird durch die Kaliumferricyanid-Natronlauge-Lösung zu Thiochrom oxydiert. Unter der UV-Lampe fluoresziert das ganze Blatt mit Ausnahme jener Flecken, in denen die Wirk-

stoffe das Thiamin inaktivierten. Aus den Papierchromatogrammen ergab sich, dass die Präparate III A und III B zwei Antithiamin-Wirkstoffe mit verschiedener Wanderungsgeschwindigkeit enthalten. Die Präparate IV und V erzeugten nur noch einen Flecken mit dem gleichen Rf-Wert, gleichgültig ob Präparat III A, III B oder ein Gemisch von Präparat III A und III B mit Säure behandelt wurde. Die Präparate IV A, V A und V B erzeugten keinen Fleck auf dem Chromatogramm.

Die Rf-Werte der verschiedenen Präparate sind aus Tab. 3 ersichtlich.

Tab. 3 Rf-Werte der Präparate III A + B, IV und V in verschiedenen Fließmitteln

Aufsteigende Chromatographie; Papier:
Schleicher & Schuell, No. 2043 b, glatt;
Fließmittel 1: n-Butanol:Eisessig:Wasser
(4:1:1)
Fließmittel 2: n-Butanol:Methanol:Benzol:
Wasser (1:2:1:1)

Präparat	Rf - Werte	
	Fließmittel	
	1	2
III A + B Komponente 1	0,85	0,73
III A + B Komponente 2	0,55	0,48
IV	0,90	0,78
V	0,90	0,78

Die Präparate IV und V sind harzartig, gelblichbraun und sehr hygroskopisch. Präparat V ist frei von Stickstoff, Schwefel, Phosphor und Halogenen. Es färbt blaues Lakmuspapier rot und entfärbt eine verdünnte Bromlösung. Mit Ferrichlorid ergibt Präparat V eine grüne Farbreaktion. Sowohl Präparat III B als auch Präparat V verbraucht keine Perjodsäure.

Die nach Simon (1958) in Cellosolve durchgeführten Mikrotitrationen¹⁾ ergaben folgende Werte:

¹⁾ Die Analysen wurden im Laboratorium für organische Chemie der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich ausgeführt.

Präparat IV : pK - Wert = 6,57 Äquiv. Gew. 218

Präparat V : pK - Wert = 6,78 Äquiv. Gew. 334

Die Mittelwerte von 7 Mikroanalysen¹⁾ von Präparat V betragen:
C 62,23 % (61,41 - 63,11), H 6,15 % (5,73 - 6,65), O 31,48 % (30,80 - 31,91).

Die UV-Spektren von zwei Präparaten V (aus Präparat III A bzw. III A + III B hergestellt) sind in Fig. 6 dargestellt. Sie wurden von 0,001-proz. bzw. 0,01-proz. äthanolischen Lösungen zwischen den Wellenlängen 230 - 280 bzw. 260 - 440 m μ bei 20^o C aufgenommen.

Nach dem Beer-Lambertschen Gesetz ist die Lichtschwächung beim Durchgang von monochromatischem Licht durch eine absorbierende Lösung logarithmisch proportional der Schichtdicke d, der Konzentration c und einer Konstanten ϵ , dem Extinktionskoeffizienten:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon \cdot c \cdot d}$$

$$\frac{I_0}{I} = 10^{\epsilon \cdot c \cdot d}$$

$$E = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot c \cdot d$$

E = Extinktion	ϵ = molarer Extinktionskoeffizient
I_0 = Intensität des eintretenden Lichtes	c = Konzentration mol/Liter
I = Intensität des austretenden Lichtes	d = Schichtdicke

Im vorliegenden Fall wird die Konzentration C in g/Liter angegeben. Statt des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ wird deshalb der "spezifische Extinktionskoeffizient" k in die Gleichung eingeführt.

$$E = \log \frac{I_0}{I} = k \cdot C \cdot d$$

Da die Schichtdicke immer 1 cm betrug, ergibt sich folgende Gleichung:

1) Fünf dieser Analysen wurden von Herrn A. Peisker im Mikroanalytischen Laboratorium, Brugg, und zwei von Herrn E. Thommen in der Organisch-chemischen Anstalt der Universität Basel ausgeführt.

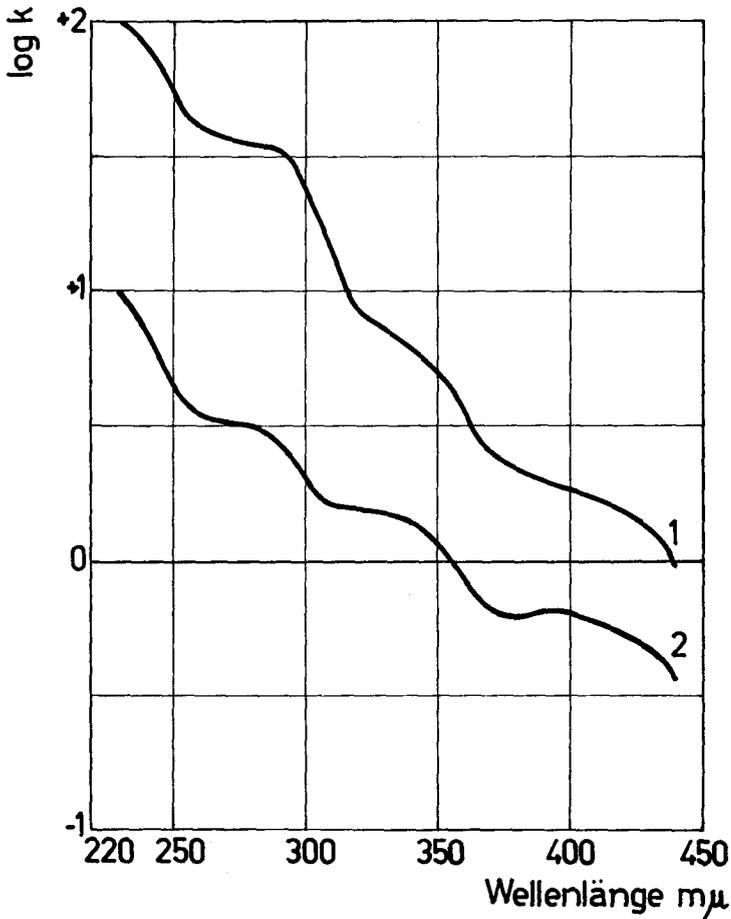


Fig. 6

UV - Absorption von Präparaten V

Temperatur: 20° C; Konzentration: 0,1 bis 1 mg Präparat V pro 10 ml Lösung; Lösungsmittel: Äthanol;
 k = spezifischer Extinktionskoeffizient;

- 1: Präparat V aus Präparat III B hergestellt;
- 2: Präparat V aus Präparat III A + Präparat III B hergestellt

$$\log k = \log E - \log C$$

k = spezifischer Extinktionskoeffizient

E = Extinktion

C = Konzentration g/Liter

Beide Spektren zeigen keine charakteristische Banden.

Präparat IV A (= Wasserteil von Präparat III A + III B nach der Behandlung mit Salzsäure) wurde papierchromatographisch auf Zucker untersucht. Die Chromatogramme wurden auf Schleicher & Schuell Chromatographiepapier, No. 2043 b, mittelglatt, mit dem Fließmittel n-Butanol:Eisessig:Wasser (4:1:5) in aufsteigender Anordnung durchgeführt. Die entwickelten Chromatogramme wurden mit einer ammoniakalischen Silbernitratlösung besprüht und in einer 10-proz. Natriumthiosulfatlösung fixiert. Präparat IV A zeigte einen Fleck mit dem Rf-Wert 0,18. Einen gleichen Fleck (Rf-Wert = 0,18) erzeugte auch Glucose, die auf dem gleichen Chromatogramm entwickelt wurde. Die gleichzeitig chromatographierten Präparate III B und V ergaben keinen Fleck.

333 Chromatographische Methoden

Es wurde versucht, die Präparate III B und V an einer Aluminiumoxidsäule zu reinigen. Es zeigte sich, dass die Wirkstoffe sehr stark adsorbiert werden. In keinem Fall konnte ein aktives Antithiamin-Präparat aus der Aluminiumoxidsäule eluiert werden.

Auch eine weitere Reinigung von Präparat III A und III B durch Papierchromatographie ergab nur unbefriedigende Resultate. Die nach der Chromatographie eluierten Antithiamin-Präparate hatten eine spezifische Aktivität von 5,4 γ /mg (Komponente 1, s. Tab. 3) bzw. 7,5 γ /mg (Komponente 2). Das Ausgangsmaterial (Präparat III A + B) hatte eine solche von 20,4 γ /mg. Nach der Chromatographie auf dem Chromatographiekarton Schleicher & Schuell, No. 2230, wiesen die extrahierten Stoffe praktisch keine Aktivität mehr auf. Die Chromatographie im Chromatopile nach Mitchell und Haskins (1949) ergab ebenfalls keine weitere Reinigung der Wirkstoffe.

In weitem Experimenten wurde Präparat V an einer Cellulosepulversäule

gereinigt. Präparat V wurde in wenig Fließmittel n-Butanol:Methanol:Benzol:Wasser (1:2:1:1) gelöst und auf die gewaschene Säule aufgetragen. Das Antithiamin-Präparat wurde mit dem gleichen Fließmittel eluiert. Die Resultate eines Versuches aus einer Reihe von ähnlich verlaufenen Versuchen sind in Tab. 4 zusammengestellt.

Tab. 4 Fraktionierung von Präparat V an einer Cellulosepulversäule

Säule: 18 x 380 mm; Whatman cellulose powder for chromatography; Elution mit n-Butanol:Methanol:Benzol:Wasser (1:2:1:1); Durchflussgeschwindigkeit: 100 ml je Std.; 15,6 mg Präparat V; spezifische Aktivität: 18,2 γ /mg

Fraktion	Volumen	Farbe	Trockensubstanz	spezifische Aktivität
No.	ml		mg	γ /mg
1	25,0	farblos	4,5	0,0
2	12,5	fast farblos	2,9	10,5
3	12,5	gelb-braun	7,7	20,0
4	12,5	hellbraun-gelb	4,7	16,4
5	12,5	farblos	0,1	-
6	25,0	farblos	0,0	-
7	25,0	farblos	0,0	-

Durch die Chromatographie an Cellulosepulver konnte eine gewisse Erhöhung der spezifischen Aktivität in der Fraktion 3 erzielt werden. Auch diese Fraktion war klebrig und konnte nicht kristallisiert werden.

Die Wirkstoffe werden an Aktivkohle vollständig adsorbiert.

334 Papierelektrophorese

Es wurde versucht, die durch Papierchromatographie nachgewiesenen 2 Komponenten des Präparates III B (vgl. Abschnitt 332) durch kontinuierliche Papierelektrophorese im Elphor Va-Apparat zu trennen. Auf den mit Thiamin und Kaliumferricyanid-Natronlauge besprühten Blättern war nur eine "Wanderungsbahn" sichtbar, die bei pH 3,72 und 4,1 keine und bei pH 5,9 bis 7,8 eine

schwache anodische Ablenkung aufwies. Durch die Aktivitätsbestimmungen der aufgefangenen Fraktionen wurde ebenfalls bestätigt, dass die beiden Komponenten des Präparates V durch die kontinuierliche Papierelektrophorese nicht getrennt wurden.

335 Herstellung eines Brucinsalzes

Präparat V bildet mit Zink, Magnesium und Aluminium kein schwerlösliches Salz, wohl aber mit Brucin. Das Brucinsalz, Präparat VI, ist ein hellbraunes, amorphes Pulver, das mit Äther aus einer äthanolischen Lösung von Präparat V und Brucin ausgefällt wurde. Präparat VI färbt sich bei 190 - 200° C langsam dunkelbraun und scheint sich bei 214 - 226° C bei gleichzeitigem Schmelzen zu zersetzen. Präparat VI hat eine spezifische Aktivität von 18 - 19 γ /mg; Brucin ist völlig inaktiv. Mit verschiedenen Lösungsmitteln wurde versucht, Präparat VI zu kristallisieren, was jedoch nicht gelang. Wurde Präparat VI auf eine Aluminiumoxidsäule aufgetragen, so blieb der Antithiamin-Wirkstoff haften und liess sich zum grössten Teil nicht eluieren (vgl. Abschnitt 333). Die eluierbare Substanz hatte eine spezifische Aktivität von 4,8 γ /mg.

An einer Kationenaustauschersäule (Amberlite IRC-50) in der H-Form konnte Präparat VI aus wässriger Lösung adsorbiert werden. Die wässrigen Eluate waren nur wenig aktiv. Mit 50-proz. Äthanol konnte eine glasartige, braune Substanz, Präparat VII, eluiert werden. Präparat VII liess sich als feine Plättchen vom Kolbenboden abkratzen. Seine spezifische Aktivität betrug 20 - 21 γ /mg. In einer anderen Versuchsreihe wurde Präparat VI in 1-n. Salzsäure gelöst. Diese Lösung wurde mit Äther ausgezogen. Der Ätherauszug ergab Präparat VIII, eine klebrige, braune Substanz mit hoher spezifischer Aktivität (20 γ /mg).

Die Mikroanalysen ¹⁾ ergaben aus 5 - 7 Bestimmungen folgende Mittelwerte:

Präparat VI : C 62,63 %; H 6,21 %; N 3,60 %; O 25,77 %

Präparat VII : C 61,01 %; H 6,99 %; N 0,00 %; O 31,91 %

Präparat VIII : C 61,06 %; H 6,64 %; N 0,00 %; O 32,30 %

¹⁾ Die Mikroanalysen wurden von Herrn A. Peisker, Mikroanalytisches Laboratorium, Brugg, durchgeführt.

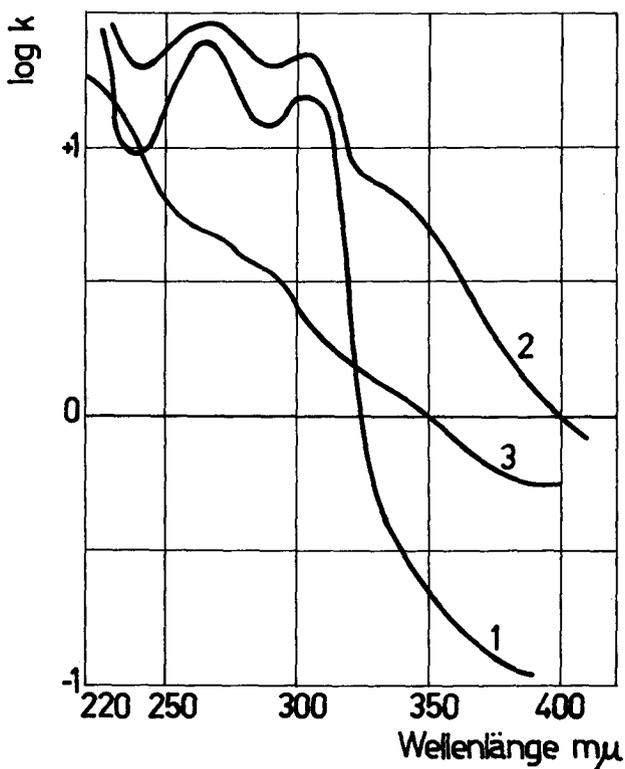


Fig. 7 UV - Absorption des Brucins und der Präparate VI und VII

Temperatur: 20⁰ C; Konzentration: 0,1 bis 1 mg pro 10 ml Lösung; Lösungsmittel: Äthanol; k = spezifischer Extinktionskoeffizient;

- 1: Brucin;
- 2: Präparat VI;
- 3: Präparat VII

Die UV-Spektren von Brucin, Präparat VI und Präparat VII sind in Fig. 7 dargestellt.

336 Behandlung mit Kationenaustauscherharz

Nachdem sich das Brucinsalz (Präparat VI) an einer Kationenaustauschersäule wieder spalten liess, die aktiven Antithiamin-Präparate mit Wasser aber nur wenig eluierbar waren, schien es möglich, dass die Wirkstoffe an einer Kationenaustauschersäule weiter gereinigt werden können. Ähnliche Trennungen an Ionenaustauschern sind aus der Literatur schon bekannt. Davis und Thomas (1951) haben mitgeteilt, dass organische Säuren an Kationenaustauschern als "undissoziierte Säuren" adsorbiert werden. Anderson und Hansen (1955) haben Phenole an Anionenaustauschern getrennt, während Sargent und Rieman (1957) verschiedene Alkohole an Anionenaustauschern wie auch an Kationenaustauschern trennen konnten. Die Autoren wiesen darauf hin, dass es sich bei der Adsorption und Elution der Alkohole nicht um Ionenaustauschreaktionen handelt.

Für die Reinigungsversuche an Kationenaustauscherharz wurde Amberlite IRC - 50 in der H-Form verwendet. Präparat V wurde in wässriger Lösung auf die Säule aufgetragen und mit Wasser, 10-proz., 30-proz. und 50-proz. Alkohol eluiert. Tab. 5 gibt die Resultate eines Versuches aus einer Reihe von 8 ähnlich verlaufenen Experimenten wieder.

Von den Fraktionen 2, Präparat IX A, und 5, Präparat IX B, die beide aktiver waren als das Ausgangsmaterial, wurden die UV-Spektren aufgenommen. Wie die in Fig. 8 dargestellten Spektren zeigen, haben die Präparate IX A und IX B bei 285 m μ ein deutliches Maximum. Als Vergleich ist in Fig. 8 auch das UV-Spektrum von Präparat X (vgl. Abschnitt 354) dargestellt.

Die Mikroanalysen ¹⁾ ergaben folgende Werte:

Präparat IX A : C 61,43 % H 5,61 %

Präparat IX B : C 61,62 % H 5,51 %

Die Mikroanalysen wie auch die UV-Spektren der beiden Präparate weisen darauf hin, dass es sich um die gleiche Substanz oder um Isomere handeln dürfte.

¹⁾ Die Mikroanalysen wurden von Herrn E. Thommen, Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel, durchgeführt.

Tab. 5

Fraktionierung von Präparat V an
einer Kationenaustauschersäule

Säule: 18 x 160 mm; 40 ml Amberlite
IRC-50 in der H-Form; 160 mg Prä-
parat V; spezifische Aktivität: 21,6 γ /mg

Fraktion	Elutionsmittel	Trockensubstanz*		spezifische Aktivität
		mg	mg/100 ml	γ /mg
No.				
1	300 ml Wasser	20,9	7,0	21,5
2	300 ml Wasser	46,7	15,6	25,0
3	50 ml 10-proz. Äthanol	9,2	18,4	19,7
4	50 ml 10-proz. Äthanol	12,3	24,6	18,2
5	100 ml 30-proz. Äthanol	28,1	28,1	24,0
6	50 ml 30-proz. Äthanol	12,0	24,0	18,0
7	50 ml 30-proz. Äthanol	6,6	13,2	16,7
8	100 ml 30-proz. Äthanol	7,9	7,9	13,4
9	100 ml 30-proz. Äthanol	5,9	5,9	8,8
10	50 ml 50-proz. Äthanol	4,4	8,8	9,2
11	50 ml 50-proz. Äthanol	10,8	21,6	11,4
12	50 ml 50-proz. Äthanol	14,8	29,6	<1
13	100 ml 50-proz. Äthanol	18,1	18,1	<1

*Die aus der Säule eluierte Menge ist grösser als die aufgetragene. Dies mag daher rühren, dass die einzelnen Fraktionen der hygroskopischen Substanz in 50-ml-Rundkolben eingeeengt und gewogen wurden.

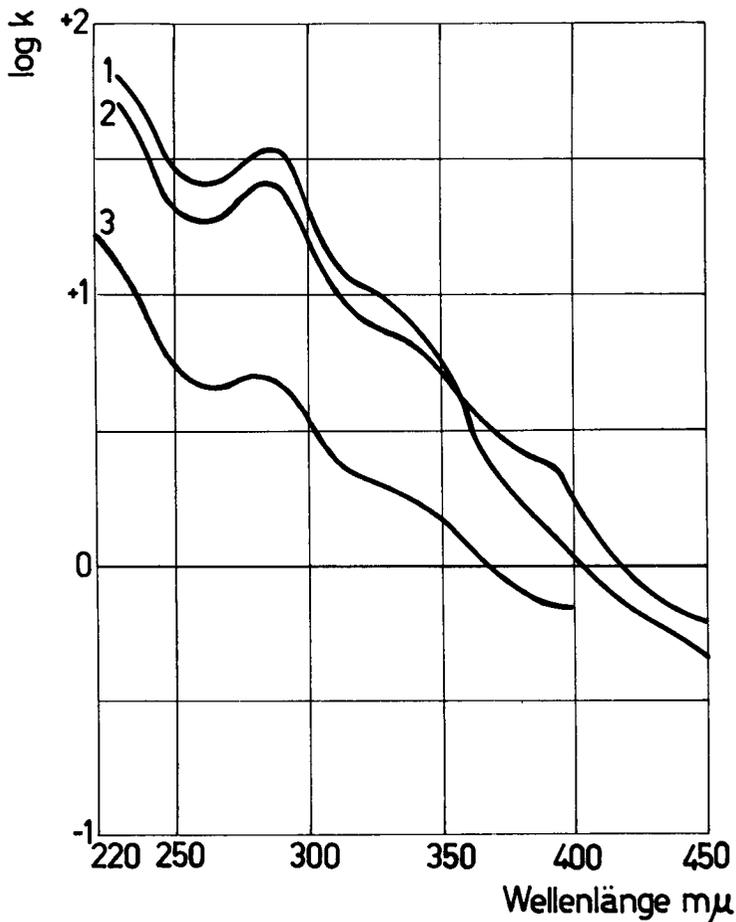
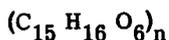


Fig. 8 UV-Absorption der Präparate IX A, IX B und X
 Temperatur: 20° C; Konzentration: 0,1 bis 1 mg
 pro 10 ml Lösung; Lösungsmittel: Äthanol;
 k = spezifischer Extinktionskoeffizient;
 1: Präparat IX A, zweite Fraktion;
 2: Präparat IX B, dritte Fraktion;
 3: Präparat X (vgl. Abschnitt 354)

Auf Grund der Mittelwerte obiger Analysen ergibt sich eine Bruttoformel von



Wurden aktive Präparate IX A wieder vereinigt und erneut auf eine Kationenaustauschersäule Amberlite IRC-50 in der H-Form aufgetragen, so konnte das Antithiamin-Präparat, ähnlich wie das erste Mal, fraktioniert werden. Die spezifische Aktivität konnte durch die zweite Fraktionierung jedoch nicht wesentlich erhöht werden. Um einen eventuellen Zusammenhang zwischen der spezifischen Aktivität und dem UV-Spektrum eines Antithiamin-Präparates kennenzulernen, wurden von 4 verschiedenen Fraktionen von Präparat IX A nach der zweiten Fraktionierung an Kationenaustauscher die UV-Spektren aufgenommen. Die verwendeten Fraktionen, deren UV-Spektren in Fig. 9 dargestellt sind, hatten folgende spezifische Aktivitäten:

Fraktion 4, mit 10-proz. Äthanol eluiert : 23,3 γ /mg

Fraktion 5, mit 10-proz. Äthanol eluiert : 24,1 γ /mg

Fraktion 7, mit 30-proz. Äthanol eluiert : 20,5 γ /mg

Fraktion 8, mit 30-proz. Äthanol eluiert : 4,6 γ /mg

Wie aus Fig. 9 deutlich ersichtlich ist, ist die Absorption bei 285 m μ der aktivsten Fraktion 5 am ausgeprägtesten.

Die aktivsten Fraktionen von den Präparaten IX A und IX B bildeten nach dem Einengen und Trocknen auf dem Kolbenboden braune, glasartige Schichten, die als feine Plättchen abgekratzt werden konnten. Der Schmelzpunkt war 204° C. Die weniger aktiven Fraktionen waren stark hygroskopische, amorphe Pulver.

337 Zusammenfassung der Reinigungsversuche

Aus einem wässrigen Rohextrakt aus den Fiedern von Adlerfarn (Präparat I A) wurde mit Ameisensäure bei pH 3,5 die Trübstoffe ausgefällt. Aus dem erhaltenen Präparat II wurden die Antithiamin-Wirkstoffe durch Adsorption an Anionenaustauscher und Elution mit Ameisensäure abgetrennt. Die eluierten Antithiamin-Präparate (Präparat III A und III B) wurden mit 1-n. Salzsäure behandelt. Das Reaktionsgemisch wurde in Wasser aufgenommen

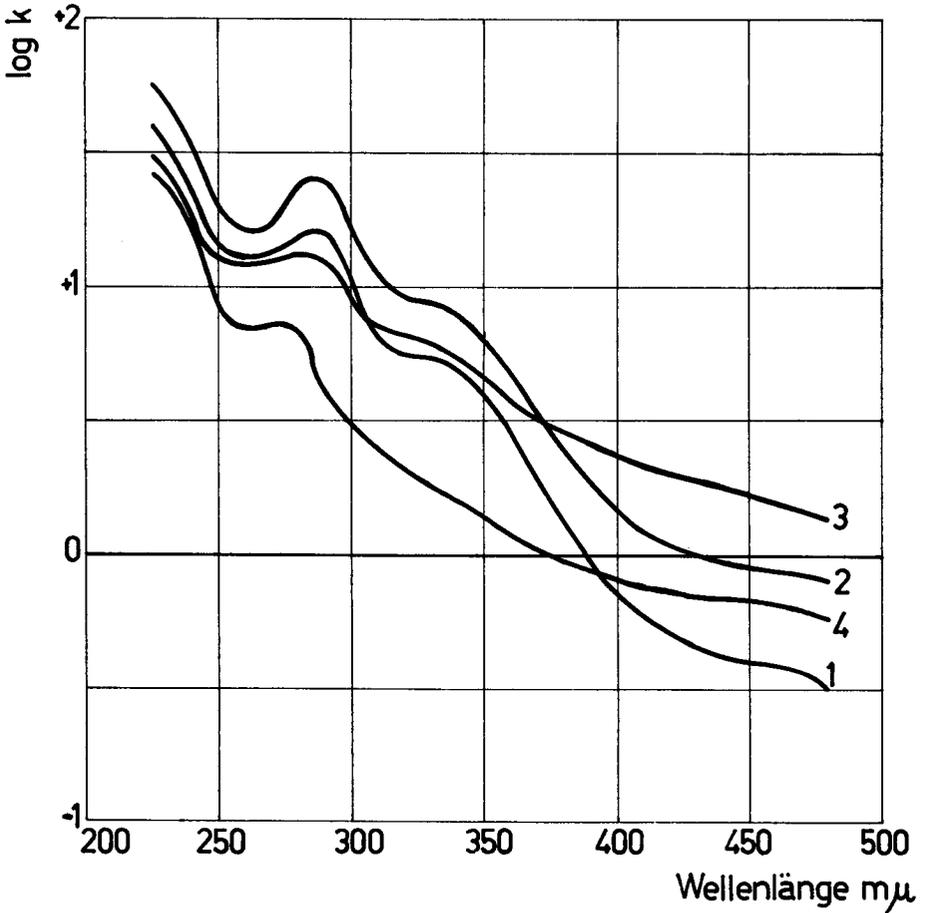


Fig. 9 UV-Absorption verschiedener Fraktionen des Präparates IX A nach zweiter Fraktionierung an Kationenaustauschersäule

Temperatur: 20° C; Konzentration: 0,1 bis 1 mg pro 10 ml Lösung; Lösungsmittel: Äthanol; k = spezifischer Extinktionskoeffizient;

<u>Kurve</u>	<u>Fraktion</u>	<u>spezifische Aktivität</u>
1	4	23,3 γ/mg
2	5	24,1 γ/mg
3	7	20,1 γ/mg
4	8	4,6 γ/mg

und mit Äther ausgezogen. Der Natriumbikarbonatauszug der Ätherlösung (Präparat IV) ergab Präparat V, aus dem mit Brucin ein Salz (Präparat VI) hergestellt wurde. Nach der Spaltung von Präparat VI an einer Kationenaustauschersäule bzw. durch Ausziehen einer salzsauren Lösung mit Äther wurden die sehr aktiven Präparate VII bzw. VIII erhalten. Eine weitere Reinigung von Präparat V gelang ebenfalls durch die Fraktionierung an einer Kationenaustauschersäule.

Die Reinigung der Antithiamin-Wirkstoffe ist S. 35 schematisch dargestellt. Das Schema enthält auch ein Verzeichnis der Präparate.

Um ein genaueres Bild über den Reinheitsgrad der einzelnen Reinigungsstufen zu erhalten, wurden von den Präparaten I A, II, III B, IV und V die Halbwert-Mengen bestimmt (vgl. Abschnitt 32). Sie und ihre reziproken Werte, die Halbwert-Aktivitäten, sind in Tab. 6 zusammengestellt.

Tab. 6 Halbwert-Mengen und Halbwert-Aktivitäten der Präparate I bis V

Vorlage: 100 γ Thiamin; 50 mg (Präparat I A) bis 0,3 mg (Präparat V) Antithiamin-Präparat; Gesamtvolumen: 20 ml

Präparat	Halbwert-Menge	Halbwert-Aktivität
	mg	mg ⁻¹
I A	40,00	0,025
II	13,70	0,073
III B	1,68	0,595
IV	1,28	0,781
V	0,678	1,475

Setzt man die Halbwert-Aktivität wie auch die spezifische Aktivität des Ausgangsmateriales, Präparat I A, gleich 1, so lassen sich die beiden Aktivitäten der verschiedenen Antithiamin-Präparate vergleichen. In Fig. 10 sind die nach beiden Methoden berechneten Aktivitäten dargestellt.

Der Reinheitsgrad der einzelnen Präparate ist demnach bedeutend größer, wenn er an der Halbwert-Aktivität gemessen wird, als wenn er an der

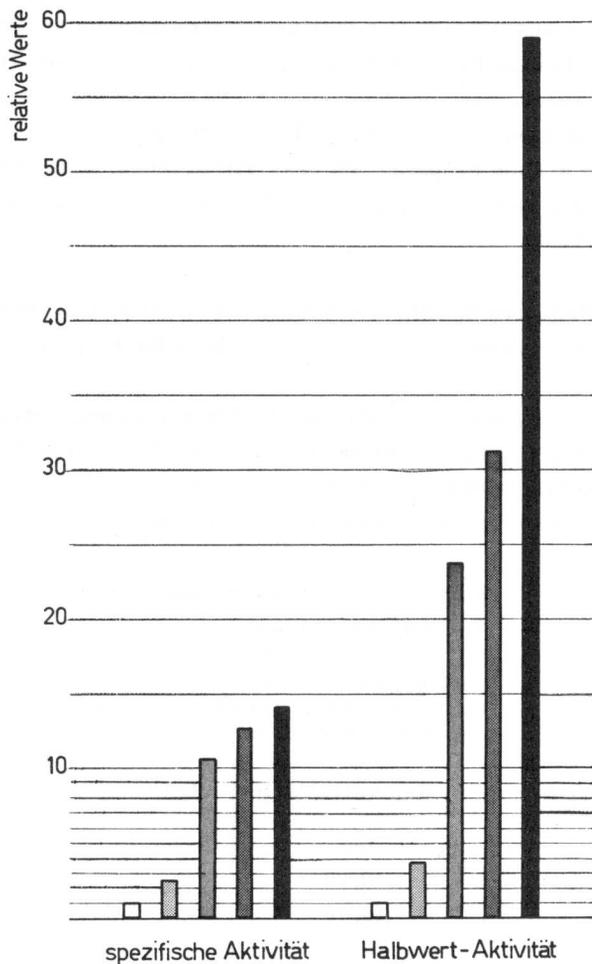


Fig. 10

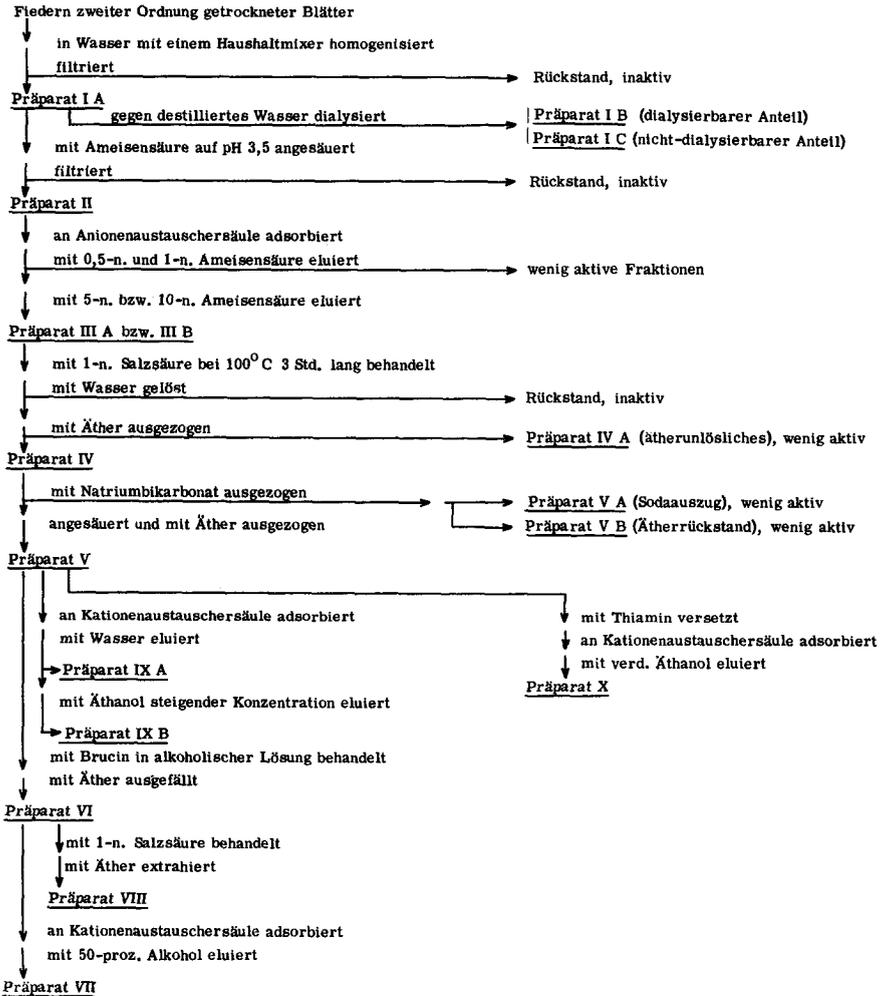
Spezifische Aktivität und Halbwert-Aktivität der Präparate I A, II, III B, IV und V, bezogen auf die Aktivität des Präparates I A = 1

Bestimmung der spezifischen Aktivität: Vorlage: 100 γ Thiamin; Gesamtvolumen: 20 ml; 3, 6 mg Antithiamin-Präparat;

Bestimmung der Halbwert-Aktivität: Vorlage : 100 γ Thiamin; Gesamtvolumen: 20 ml; 50 mg (Präparat I A) bis 0, 3 mg (Präparat V) Anti - thiamin-Präparat;

Präparat I A
 Präparat III B
 Präparat IV
 Präparat II
 Präparat V

Schema der Reinigung der Antithiamin-Wirkstoffe aus Adlerfarnkraut und Bezeichnung der Präparate



spezifischen Aktivität gemessen wird.

Die Halbwert-Aktivität von Präparat VII, VIII, IX A und IX B ist derjenigen von Präparat V sehr ähnlich.

34 Stabilität der Antithiamin-Wirkstoffe

341 Thermostabilität

In der Literatur sind die Angaben über die Thermostabilität der Antithiamin-Wirkstoffe aus Farnkraut widerspruchsvoll. Einige Autoren berichten von thermostabilen und thermolabilen Wirkstoffen, die gleichzeitig im Farnkraut vorkommen sollen. Es wurde deshalb untersucht, ob die mit Wasser extrahierten Antithiamin-Wirkstoffe aus den Fiedern von *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn thermostabil sind oder nicht.

Proben eines in der Kälte hergestellten Präparates I A bzw. I B bzw. I C (s. S. 35) wurden 1 Std. gekocht. Die Aktivitäten der gekochten Proben und die von ungekochten Proben der gleichen Präparate sind in Tab. 7 zusammengestellt.

Tab. 7 Aktivität der Präparate I A, I B und I C ungekocht und gekocht

Vorlage: 100 γ Thiamin; Gesamtvolumen: 20 ml;
gekocht: 1 Std.

Präparat	Aktivität	
	des ungekochten Präparates	des gekochten Präparates
	%	%
I A 1,5 ml	67	69
I B 2,0 ml	55	56
I C 1,5 ml	33	32

Die Antithiamin-Aktivität wurde durch das Kochen der Antithiamin-Präparate in keinem Fall vermindert.

Andererseits ist aber Präparat I A im Kühlschrank bedeutend länger haltbar als bei Zimmertemperatur, wo es schon nach 2 bis 3 Wochen eine bedeutende Abnahme der Antithiamin-Wirkung zeigt. Auf Proben, die bei Zimmertemperatur aufbewahrt wurden, entwickelte sich nach einigen

Tagen ein Pilz; die Aktivität ging zurück. Um die Frage abzuklären, ob die beiden Erscheinungen (Wachstum des Pilzes und Abnahme der Aktivität) in einem gewissen Zusammenhang stehen, wurden Proben von Präparat I B sterilisiert. Die sterilisierten Proben wurden zusammen mit nicht-sterilisierten Proben des gleichen Präparates bei 20° C aufbewahrt. Die nichtsterilisierten Proben wurden nach 8 Tagen trüb und nach 35 Tagen war ein voluminöser Pilz gewachsen, während die sterilisierten Proben noch nach 35 Tagen vollständig klar waren. Die Aktivitäten des nicht-sterilisierten und sterilisierten Präparates I B, die nach 1, 8 und 35 Tagen bestimmt wurden, sind in Tab. 8 zusammengestellt.

Tab. 8 Aktivität des Präparates I B nicht-sterilisiert und sterilisiert, nach 1, 8 und 35 Tagen

Vorlage: 100 γ Thiamin; 1,5 ml Präparat I B; Gesamtvolumen: 20 ml; sterilisiert 1 Std. bei 100° C, nach 3 Std. wiederholt

	Aktivität	
	des nicht-sterilisierten Präparates	des sterilisierten Präparates
	%	%
in 1 Tag	52	52
in 8 Tagen	52	52
in 35 Tagen	20	40

Aus diesen Versuchen ergibt sich, dass die mit Wasser aus Adlerfarn extrahierten Antithiamin-Wirkstoffe thermostabil sind. Die unbehandelten Wasserextrakte (Präparat I B) sind aber bei Zimmertemperatur nicht haltbar, da die Antithiamin-Wirkstoffe durch Pilze zerstört werden.

342 Stabilität gegen Säure und Lauge

Um die Stabilität der Antithiamin-Wirkstoffe aus Adlerfarnkraut gegen Säure und Lauge zu untersuchen, wurden Proben von Präparat III A auf verschiedene pH-Werte gebracht. Die Proben wurden 1 Std. auf 95° C erwärmt. Von den neutralisierten Proben wurde die Aktivität bestimmt. Eine mit Salzsäure auf pH 3,25 gebrachte Probe hatte nach dem Erwärmen die gleiche Aktivität wie vor der Behandlung, ebenso eine mit Phosphatpuffer auf pH 6

gebrachte Probe. Die mit Natronlauge alkalisch gemachten Proben hatten nach dem Erhitzen eine kleinere Aktivität als vor der Behandlung. Die Aktivität war um so kleiner, je höher der pH-Wert war. Die Aktivitäten der bei pH 6,0; 7,65; 8,8; 11,0 und 11,55 behandelten Proben sind in Fig. 11 als Funktion der vor der Behandlung eingestellten pH-Werte dargestellt.

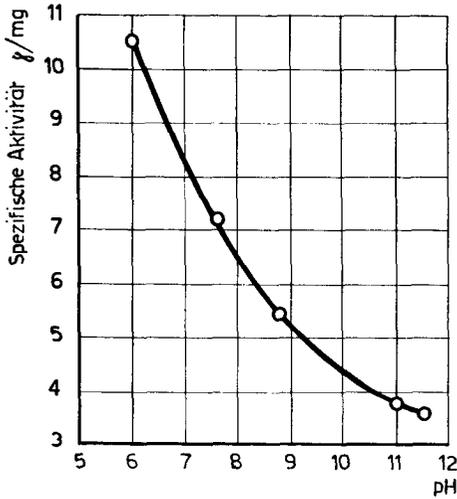


Fig. 11 Spezifische Aktivität des Präparates III A nach einstündigem Kochen bei verschiedenem pH

Vorlage: 100 γ Thiamin; Gesamtvolumen: 20 ml;
3,6 mg Präparat III A; in Natronlauge 1 Std. gekocht, mit Salzsäure neutralisiert;

Ausgangsaktivität von Präparat III A = 10,5 γ /mg

Die Antithiamin-Wirkstoffe aus Adlerfarn sind demnach gegen Säure beständig, im neutralen und alkalischen Bereich aber unbeständig.

35 Wirkungsmechanismus der Antithiamin-Wirkstoffe

351 Einfluss der Mengenverhältnisse

Es wurden Thiamin-Inaktivierungsversuche mit Präparat I A, I B und I C durchgeführt, wobei die Menge der Antithiamin-Präparate im Versuchsgemisch variiert wurde. Die Vorlage betrug immer 100 γ Thiamin in 20 ml Gesamtvolumen. Die Thiamin-Bestimmungen wurden nach 5 und 30 Min. Inaktivierungs-Dauer durchgeführt. Beide Thiamin-Bestimmungen ergaben stets gleiche, innerhalb der Fehlergrenze der Thiamin-Bestimmung liegende Werte. Es wurden deshalb die Mittelwerte von je einer Bestimmung nach 5 und 30 Min. Inaktivierungs-Dauer berechnet.

Die Resultate dieser drei Versuchsreihen sind in Fig. 12 graphisch dargestellt.

Der Kurventyp ist für alle Präparate gleich. Die Logarithmen des nicht-inaktivierten Thiamins, als Funktion der Antithiamin-Präparat-Menge dargestellt, ergeben Geraden. Die Abweichung der Kurve 1 von der Geraden ist damit zu erklären, dass im Versuchsgemisch mit 3 ml Präparat I A ein Überschuss des Antithiamin-Präparates vorhanden war.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Menge von Präparat I A bzw. Präparat V in 20 ml Gesamtvolumen konstant gehalten. Die Thiamin-Vorlage wurde stufenweise von 100 bis 1000 γ erhöht. Die Resultate dieser Versuche sind in Fig. 13 dargestellt.

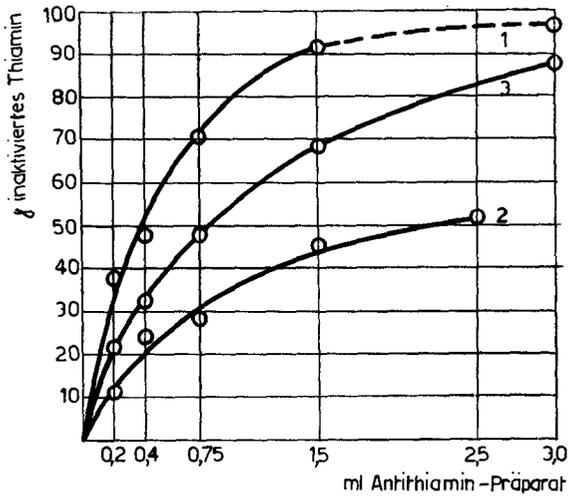


Fig. 12a

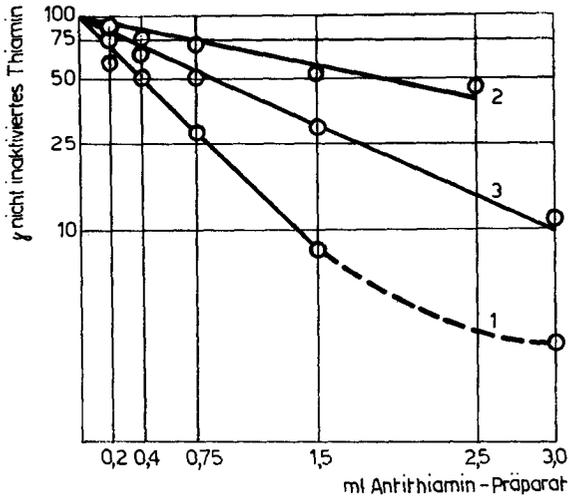


Fig. 12b

Fig. 12 Aktivität verschiedener Mengen der Präparate IA, IB und IC
 a Numerische Darstellung des inaktivierten Thiamins
 b Einfach logarithmische Darstellung des nicht-inaktivierten Thiamins

Vorlage: 100 γ Thiamin; Gesamtvolumen: 20 ml;

- 1: Präparat I A;
- 2: Präparat I B;
- 3: Präparat I C

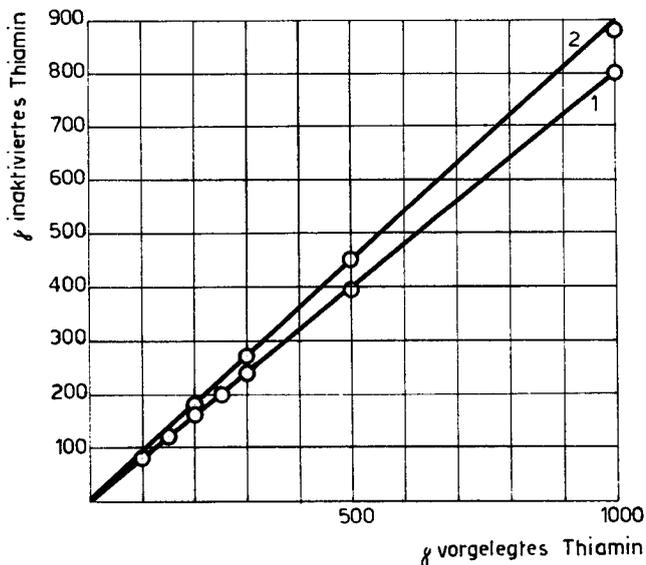


Fig. 13 Aktivität der Präparate I A und V bei Vorlage verschiedener Thiamin-Mengen

Gesamtvolumen: 20 ml;

1 : 0,5 ml Präparat I A;

2 : 3,0 mg Präparat V

Eine bestimmte Menge eines Antithiamin-Präparates inaktiviert demnach bei grosser Thiamin-Vorlage mehr Thiamin als bei kleiner Vorlage. Die Inaktivierung beträgt für eine bestimmte Menge eines Antithiamin-Präparates immer gleichviel Prozent der Thiamin-Vorlage, sodass die Thiamin-Inaktivierung als Funktion der Thiamin-Vorlage stets eine Gerade ergibt. Dies gilt streng bis zu Vorlagen von 1000 γ Thiamin. Bei Vorlagen von mehr als 1000 γ Thiamin nimmt die prozentuelle Inaktivierung langsam ab. Diese Resultate wurden auch durch mikrobiologische Thiamin-Bestimmungen (vgl. Abschnitt 32) mit den Präparaten IV, V und VII bestätigt.

Es wurde auch untersucht, ob die Thiamin-Inaktivierung von der Konzentration von Thiamin und Antithiamin-Präparat abhängig ist. Es wurden Versuchsgemische von 5 ml, 10 ml, 20 ml und 40 ml Gesamtvolumen hergestellt. Alle diese Gemische enthielten 0,5 ml Präparat I A und 100 γ Thiamin. Die Resultate der Thiamin-Bestimmungen sind in Tab. 9 zusammengestellt.

Tab. 9 Aktivität von Präparat IA bei verschiedenen Konzentrationen

Vorlage: 100 γ Thiamin; 0,5 ml Präparat I A

Gesamtvolumen des Inaktivierungsgemisches	Aktivität
ml	%
5	44
10	56
20	58
40	54

Die Thiamin-Inaktivierung in den Gemischen mit 10 bis 40 ml war gleich, während in der konzentriertesten Lösung (5 ml) die Inaktivierung kleiner war. Diese Verringerung der Inaktivierung kann eventuell auf einen Salzeffekt zurückgeführt werden (vergl. Abschnitt 352).

352 Einfluss von Kochsalz

Um abzuklären, ob Salze die Thiamin-Inaktivierung durch die Antithiamin-Wirkstoffe aus Adlerfarn hemmen können, wurden Inaktivierungsversuche mit konstanten Mengen Thiamin und Wirkstoffen in Lösungen mit verschiedener Kochsalzkonzentration angestellt. Die Wirkstoff-Mengen wurden so gewählt, dass die Inaktivierung nicht zu hoch war. Die Thiamin-Inaktivierung ist in Fig. 14 als Funktion der Kochsalzkonzentration in den Inaktivierungsgemischen dargestellt.

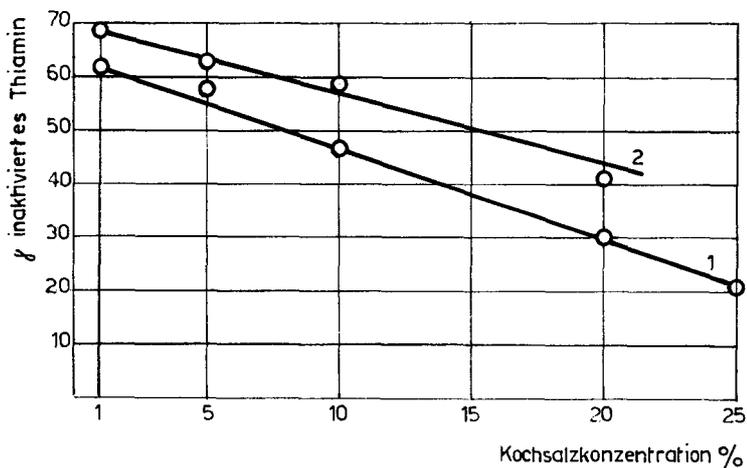


Fig. 14 Aktivität der Präparate III B und V (aus III B) in Kochsalzlösung steigender Konzentration

Vorlage: 100 γ Thiamin; Gesamtvolumen: 20 ml;

1: 2,5 mg Präparat III B

2: 1,8 mg Präparat V

Die Thiamin-Inaktivierung nimmt mit der Zunahme der Kochsalzkonzentration linear ab.

353 Einfluss von Luftsauerstoff

Um abzuklären, ob der Luftsauerstoff die Thiamin-Inaktivierung durch die Antithiamin-Wirkstoffe aus Adlerfarnkraut beeinflusst, wurden Inaktivierungs-Versuche mit Präparat III B und Präparat V unter Luftatmosphäre und unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Die Thiamin-Inaktivierung war bei beiden Versuchsanordnungen gleich. Der Luftsauerstoff hat keinen Einfluss auf die Thiamin-Inaktivierung; diese ist also keine katalytische Oxydation mit Luftsauerstoff.

354 Versuche zur Spaltung der Thiamin-Antithiamin-Wirkstoff-
"Additionsverbindung"

Williams, Waterman, Keresztesy und Buchman haben 1935 mitgeteilt, dass Thiamin durch Sulfit zwischen der Methylenbrücke und dem Thiazolring gespalten werden kann. Krampitz und Woolley (1944) bewiesen die Spaltung des Thiamins durch Fischeingeweide-Extrakte. Sie konnten die beiden Spaltprodukte 2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethylpyrimidin (42 % der theoretischen Menge) und 4-Methyl-5-hydroxyäthylthiazol (82 % der theoretischen Menge) isolieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, aus einem Inaktivierungsgemisch, in dem 200 mg Thiamin zu 78 % inaktiviert waren, die Thiazolkomponente des Thiamins als Pikrat abzutrennen. Es wurden 224 mg gelbe Plättchen mit einem Schmelzpunkt von 195° C erhalten.

Zum Vergleich wurden die Pikrate der Thiazolkomponente des Thiamins (4-Methyl-5-(β -hydroxyäthyl)-thiazol) und des Thiamins selbst hergestellt. Diese Derivate wurden mit 500 mg 4-Methyl-5-(β -hydroxyäthyl)-thiazol und 800 mg Pikrinsäure bzw. mit 200 mg Thiamin und 200 mg Pikrinsäure hergestellt. Die Ausbeuten betragen 980 mg (75 %) bzw. 261 mg (79 %). Vom Pikrat aus dem Inaktivierungsgemisch sowie von den beiden Pikraten aus der Thiazolkomponente des Thiamins bzw. aus dem Thiamin selbst wurden die Schmelzpunkte und Mischschmelzpunkte bestimmt, nachdem alle Präparate dreimal aus Äthanol-Wasser umkristallisiert worden waren. Die Schmelzpunkte und Mischschmelzpunkte sind in Tab. 10 zusammengestellt.

Tab.10 Schmelzpunkte und Mischschmelzpunkte der Pikrate aus einem Inaktivierungsgemisch bzw. des Thiamins und der Thiazolkomponente des Thiamins

Vorlage: 200 mg Thiamin; 500 mg Präparat III A

Substanz	Form	Schmelzpunkt *	Mischschmelzpunkt *
Pikrat der Thiazolkomponente des Thiamins	gelbe Nadeln	163,5°	145-159° **
Pikrat aus Inaktivierungsgemisch	gelbe Plättchen	195° **	
Pikrat des Thiamins	gelbe Plättchen	195° **	

* uncorr.

** Präparate zersetzen sich

Das Pikrat aus dem Inaktivierungsgemisch ist somit nicht das Pikrat der Thiazolkomponente, sondern das Pikrat des Thiamins. Die Ausbeute von 244 mg macht somit 74 % der theoretischen Menge aus.

In der Folge wurde versucht, das Thiamin aus einem Inaktivierungsgemisch wieder zurückzugewinnen. In einer ersten Versuchsreihe wurden Inaktivierungsgemische, in denen das Thiamin durch Präparat V inaktiviert worden war, auf Anionenaustauscher Dowex-3 in der Formiatform aufgetragen. Das Präparat V wurde an der Anionenaustauschersäule adsorbiert, während das Thiamin die Säule passierte. Im Eluat konnte bis 100 % des ursprünglich vorgelegten Thiamins mit der Thiochrom-Methode wieder nachgewiesen werden.

Wurde ein Inaktivierungsgemisch auf eine Kationenaustauschersäule Amberlite IRC-50 in der H-Form aufgetragen, so wurden im wässrigen Eluat weder Thiamin noch Antithiamin-Wirkstoffe gefunden. Mit 30-proz. Äthanol liessen sich die Wirkstoffe eluieren und wurden nach dem Einengen und Trocknen als rötlichbraune, glasartige Plättchen erhalten → Präparat X. Diese Substanz hatte eine spezifische Aktivität von 21,5 γ /mg; ihr UV-Spektrum weist bei 285 m μ ein deutliches Maximum auf und stimmt mit jenen der Präparate IX A und IX B gut überein (vgl. Fig.8). Aus der mit Wasser gewaschenen Kationenaustauschersäule liess sich 88 - 100 % des ursprünglich vorgelegten Thiamins mit 2-n. Salzsäure eluieren. In Tab.11 sind die Resultate einiger Versuche zusammengestellt.

Tab. 11 Rückgewinnung von Thiamin aus Inaktivierungsgemischen

Inaktivierungsgemisch: Thiamin und Präparat V;
Konzentration: 100 γ Thiamin und 3,6 mg Präparat V
je 20 ml Gesamtvolumen

Ionenaustauscher	Thiamin-Vorlage		Inaktiviertes Thiamin		Aus Ionenaustauscher zurückgewonnenes Thiamin	
	γ	%	γ	%	γ	%
Amberlite IRC-50-Kationenaustauscher	1'640	100	1'402	86	1'650	100
Dowex-3 - Anionenaustauscher	480	100	370	77	466	97
	1'980	100	1'605	81	1'946	98

Das wässrige Eluat aus der Anionenaustauschersäule wurde eingengt und zur weiteren Identifizierung des Thiamins chromatographiert. Als Vergleichssubstanz dienten eine Lösung von reinem Thiamin-hydrochlorid und eine Probe Thiamin-hydrochlorid, die gleich wie das Versuchsgemisch durch eine Anionenaustauschersäule geschickt und eingengt worden war. Gleichzeitig wurde ein Inaktivierungsgemisch und ein Präparat V chromatographiert. Alle diese Proben wurden auf Schleicher & Schuell Chromatographiepapier, No. 2043 b, mittelglatt, aufsteigend mit drei verschiedenen Fliessmittelgemischen entwickelt. Eine erste Serie der Chromatogramme wurden mit Kaliumferricyanid-Natronlauge besprüht. Das zu Thiochrom oxydierte Thiamin war nach dem Trocknen der Blätter unter der UV-Lampe als fluoreszierender Fleck sichtbar. Um den Antithiamin-Wirkstoff von Präparat V sichtbar zu machen, wurde eine zweite Serie der Chromatogramme zuerst mit Thiamin und anschliessend mit Kaliumferricyanid-Natronlauge besprüht. Auf diesen Blättern war der Antithiamin-Wirkstoff unter der UV-Lampe auf dem fluoreszierenden Chromatogramm als dunkler Fleck sichtbar. Der Thiaminfleck fluoreszierte unter der UV-Lampe viel stärker als das übrige Blatt. Die Rf-Werte der verschiedenen Substanzen sind in Tab. 12 zusammengestellt.

Tab. 12 Rf-Werte des Thiamins, des an Anionenaustauscher aus einem Inaktivierungsgemisch isolierten Thiamins, der Substanzen eines Inaktivierungsgemisches und des Präparates V in verschiedenen Fliessmitteln

Aufsteigende Chromatographie; Papier: Schleicher und Schuell, No. 2043 b, mittelglatt;

Fliessmittel 1: n-Butanol: Eisessig: Wasser (4 : 1 : 5) nach Lhoest, Busse und Baumann (1958)

Fliessmittel 2: n-Butanol: Äthanol: Wasser (2 : 1 : 1) nach Lhoest, Busse und Baumann (1958)

Fliessmittel 3: n-Butanol: Methanol: Wasser (2 : 1 : 1)

Präparat	Rf - Werte		
	Fliessmittel		
	1	2	3
Thiamin-hydrochlorid	0,29	0,25	0,595
Thiamin-hydrochlorid aus Anionenaustauschersäule	0,29	0,25	0,595
Inaktivierungsgemisch aus Anionenaustauschersäule	0,29	0,25	0,595
Inaktivierungsgemisch	heller Fleck	0,29	0,25
	dunkler Fleck	0,80	0,77
Präparat V, dunkler Fleck	0,80	0,77	0,95

Die aus dem Inaktivierungsgemisch an der Anionenaustauschersäule isolierte Substanz ergab auf dem Papierchromatogramm den gleichen Flecken wie reines Thiamin-hydrochlorid. Beim Inaktivierungsgemisch war auf dem Chromatogramm sowohl das Thiamin, als auch der Wirkstoff von Präparat V sichtbar.

Das Thiamin-Molekül wird bei der Inaktivierung durch die Antithiamin-Wirkstoffe aus Adlerfarnkraut also nicht verändert. Wahrscheinlich wird bei der Inaktivierung eine "Additionsverbindung" gebildet, die jedoch noch nicht nachgewiesen werden konnte.

355 Einfluss von organischen Aminen

Die Angaben der Literatur (vgl. Somogyi und Koller, 1958) über den Einfluss von organischen Aminen auf die Inaktivierung von Thiamin durch die Antithiamin-Wirkstoffe aus Farnkraut sind widerspruchsvoll. Es wurde deshalb die Wirkung von m-Nitroanilin, Anilin und Pyridin auf die Thiamin-Inaktivierung durch die Antithiamin-Wirkstoffe aus Adlerfarnkraut untersucht (Somogyi und Koller, 1958). Die Inaktivierungstemperatur betrug bei diesen Versuchen immer 37°C. Wo nichts anderes bemerkt ist, wurde die Inaktivierung mit der Thiochrom-Methode bestimmt, wobei die Vorlage immer 100 γ Thiamin in 20 ml Gesamtvolumen betrug.

In einer ersten Versuchsreihe wurden je 0,02 mmol m-Nitroanilin bzw. Anilin bzw. Pyridin zu Inaktivierungsgemischen mit 0,3 ml Präparat I A gegeben. Die Resultate dieser Versuche sind in Fig. 15 dargestellt.

Präparat I A inaktivierte rund 65 γ Thiamin. Die Zugabe von 0,02 mmol Anilin erhöhte scheinbar die Inaktivierung um 10 - 15 %, Pyridin um ca. 30 % und m-Nitroanilin um ca. 40 - 45 %. Der Versuch mit m-Nitroanilin wurde wiederholt und ergänzt, indem die Menge Präparat I A bei gleichbleibender m-Nitroanilinkonzentration auf 0,15 ml bzw. 0,08 ml verringert wurde. Zudem wurde auch ein Gemisch ohne Präparat I A untersucht. Die Resultate sind aus Fig. 16 ersichtlich.

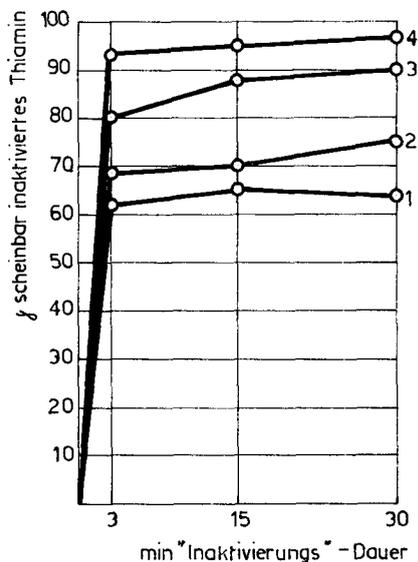


Fig. 15 Scheinbare Aktivität des Präparates I A im Gemisch mit Anilin, Pyridin bzw. m-Nitroanilin, gemessen mit der Thiochrom-Methode nach verschiedener "Inaktivierungs"-Dauer

Vorlage: 100 γ Thiamin; Gesamtvolumen: 20 ml;
 "Inaktivierungs"-Temperatur: 37° C;

<u>Gemisch</u>	<u>Präparat I A</u>	<u>organisches Amin</u>
1	0,3 ml	-
2	0,3 ml	0,02 mmol Anilin
3	0,3 ml	0,02 mmol Pyridin
4	0,3 ml	0,02 mmol m-Nitroanilin

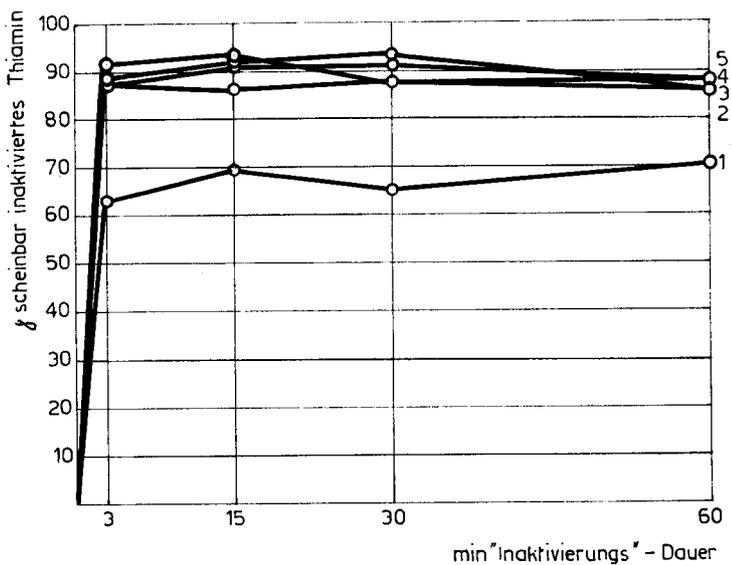


Fig. 16 Scheinbare Aktivität verschiedener Mengen des Präparates I A im Gemisch mit m-Nitroanilin, gemessen mit der Thiochrom-Methode nach verschiedener "Inaktivierungs"-Dauer

Vorlage: 100 μ g Thiamin; Gesamtvolumen: 20 ml;
 "Inaktivierungs"-Temperatur: 37° C;

<u>Gemisch</u>	<u>Präparat I A</u>	<u>m-Nitroanilin</u>
1	0,30 ml	-
2	0,30 ml	0,02 mmol
3	0,15 ml	0,02 mmol
4	0,08 ml	0,02 mmol
5	-	0,02 mmol

Alle Gemische, die m-Nitroanilin enthielten, zeigten die gleiche scheinbare Thiamin-"Inaktivierung", die unabhängig von der Konzentration des Präparates I A war. Selbst das Gemisch, das kein Antithiamin-Präparat enthielt, wies die gleiche scheinbare Thiamin-"Inaktivierung" auf. Das m-Nitroanilin schien allein diese scheinbare Thiamin-"Inaktivierung" zu bewirken. Es wurde deshalb ein weiterer Versuch angesetzt, in dem die Wirkung von m-Nitroanilin allein untersucht wurde. Die 20 ml Versuchsgemische enthielten je 100 γ Thiamin und 0,0003 bis 0,02 mmol m-Nitroanilin. Die Resultate dieser Versuchsreihe sind in Fig. 17 dargestellt.

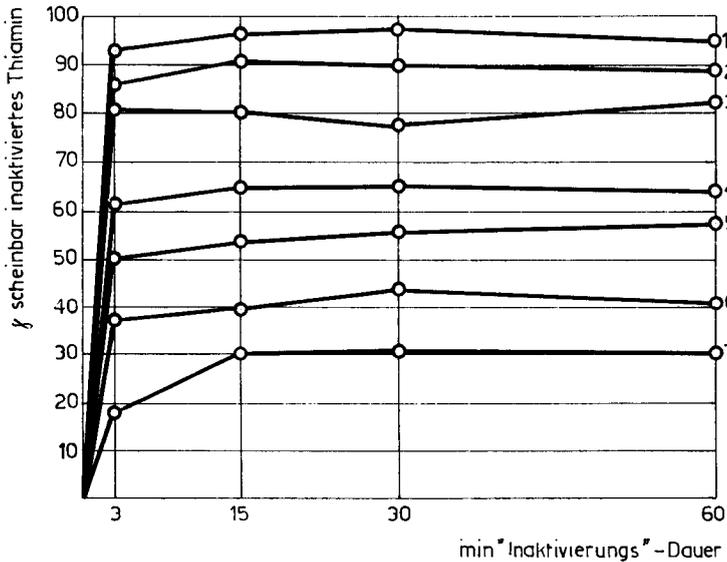


Fig. 17 Scheinbare Thiamin-Inaktivierung durch verschiedene Mengen m-Nitroanilin, gemessen mit der Thiochrom-Methode nach verschiedener "Inaktivierungs"-Dauer

Vorlage: 100 γ Thiamin = 0,0003 mmol; Gesamtvolumen: 20 ml; "Inaktivierungs"-Temperatur: 37^o C;

<u>Gemisch</u>	<u>m-Nitroanilin-Menge</u>
1	0,0200 mmol
2	0,0100 mmol
3	0,0050 mmol
4	0,0025 mmol
5	0,0013 mmol
6	0,0006 mmol
7	0,0003 mmol

Die scheinbare Thiamin-"Inaktivierung" nahm mit der Konzentration des m-Nitroanilins in der Versuchslösung zu. Es wurde also, auch wenn die Versuchsgemische kein Antithiamin-Präparat enthielten, weniger Thiamin in den Versuchslösungen zurückbestimmt, als ursprünglich vorgelegt wurde. Um den Zusammenhang zwischen der m-Nitroanilinkonzentration im Versuchsgemisch und der scheinbaren Thiamin-"Inaktivierung" besser zu erfassen, wurde in Fig. 18 die scheinbare Thiamin-"Inaktivierung" als Funktion der m-Nitroanilinmenge dargestellt. Es wurden die nach 15 Min. "Inaktivierungs"-Dauer bestimmten scheinbaren Thiamin-"Inaktivierungen" aufgezeichnet.

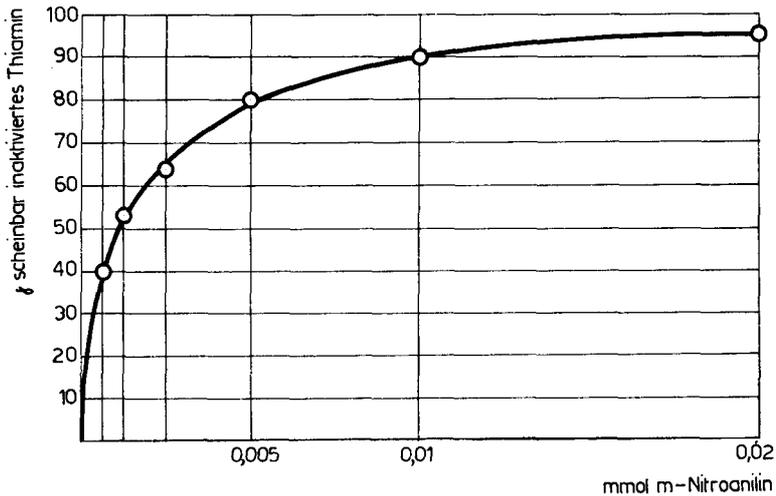


Fig. 18 Scheinbare Thiamin-Inaktivierung durch verschiedene Mengen m-Nitroanilin, gemessen mit der Thiochrom - Methode

Vorlage: 100 γ Thiamin = 0,0003 mmol; Gesamtvolumen: 20 ml;
 "Inaktivierungs"-Dauer: 15 min; "Inaktivierungs"-Temperatur: 37° C

Um die Frage zu klären, ob es sich bei der eben besprochenen Erscheinung um eine tatsächliche Inaktivierung des Thiamins oder lediglich um eine Fälschung (Interferenz) der Thiamin-Bestimmung mit der Thiochrom-Methode handelt, wurde ein Versuchsgemisch mit 100 γ Thiamin

ohne Antithiamin-Präparat und ohne organische Amine hergestellt. Mit je 2 ml dieses Gemisches wurde fünfmal der übliche Analysengang zur Thiamin-Bestimmung nach der Thiochrom-Methode durchgeführt. Die resultierenden Lösungen wurden vereinigt und ergaben die 100- γ -Thiochrom-Test-Lösung. Ferner wurde je ein Versuchsgemisch mit 0,02 mmol der drei untersuchten organischen Amine hergestellt. Diese Gemische enthielten weder Thiamin noch Antithiamin-Präparat. Mit je 2 ml dieser Proben wurde ebenfalls der "Thiochrom-Analysengang" ausgeführt. Daraus wurden die Lösungen der "oxydierten" organischen Amine erhalten. Nun wurden die Lösungen der "oxydierten" organischen Amine mit der 100- γ -Thiochrom-Test-Lösung im Verhältnis 1:1 gemischt. Von diesen Gemischen wurde die Fluoreszenz gemessen. Als Vergleichslösung diente ein Gemisch von reinem Isobutylalkohol und 100- γ -Thiochrom-Test-Lösung im Verhältnis 1:1. Die Lösungen mit den "oxydierten" organischen Aminen wiesen eine geringere Fluoreszenz als die Vergleichslösung auf. In Gegenwart der "oxydierten" Amine gibt also die Thiochrom-Ablesung zu kleine Werte und bei der Thiamin-Bestimmung wurde dadurch eine Inaktivierung von Thiamin vorgetäuscht. In Wirklichkeit wurde die Thiochrom-Ablesung gesenkt.

Als Kontrolle wurde ein Versuchsgemisch mit Antithiamin-Präparat allein hergestellt. Mit je 2 ml dieser Lösung wurde zweimal der Analysengang zur Thiamin-Bestimmung nach der Thiochrom-Methode durchgeführt. Die resultierenden Isobutylalkohollösungen wurden mit einer 100- γ -Thiochrom-Test-Lösung (s. o.) im Verhältnis 1:1 gemischt. Von diesen Lösungen konnten die wahren Thiochrom-Werte bestimmt werden. "Oxydiertes" Antithiamin-Präparat allein senkt demnach die Thiochrom-Ablesung nicht.

Die Ergebnisse der Versuche mit den "oxydierten" organischen Aminen sind in Fig. 19 zusammengestellt. Kolonne 1 gibt die Thiamin-Inaktivierung durch 0,3 ml Präparat I A allein an, Kolonne 2 die scheinbare Thiamin-"Inaktivierung" durch ein Gemisch von 0,3 ml Präparat I A und 0,02 mmol organischem Amin, Kolonne 3 die scheinbare Thiamin-"Inaktivierung" durch 0,02 mmol organisches Amin allein und Kolonne 4 die Senkung der Thiochrom-Ablesung durch 0,02 mmol organisches Amin.

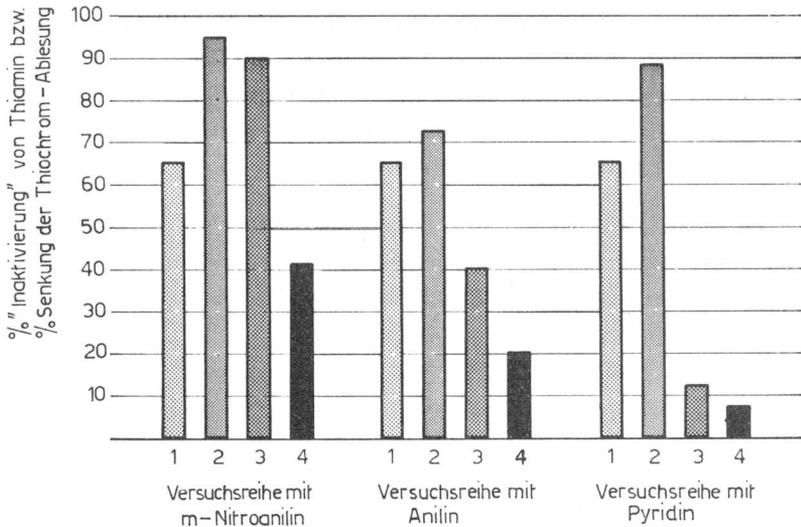


Fig. 19 Echte und scheinbare Thiamin-Inaktivierung durch das Präparat I A und organische Amine, allein und im Gemisch, gemessen mit der Thiochrom-Methode, sowie Senkung der Thiochrom-Ablesung durch die organischen Amine

Vorlage: 100 γ Thiamin; Gesamtvolumen: 20 ml;
 "Inaktivierungs"-Temperatur: 37^o C;

- 1: Thiamin-Inaktivierung durch 0,3 ml Präparat I A;
- 2: Thiamin-"Inaktivierung" durch ein Gemisch von 0,3 ml Präparat I A und 0,02 mmol organischem Amin;
- 3: Thiamin-"Inaktivierung" durch 0,02 mmol organisches Amin;
- 4: Senkung der Thiochrom-Ablesung durch 0,02 mmol organisches Amin

Bei den Versuchsreihen mit m-Nitroanilin und Anilin ist die Summe von Kolonne 1 und 4 grösser als Kolonne 2. Die scheinbar höhere Thiamin-"Inaktivierung" im Gemisch mit Antithiamin-Präparat und organischem Amin (Kolonne 2) gegenüber der Thiamin-Inaktivierung im Gemisch mit Antithiamin-Präparat allein (Kolonne 1) wurde somit durch die Senkung der Thiochrom-Ablesung (Kolonne 4) bewirkt. Die Thiamin-Inaktivierung durch die Antithiamin-Wirkstoffe aus Adlerfarn wird demnach durch m-Nitroanilin und Anilin nicht gefördert. Die Versuchsreihe mit Pyridin hat gezeigt, dass eine Förderung der Thiamin-Inaktivierung durch die Antithiamin-Wirk-

stoffe aus Adlerfarnkraut durch Pyridin möglich zu sein scheint. Die scheinbare Thiamin-"Inaktivierung" durch Pyridin allein (Kolonne 3) und die Senkung der Thiochrom-Ablesung durch Pyridin (Kolonne 4) sind gering, während die Differenz der Thiamin-Inaktivierung durch ein Gemisch von Präparat I A und Pyridin (Kolonne 2) beträchtlich ist.

Die Senkung der Thiochrom-Ablesung durch die "oxydierten" organischen Amine wurde in verschiedenen Konzentrationen gemessen. Die Resultate dieser Versuche sind in Fig. 20 dargestellt.

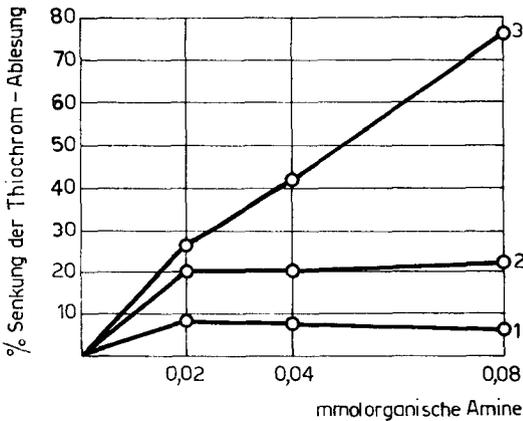


Fig. 20 Senkung der Thiochrom-Ablesung durch verschiedene Mengen von organischen Aminen

Thiochrom-Gehalt: 50 γ ; Gesamtvolumen: 20 ml;

- 1: Versuchsreihe mit Pyridin;
- 2: Versuchsreihe mit Anilin;
- 3: Versuchsreihe mit m-Nitroanilin

Die Senkung der Thiochrom-Ablesung durch m-Nitroanilin nimmt mit der Konzentration annähernd linear zu, während sie bei Lösungen mit grösseren Konzentrationen als 0,0005-m. Anilin bzw. Pyridin konstant bleibt.

Es wurde vermutet, dass die organischen Amine bei der Thiamin-Bestimmung mit dem Thiochrom zusammen auch in die Messlösung gelangen. Falls die "oxydierten" organischen Amine UV-Licht absorbieren, gelangt weniger UV-Licht an die Messtelle als oben eingestrahlt wird. Die dort erzeugte Fluoreszenz, die in der Fotozelle gemessen wird, wird somit geringer, die Thiochrom-Ablesung wird gesenkt. (Vgl. dazu Fig. 1, Schnitt durch das Fluorimeter.)

Um diese Annahme zu beweisen, wurden 0,001-m. Versuchslösungen der drei organischen Amine (je 0,02 mmol in 20 ml Gesamtvolumen) hergestellt. Je 2 ml wurden direkt mit Isobutylalkohol ausgeschüttelt und je 2 ml wurden wie bei der Thiamin-Bestimmung vorher mit Kaliumferricyanid und Natronlauge behandelt. Von den resultierenden Lösungen wurde die UV-Absorption zwischen den Wellenlängen 300 und 400 m μ gemessen. Die Absorptionskurven der Isobutanolauszüge aus wässriger Aminlösung sind in Fig. 21 a und die nach Behandlung mit Kaliumferricyanid und Natronlauge in Fig. 21 b dargestellt.

Die Absorptionskurven von m-Nitroanilin und Anilin wurden durch die Behandlung mit Kaliumferricyanid und Natronlauge wesentlich verändert, die von Pyridin dagegen nicht. Die Senkung der Thiochrom-Ablesung ist auf die Absorption der behandelten organischen Amine bei der Wellenlänge 365,5 m μ zurückzuführen, da die verwendete Philips-UV-Lampe HPW, 125 W, Typ 57 202 E/70, eine Emissionsbande mit dem Maximum bei dieser Wellenlänge hat. Die Absorption bei 365,5 m μ der mit Kaliumferricyanid und Natronlauge behandelten Amine betragen für m-Nitroanilin 44 %, für Anilin 10 % und für Pyridin 4 % (vgl. Fig. 21 b). Die Thiochrom-Ablesung wurde von m-Nitroanilin um 41 %, von Anilin um 20 % und von Pyridin um 6 % gesenkt. Es ist somit bewiesen, dass die Senkung der Thiochrom-Ablesung durch m-Nitroanilin und Anilin mit der Absorption dieser Amine bei 365,5 m μ zu erklären ist.

In diesem Zusammenhang ist es interessant zu erwähnen, dass das Beersche-Gesetz bei der UV-Absorption von m-Nitroanilin annähernd gilt, dagegen bei Anilin und Pyridin nicht (vgl. Fig. 20).

In einer nächsten Versuchsreihe wurden vier 20-ml-Inaktivierungsgemische mit je 1000 γ Thiamin und 0,5 ml Präparat IA hergestellt.

Fig. 21a

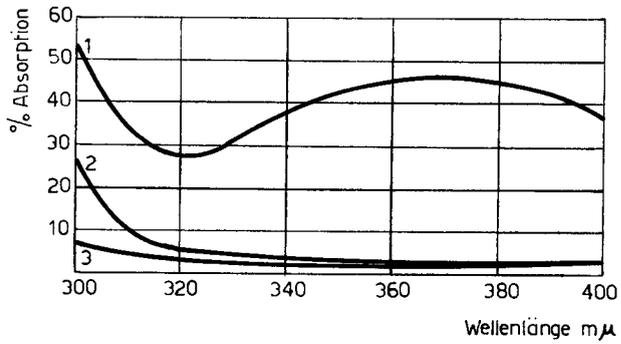


Fig. 21b

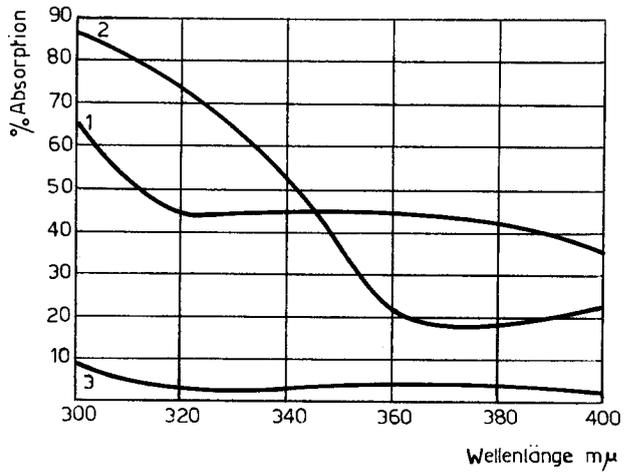


Fig. 21 UV-Absorption organischer Amine

- a Isobutanolauszug aus wässriger Aminlösung
- b Isobutanolauszug aus wässriger Aminlösung nach Behandlung mit Kaliumferricyanid und Natronlauge

Gesamtvolumen: 20 ml; Amin-Menge: 0,02 mmol;

1: m-Nitroanilin;

2: Anilin;

3: Pyridin

Zu dreien dieser Gemische wurde noch je 0,02 mmol eines organischen Amins gegeben. Die Thiamin-Inaktivierung wurde mit der Melnick-Field-Methode gemessen. Die Resultate dieser Versuchsreihe sind in Fig. 22 dargestellt.

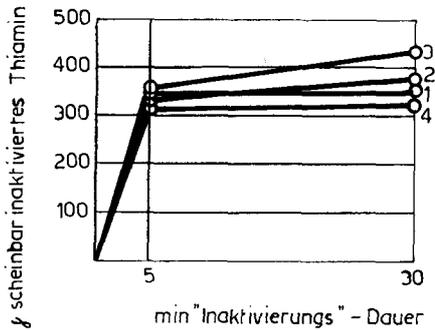


Fig. 22 Scheinbare Aktivität des Präparates IA im Gemisch mit Anilin, Pyridin bzw. m-Nitroanilin, gemessen mit der Melnick-Field-Methode nach verschiedener "Inaktivierungs"-Dauer

Vorlage: 1000 γ Thiamin; Gesamtvolumen: 20 ml;
 "Inaktivierungs"-Temperatur: 37° C;

Gemisch	Präparat I A	organisches Amin
1	0,5 ml	-
2	0,5 ml	0,02 mmol Anilin
3	0,5 ml	0,02 mmol Pyridin
4	0,5 ml	0,02 mmol m-Nitroanilin

Durch die Bestimmungen nach der Melnick-Field-Methode wurde eine Fälschung der Thiamin-Bestimmung durch die organischen Amine ausgeschlossen, da als Vergleichslösung ein Versuchsgemisch mit organischem Amin und Präparat I A aber ohne Thiamin verwendet wurde. Die Versuche haben denn auch gleiche Ergebnisse wie die frühern ergeben, nämlich, dass m-Nitroanilin und Anilin die Thiamin-Inaktivierung durch die Antithiamin-Wirkstoffe aus Adlerfarnkraut nicht fördern, dass aber eine geringe Förderung der Thiamin-Inaktivierung durch Pyridin möglich scheint.

Aebi (1956) und Büchi (1957) isolierten durch Aetherextraktion aus den Wurzeln von *Dryopteris austriaca* (Jacq.) Wäynar neben den bereits bekannten Verbindungen Aspidin, Albaspidin, Flavaspidsäure, Filixsäure und Aspidinol eine bis anhin noch unbekannte Substanz, das Desaspidin. Von Aspidin, Flavaspidsäure und Filixsäure¹⁾ wurde die spezifische Antithiamin-Aktivität mit je 3,6 mg bestimmt. Die Vorlage betrug immer 100 γ Thiamin in 20 ml Gesamtvolumen. Es wurden folgende spezifische Aktivitäten gefunden:

Aspidin: 13,8 γ /mg; Flavaspidsäure: 14,6 γ /mg und
Filixsäure: 3,1 γ /mg.

Es wurden auch zwei im Handel befindliche Flavonoide, Quercetin und Quercitrin, auf ihre Antithiamin-Wirkung untersucht. Die spezifische Aktivität von Quercetin betrug 20,3 γ /mg, die von Quercitrin 15,6 γ /mg.

Crotonsäure, Metacrylsäure und α -Ketocaprylsäure sind völlig inaktiv.

Von Brenzkatechin wurde sowohl die spezifische Aktivität als auch die Halbwert-Aktivität bestimmt. Beide Bestimmungen ergaben eine sehr hohe Antithiamin-Aktivität. Die spezifische Aktivität betrug 26 γ /mg und die Halbwert-Aktivität 110. Dieser Wert ist mit den in Fig. 10 angegebenen Halbwert-Aktivitäten der verschiedenen Antithiamin-Präparate aus Farnkraut vergleichbar.

¹⁾Herr Prof. Dr. J. Büchi, Pharmazeutisches Institut, Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich, stellte diese Substanzen freundlicherweise zur Verfügung. Ich danke ihm dafür.

41 Ausgangsmaterialien der Antithiamin-Wirkstoffe

Für die vorliegenden Versuche wurde *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn, nach Somogyi (1949b) das aktivste Farnkraut, verwendet. Nach Vorversuchen sind Extrakte aus Fiedern doppelt so aktiv wie solche aus Stielen. Es wurden deshalb nur die Blattfiedern verwendet. Die Ernten des gleichen Farnkrautbestandes der Jahre 1956 bis 1959 zeigten in der Antithiamin-Aktivität keinen Unterschied.

42 Bestimmung der Aktivität der Antithiamin-Wirkstoffe

Die Thiamin-Bestimmungen wurden in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich mit der Thiochrom-Methode durchgeführt. Sie ist sehr empfindlich. Werden die in Abschnitt 52 beschriebenen Reaktionszeiten genau eingehalten, so ergibt die Thiochrom-Methode gut reproduzierbare Resultate. Ist die Thiamin-Konzentration in einem Versuchsgemisch grösser als 100 γ Thiamin pro 20 ml, so muss die Thiochrom-Messlösung verdünnt werden, da die Ablesungen mit dem verwendeten Fluorimeter sonst ungenau werden.

Die bei der Thiamin-Bestimmung nach der Thiochrom-Methode verwendete Natronlauge könnte die Bestimmungen aus zwei Gründen stören. Einerseits ist der Antithiamin-Wirkstoff gegen Alkali labil (vgl. Abschnitt 342) und andererseits könnte die Natronlauge durch einen Salzeffekt die Thiamin-Antithiamin-Wirkstoff-"Additionsverbindung" spalten. Die zerstörende Wirkung der Natronlauge auf den Antithiamin-Wirkstoff kann ausgeschlossen werden, da die Inaktivierung vor der Thiamin-Bestimmung bereits beendet ist. Dagegen ist es möglich, dass die "Additionsverbindung" während der Thiamin-Bestimmung durch die Natronlauge teilweise gespalten wird. Nach der Spaltung würde das entstandene Thiamin auch zu Thiochrom oxidiert und mit dem nicht-inaktivierten Thiamin bestimmt. Den gleichen Effekt könnte das bei der Thiochrom-Methode verwendete Kochsalz hervorrufen, da das Kochsalz, falls dem Inaktivierungsgemisch zugegeben, die Thiamin-Inaktivierung hemmt (vgl. Abschnitt 352). Mit der Thiochrom-Methode würde man somit eine geringere als die tatsächliche Wirksamkeit der Antithiamin-Wirkstoffe bestimmen. Es ist allerdings darauf hinzuweisen, dass die mikrobiologische Bestimmung der Antithiamin Aktivität der verschiedenen Farnkraut-Präparate (Bönicke, 1959) mit der Thiochrom-Methode gut übereinstimmende Resultate ergeben hat.

Zur Thiamin-Bestimmung nach der Melnick-Field-Methode werden grössere Mengen Thiamin benötigt, doch ergibt sie bei geeigneten Konzentrationen gute Resultate. Sie wurde bei den Versuchen mit organischen Aminen verwendet.

Die mikrobiologischen Thiamin-Bestimmungen haben mit der Thiochrom-Methode gut übereinstimmende Resultate ergeben. Ihr Nachteil liegt darin, dass sich eine Bestimmung über mehrere Tage erstreckt. Als Kontrollversuche sind die mikrobiologischen Thiamin-Bestimmungen aber sehr wertvoll.

Die Aktivität (angegeben in % inaktiviertem Thiamin) eines Antithiamin-Präparates ist innerhalb eines Versuches vergleichbar, z. B. die Aktivität vor und nach dem Kochen eines Antithiamin-Präparates. Es sollen aber nicht die Aktivitäten verschiedener Antithiamin-Präparate verglichen werden.

Die spezifische Aktivität wurde nach einer genau standardisierten Methode bestimmt. Die Reinigung eines Antithiamin-Präparates wird durch eine höhere spezifische Aktivität angezeigt, die jedoch im Verhältnis zur tatsächlich erzielten Reinigung gering ist. Die spezifische Aktivität wurde zur Kontrolle auch mikrobiologisch bestimmt. Diese Werte stimmten mit den nach der Thiochrom-Methode bestimmten spezifischen Aktivitäten gut überein.

Quantitativ gut vergleichbar sind die Halbwert-Aktivitäten. Sie werden aus den Halbwert-Mengen berechnet. Aus 4 bis 5 Bestimmungen mit verschiedenen Mengen Antithiamin-Präparat wird die Halbwert-Menge interpoliert. Sie ist die Menge eines Antithiamin-Präparates, die von 100 γ Thiamin 50 γ inaktiviert. Die Bestimmung der Halbwert-Aktivität erfordert grössere Mengen Antithiamin-Präparat. Sie wurde deshalb nur dann angewendet, wenn man die Erhöhung der Antithiamin-Wirkung bzw. die Reinigung eines Präparates quantitativ feststellen wollte. Meistens genügte jedoch die Bestimmung der spezifischen Aktivität.

43 Reinigung der Antithiamin-Wirkstoffe

Da die Antithiamin-Wirkstoffe aus Adlerfarn im elektrischen Feld anodisch wandern, wurden sie aus wässrigen Extrakten an Anionenaustau-

schersäulen in der Formiatform adsorbiert und mit Ameisensäure steigender Konzentration eluiert. Die Antithiamin-Wirkstoffe wurden nach der Behandlung mit 1-n. Salzsäure ätherlöslich, nachdem sie vorher nur wasser- und alkohollöslich waren. Der Natriumbikarbonatauszug einer ätherischen Lösung der Antithiamin-Wirkstoffe nach der Behandlung mit 1-n. Salzsäure ergab ein sehr aktives Präparat. Die Halbwert-Aktivität dieses Präparates war rund 60-mal grösser als die des Ausgangsmateriales. Dieses Präparat konnte nicht kristallisiert werden. Es war sehr hygroskopisch. Eine weitere Reinigung konnte durch Fraktionierung an einer Cellulosepulversäule bzw. an einer Kationenaustauschersäule erzielt werden. Die aktivsten Fraktionen aus der Kationenaustauschersäule ergaben glasartige Plättchen. Durch eine zweite Fraktionierung an Kationenaustauscher wird die Aktivität nicht mehr erhöht. Die Adsorption und Elution der Antithiamin-Wirkstoffe an Kationenaustauschersäulen sind keine Ionenaustausch-Reaktionen.

Die gleichen, glasartigen Plättchen wurden auch aus einem Brucin-salz des Antithiamin-Wirkstoffes nach der Adsorption des Brucins an einer Kationenaustauschersäule und Elution des Wirkstoffes mit 30-proz. Äthanol erhalten.

Nach papierchromatographischen Untersuchungen sind in einem an einer Anionenaustauschersäule gereinigten Antithiamin-Präparat zwei Wirkstoffe enthalten, während nach der Behandlung mit 1-n. Salzsäure auf dem Papierchromatogramm nur noch ein Wirkstoff sichtbar ist. Es ist möglich, dass der eine Wirkstoff durch die Behandlung mit 1-n. Salzsäure zerstört wurde oder aber dass zwei Wirkstoffe durch diese Behandlung in die gleiche Verbindung überführt wurden (z. B. zwei Glykoside mit gleichem Aglykon hydrolysiert wurden). Tatsächlich ist nach der Behandlung der Antithiamin-Wirkstoffe mit Salzsäure im wässrigen (ätherunlöslichen) Anteil Glucose chromatographisch nachweisbar.

Das UV-Spektrum des gereinigten Antithiamin-Präparates zeigt bei 285 m μ ein Maximum, das umso ausgeprägter ist, je aktiver das Präparat ist. Das gereinigte Antithiamin-Präparat ist sauer, entfärbt eine verdünnte Bromlösung und gibt mit Silbernitrat einen schwarzen Niederschlag. Es verbraucht keine Perjodsäure. Mit Ferrichlorid ergibt das gereinigte Antithiamin-Präparat eine grüne Farbe. Es ist frei von Stickstoff, Phosphor, Schwefel und Halogenen. Die Mikroanalyse ergab im Mittel 61,52 % C und

5,55 % H. Der Wirkstoff konnte jedoch nicht in kristalliner Form isoliert werden. Der von Ågren (1945) aus Espenblätter isolierte Antithiamin-Wirkstoff hat ähnliche Eigenschaften wie unser aus Adlerfarnkraut isoliertes Präparat. Die von Aebi (1956) und Büchi (1957) aus den Wurzeln von *Dryopteris austriaca* isolierten Substanzen wurden aus Ätherextrakten gewonnen, während unsere Antithiamin-Wirkstoffe vor der Behandlung mit 1-n. Salzsäure ätherunlöslich waren. Die Antithiamin-Wirkstoffe aus Adlerfarn scheinen demnach von den von Aebi und Büchi isolierten Filicinen verschieden zu sein. Sakamoto und Fujita (1956) isolierten aus den Blättern von *Ipomoea Batata* Isoquercitrin, Hasegawa (1955) aus *Pteridium aquilinum* eine dem Astragalin verwandte Verbindung. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Antithiamin-Wirkstoffe aus Adlerfarnkraut scheinen sich auch von diesen Verbindungen zu unterscheiden. Durch die Behandlung mit Salzsäure würden diese Verbindungen wohl gespalten werden, und es müsste Quercetin erhalten werden. Die Antithiamin-Wirkstoffe aus Adlerfarn ergeben nach der Behandlung mit Salzsäure jedoch nicht Quercetin. Nach der berechneten, jedoch noch nicht sichergestellten Bruttoformel des gereinigten Antithiamin-Wirkstoffes könnte das Präparat X jedoch eine dem Quercetin ähnliche Verbindung sein, die eine Hydroxylgruppe weniger besitzt und teilweise hydriert ist.

Evans, Jones und Evans (1950) sowie Thomas, Watkin und Evans (1955) haben die Versuche zur Trennung der Antithiamin-Wirkstoffe aus Adlerfarnkraut in eine thermolabile und eine thermostabile Fraktion nie ausführlich mit experimentellen Angaben veröffentlicht, sie sind somit schwer zu beurteilen. Kenten (1957a) isolierte einen thermolabilen Antithiamin-Wirkstoff aus getrocknetem Adlerfarn-Pulver durch eine "Eiweisspräparation". Auch dieser Wirkstoff dürfte von den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Antithiamin-Wirkstoffen verschieden sein. Nach der Mikroanalyse des gereinigten Antithiamin-Präparates scheint sich dieses auch von Pentahydroxyanthrachinon zu unterscheiden, das Nakabayashi (1957) aus *Equisetum arvense* isolierte.

44 Stabilität der Antithiamin-Wirkstoffe

Die wasserlöslichen Antithiamin-Wirkstoffe aus Adlerfarnkraut sind thermostabil. Ein thermolabiler Wirkstoff, wie er von Evans, Jones und Evans (1950) sowie von Kenten (1957a) beschrieben wurde, konnte in einem wässrigen Extrakt aus Adlerfarnkraut nicht gefunden werden.

Die Aktivität der Antithiamin-Wirkstoffe nimmt bei pH über 6 rasch ab (vgl. Fig. 11), während sie bei pH unter 6 unverändert bleibt. Der von Ågren (1945) aus Blätter von *Populus tremula* L. isolierte Wirkstoff ist ebenfalls gegen Säure stabil, gegen Lauge aber empfindlich.

45 Wirkungsmechanismus der Antithiamin-Wirkstoffe

Die Inaktivierungs-Versuche mit verschiedenen Wirkstoff-Mengen haben gezeigt, dass die Inaktivierung nicht linear mit der Wirkstoff-Menge zunimmt (vgl. Fig. 12 a). Das nicht-inaktivierte Thiamin als Funktion der Antithiamin-Präparat-Menge ergibt eine "Exponential-Funktion", ihre logarithmische Darstellung eine Gerade (Fig. 12 b). Kurve 1 zeigt in der numerischen Darstellung (Fig. 12 a), dass durch 1,5 ml Präparat I A schon praktisch alles vorgelegte Thiamin inaktiviert wurde. Das Gemisch mit der grössten Konzentration (3,0 ml) Präparat I A enthielt schon einen Überschuss an Antithiamin-Präparat. Kurve 1 weicht deshalb in der logarithmischen Darstellung (Fig. 12 b) von einer Geraden ab.

Eine bestimmte Menge eines Antithiamin-Präparates inaktiviert von verschiedenen Thiamin-Vorlagen innerhalb weiter Grenzen stets einen gleichen prozentuellen Anteil des vorgelegten Thiamins (vgl. Fig. 13). Mikrobiologische Bestimmungen ergeben dasselbe Resultat. Eine Erklärung dafür konnte nicht gefunden werden.

Durch Inaktivierungs-Versuche mit der gleichen Thiamin-Vorlage und gleicher Antithiamin-Präparat-Menge in verschiedenen Gesamtvolumina wurde gezeigt, dass in konzentrierten Gemischen die Thiamin-Inaktivierung geringer ist. Dies kann durch einen Salzeffekt erklärt werden.

Auf Grund dieser Versuche wurde die Aktivitäts-Bestimmung der Antithiamin-Präparate standardisiert (vgl. Abschnitt 32). Die Erscheinung, dass die spezifische Aktivität eines reinen Präparates relativ klein ist, kann damit erklärt werden, dass die gleiche Menge (3,6 mg) eines reineren Präparates mehr Antithiamin-Wirkstoffe enthält als ein unreineres Präparat, das in der gleichen Menge noch mehr Verunreinigungen aufweist. Die Aktivität nimmt nicht linear mit der Wirkstoffanreicherung, sondern nur proportional zu ihrem Logarithmus, zu.

Wurde zu Inaktivierungsgemischen Kochsalz gegeben, so nahm die Inaktivierung proportional zur Kochsalzkonzentration ab. Ein mögliches Gleichgewicht

Thiamin + Antithiamin-Wirkstoff \rightleftharpoons "Additions"-Verbindung
würde also durch Kochsalz nach links verschoben.

Versuche unter Stickstoffatmosphäre haben ergeben, dass die Thiamin-Inaktivierung durch die Wirkstoffe aus Adlerfarnkraut keine katalytische Oxydation mit Luftsauerstoff ist, wie dies nach Weakley et al. (1958) bei der Thiamin-Inaktivierung durch Wirkstoffe aus Sojabohnenmehl (*Glycine hispida*) zutrifft.

Die Isolierung des Pikrates der Thiazol-Komponente des Thiamins aus Inaktivierungsgemischen mit den Antithiamin-Wirkstoffen aus Adlerfarnkraut gelang nicht. Dagegen konnten Krampitz und Woolley (1944) dieses Pikrat aus Inaktivierungsgemischen mit Karpfeneingeweide-Extrakt isolieren und damit die Spaltung des Thiamins durch den Karpfeneingeweide-Extrakt beweisen. Die Inaktivierung des Thiamins durch die Antithiamin-Wirkstoffe aus Adlerfarnkraut scheint demnach keine Spaltung des Thiamin-Moleküls zu sein. Diese Annahme konnte experimentell bewiesen werden. Es gelang nämlich, aus Inaktivierungsgemischen, in denen bis zu 86 % des vorgelegten Thiamins inaktiviert worden waren, an Ionenaustauschersäulen wieder bis zu 100 % der ursprünglichen Thiamin-Menge abzutrennen.

An Anionenaustauscher wurden die Antithiamin-Wirkstoffe adsorbiert, und das Thiamin konnte im wässrigen Eluat bestimmt und papierchromatographisch identifiziert werden. An Kationenaustauscher wurden das Thiamin und die Antithiamin-Wirkstoffe adsorbiert. Nachdem die Antithiamin-Wirkstoffe mit 30-proz. Äthanol eluiert worden waren, liess sich das Thiamin mit 2-n. Salzsäure eluieren und bestimmen. Nach diesen Versuchen, die beweisen, dass das Thiamin-Molekül bei der Inaktivierung nicht verändert wird, war es wichtig, die mit der Thiochrom-Methode bestimmte Antithiamin-Wirkung der Wirkstoffe aus Adlerfarnkraut auch auf eine andere Art nachzuweisen. Dies gelang einerseits durch die mikrobiologischen Bestimmungen von Bönicke, die mit der Thiochrom-Methode gut übereinstimmende Resultate ergaben, und andererseits durch Versuche von Petropulos (1960) an Nervfasern des Frosches.

Von Muralt (1939) fand, dass das Thiamin bei der Nervenerregung

eine wichtige Rolle spielt und dass diese Wirkung mit dem Natriumtransportsystem zusammenhängt (1958). Petropulos (1960) hat die Wirkung von Präparat IV und V auf Ranviersche Knoten einer Nervfaser des Frosches geprüft und eine sofortige Abnahme des Aktionspotentials festgestellt, ähnlich wie bei der Verwendung von Neopyrithiamin. Präparat V zeigte eine stärkere Wirkung als Präparat IV. Wurde den Präparaten IV und V vor dem Versuch ein Überschuss an Thiamin zugegeben, so konnte diese Wirkung nicht beobachtet werden. Dies beweist die Antithiamin-Wirkung dieser Präparate. Die Wirkung von Präparat IV und V kann durch längeres Auswaschen der Ranvierschen Knoten mit Ringerlösung ohne Thiamin-Zugabe wieder rückgängig gemacht werden. Die Thiamin-Inaktivierung durch die Präparate aus Adlerfarnkraut ist also auch im physiologischen Versuch reversibel; das Thiamin-Molekül wird bei der Inaktivierung offensichtlich nicht verändert.

Bei den Thiamin-Inaktivierungsversuchen konnte beobachtet werden, dass die Inaktivierungsreaktion sehr schnell verläuft. Die Inaktivierungsreaktion war z. B. nach 3 Minuten praktisch schon beendet (vgl. Fig. 15, Kurve 1). Der rasche Ablauf dieser Reaktion dürfte ebenfalls ein Hinweis auf die Bildung einer Additionsverbindung sein.

Die Inaktivierung von Thiamin durch die Antithiamin-Wirkstoffe aus Adlerfarnkraut wird weder durch m-Nitroanilin, noch durch Anilin erhöht. Pyridin scheint dagegen die Thiamin-Inaktivierung ein wenig zu erhöhen. Die Thiamin-Bestimmungen wurden bei diesen Versuchen mit der Thiochrom-Methode und mit der Melnick-Field-Methode durchgeführt. Die Erhöhung der Thiamin-Inaktivierung bei der Bestimmung mit der Thiochrom-Methode wird durch die Lichtabsorption der Amine vorgetäuscht. Sealock und Davis (1949) und Woolley (1953) nahmen an, dass organische Amine bei der Thiamin-Inaktivierungsreaktion eine wesentliche Rolle spielen. Dies konnte durch unsere Versuche nicht bestätigt werden.

Brenzkatechin zeigt von allen untersuchten Verbindungen die grösste Antithiamin-Wirkung. Dieser Befund stimmt mit dem von Hasegawa (1955) und Hasegawa, Sakamoto, Nagayama und Fujita (1956) gut überein, die ebenfalls fanden, dass Brenzkatechin die grösste Antithiamin-Aktivität aller freien Phenole besitzt. Der von Sakamoto und Fujita (1956) aus den Blättern von Ipomoea Batata (Süßkartoffeln) isolierte Antithiamin-Wirkstoff (Isoquercitrin) ist 76-mal weniger aktiv als das Brenzkatechin. Das Präparat V

aus *Pteridium aquilinum* (vgl. S.34) ist rund zweimal weniger aktiv als das Brenzkatechin.

Die spezifische Antithiamin-Aktivität der Vergleichssubstanzen Quercetin, Quercitrin, Flavaspidsäure und Aspidin ist bedeutend bis mittelmäßig. Die Filixsäure hat dagegen nur eine sehr kleine Antithiamin-Wirkung. Völlig inaktiv sind Crotonsäure, Metacrylsäure und α -Ketocaprylsäure. Die Carboxyl-Gruppe allein scheint keine Antithiamin-Wirkung zu haben, während Hydroxyl-Gruppen an einem Benzolring für die Aktivität wesentlich zu sein scheinen. Solche sind bei allen besprochenen aktiven Verbindungen vorhanden. Dagegen scheinen Hydroxyl-Gruppen an isolierten Doppelbindungen, wie sie die Filixsäure besitzt, nur sehr wenig aktiv zu sein.

Die Versuche zur weiteren Abklärung der chemischen Konstitution der Antithiamin-Wirkstoffe aus *Pteridium aquilinum* werden weitergeführt.

5 Experimenteller Teil

51 Herstellung der Ausgangsmaterialien der Antithiamin-Wirkstoffe

Das Adlerfarnkraut wurde sofort nach der Ernte im Windkanal bei 40°C getrocknet. Von den trockenen Farnwedeln wurden die Fiedern 2. Ordnung von Hand abgestreift. 50 g Fiedern wurden portionsweise zu 500 ml destilliertem Wasser in einen auf höchste Stufe eingestellten Haushaltnixer (Turmix) gegeben. Nach 5 bis 8 Min. waren die Fiedern zu einem feinen Brei zerkleinert. Dabei erwärmte sich das Gemisch auf ca. 60°C. Über Nacht wurde es im Eisschrank stehen gelassen. Am andern Tag wurde der Brei durch ein Filtertuch filtriert und ausgepresst. Die Lösung wurde ca. 30 Min. mit 3000 g zentrifugiert, wobei die chlorophyllhaltigen Anteile ausgeschieden wurden. Die Lösung wurde durch Watte filtriert. Die Ausbeute betrug 340 ml trüben Rohextrakt → Präparat I A.

40 ml Präparat I A wurden bei +4°C aus einem nahtlosen Cellulose-Schlauch vom Durchmesser 48 mm (Kalle & Co., Wiesbaden) gegen 400 ml destilliertes Wasser 48 Std. dialysiert. Der nicht-dialysierbare Anteil (→ Präparat I C) wurde aus dem Cellulose-Schlauch gespült und am Vakuum auf 40 ml eingengt. Der dialysierbare Anteil (→ Präparat I B) wurde in einem Rotationsverdampfer bei 40-50°C am Vakuum auf 40 ml eingengt.

52 Bestimmung der Aktivität der Antithiamin-Wirkstoffe

Zur Bestimmung der Aktivität der Präparate I A, I B und I C mit der Thiochrom-Methode wurden in 25-ml-Erlenmeyerkölbchen Thiamin-Inaktivierungsgemische folgender Zusammensetzung hergestellt:

Präparat I A bzw. I B bzw. I C :	0,3 - 5 ml
destilliertes Wasser :	16,7 - 12 ml
Phosphatpuffer pH 6 (nach Sörensen) 1/15-m.:	2 ml
0,01-proz. Thiamin-Lösung:	<u>1 ml</u>
Gesamtvolumen:	20 ml

Nach verschiedenen Reaktionszeiten (z. B. 5 Min. und 30 Min.) wurden Analysen-Proben von je 2 ml in mit ca. 0,2 g Kochsalz beschickte 20-ml-Schliffzentrifugengläser gegeben. Zu jeder Analysen-Probe wurden 0,1 ml 1-proz. Kaliumferricyanidlösung und 1 ml 30-proz. Natronlauge gegeben. Die Analysenproben wurden geschüttelt. Nach einer Min. wurden je 10 ml

Isobutanol zugegeben, ohne die Gläser zu schütteln. Nach dem Stehen während einer Min. wurden die Gemische 2 Min. lang ausgeschüttelt. Die Gemische wurden 5 Min. zentrifugiert. Die Isobutanollösung wurde abpipettiert und filtriert. Die Reaktionszeiten wurden mit der Stoppuhr gemessen. Die Fluoreszenz wurde mit einem Fluorimeter, das aus einem Beckman-Kolorimeter (Modell C) entwickelt wurde, bestimmt (siehe Fig. 1). Das Fluorimeter wurde mit 50- γ - und 100- γ -Testlösungen geeicht. Die Aktivität wurde als Prozent inaktivierten Thiamins angegeben.

• Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität (γ /mg) der Präparate III bis X wurden Thiamin-Inaktivierungsgemische mit je 3,6 mg Antithiamin-Wirkstoffpräparat und 100 γ Thiamin (1 ml 0,01-proz. Thiamin-Lösung) hergestellt. Die Thiamin-Inaktivierungsgemische enthielten 2 ml 1/15-m. Phosphatpuffer pH 6. Das Gesamtvolumen betrug 20 ml. Die Analysen wurden mit Proben von je 2 ml genau gleich wie zur Bestimmung der Aktivität durchgeführt. Die spezifische Aktivität wurde immer mit der Thiochrom-Methode bestimmt. Die Werte (γ inaktiviertes Thiamin) wurden durch 3,6 dividiert.

Die gesamte Aktivität (γ) eines Präparates oder einer Fraktion ergibt sich durch Multiplikation der spezifischen Aktivität mit der Menge des Präparates oder der Fraktion.

Zur Bestimmung der Halbwert-Aktivität wurden von jedem Antithiamin-Wirkstoffpräparat 4 bis 5 Thiamin-Inaktivierungsgemische mit verschiedenen Mengen des Antithiamin-Wirkstoffpräparates hergestellt. Es wurden immer 100 γ Thiamin (1 ml 0,01-proz. Thiamin-Lösung) vorgelegt. Das Gemisch enthielt 2 ml Phosphatpuffer pH 6 und das Gesamtvolumen betrug 20 ml. Die Antithiamin-Wirkstoffpräparat-Mengen wurden so abgestuft, dass die Thiamin-Inaktivierung 30 bis 70 % betrug. Aus der Kurve mit Thiamin-Inaktivierung als Ordinate und Antithiamin-Wirkstoffpräparat-Menge als Abszisse wurde die für eine 50-proz. Thiamin-Inaktivierung nötige Menge, die sog. Halbwert-Menge, des Antithiamin-Wirkstoffpräparates ermittelt. Der reziproke Wert der Halbwert-Menge ergibt die Halbwert-Aktivität. Die Analysen der 2-ml-Proben aus den 20-ml-Thiamin-Inaktivierungsgemischen wurden wie früher durchgeführt.

Die spezifische Aktivität und Halbwert-Aktivität kann auch (bei kleiner Antithiamin-Wirkstoffpräparat-Menge) mit 1,8 bzw. 0,9 mg Antithiamin-Wirkstoffpräparat und 50 bzw. 25 γ Thiamin in einem Gesamtvolumen von 10 bzw. 5 ml bestimmt werden.

Die Bestimmung der Aktivität von Präparat I A mit der Melnick-Field-Methode wurde mit 20-ml-Thiamin-Inaktivierungsgemischen durchgeführt. Die Gemische enthielten je 2 ml Thiamin-Stammlösung (0,05-proz. Thiamin-Lösung in 0,01-n. Salzsäure) und 2 ml Kaliumhydrogenphthalat - Puffer pH 6. Von diesen Thiamin-Inaktivierungsgemischen wurden nach verschiedener Inaktivierungsdauer je 2 ml in Reagensgläser pipettiert. Zu jeder Probe wurde 1 ml 99-proz. Äthanol zugefügt. Das Gemisch wurde geschüttelt und mit 1 ml Diazotat-Reagens (s. unten) versetzt. Es wurde wieder gut gemischt und bei Zimmertemperatur 15 Min. stehen gelassen. Es entstand langsam eine himbeerrote Farbe, und die Lösung wurde trüb. Nun wurden je 6 ml Isopropanol zugefügt und mit einem Glasstab gut durchgemischt. Die Lösung wurde klar. Nach 15 Min. wurde die Intensität der Farbe im Beckman-Spektrophotometer DU bei der Wellenlänge 520 $m\mu$ und der Spaltbreite 0,04 mm gemessen. Als Vergleichslösung wurde eine Probe eines Parallelgemisches ohne Thiamin verwendet. Die abgelesenen Werte wurden mit einer Eichkurve in γ Thiamin umgerechnet. Das Diazotat-Reagens wurde wie folgt hergestellt: 10 ml 0,06-proz. p-Amino-acetophenonlösung in 0,2-n. Salzsäure wurden auf 5⁰ C abgekühlt. Dann wurden 3 ml frisch hergestellte 0,2-proz. Natriumnitritlösung zugegeben. Die Lösungen wurden gut gemischt und 3 Min. in der Kälte stehen gelassen. Zu diesem Gemisch wurden 3 ml 2-n. Natronlauge gegeben. Das Gemisch wurde geschüttelt und sofort verwendet. In einem Eis-Wasser-Gemisch ist das Diazotat-Reagens ca. 2 Std. haltbar.

Die Inaktivierungs-Temperatur betrug, wo nichts anderes vermerkt ist, stets 20⁰ C.

53 Reinigung der Antithiamin-Wirkstoffe

40 ml Präparat I A wurden mit 20 ml Kationenaustauscher Amberlite IRC-50 in der H-Form (Rohm & Haas Company, Philadelphia 5) behandelt. Es fiel teilweise schon in der Kationenaustauschersäule ein Niederschlag aus. Die Kationenaustauschersäule wurde mit 100 ml destilliertem Wasser

gewaschen. Die Durchflussgeschwindigkeit betrug 40 ml in einer Stunde. Eluat und Waschwasser wurden vereinigt, filtriert und am Vakuum auf 40 ml eingengt. Nach der Behandlung mit Kationenaustauscher war das Präparat IA eine klare Lösung. Die Präparate IB und IC wurden genau gleich mit Kationenaustauscher behandelt.

531 Behandlung mit Anionenaustauscherharzen

Die Anionenaustauscherharze wurden 2 Tage in destilliertem Wasser quellen gelassen. Das Wasser wurde während dieser Zeit viermal erneuert. Die Anionenaustauscherharze wurden dann mit je dem doppelten Volumen 0,5-n., 1-n. und 5-n. Ameisensäure behandelt. Anschliessend wurde mit 10-n. Ameisensäure gewaschen, bis das Eluat farblos war. Alsdann wurden die Anionenaustauscherharze mit dem zehnfachen Volumen destilliertem Wasser gewaschen.

200 ml Präparat IA, das mit Kationenaustauscher vorbehandelt worden war, wurden mit 40 ml Dowex-3 in der Formiatform während einem Tag geschüttelt. Der Austauscher wurde abfiltriert und mit destilliertem Wasser gewaschen. Er wurde in ein Chromatographierohr über 20 ml frischen Austauscher in der Formiatform geschichtet. Die Antithiamin-Wirkstoffe wurden mit Ameisensäure steigender Konzentration eluiert:

- 2 Fraktionen von je 500 ml 0,5-n. Ameisensäure
- 2 Fraktionen von je 500 ml 1,0-n. Ameisensäure
- 4 Fraktionen von je 500 ml 5,0-n. Ameisensäure
- 4 Fraktionen von je 500 ml 10,0-n. Ameisensäure

Die Durchflussgeschwindigkeit betrug 80 ml in der Std. Alle Fraktionen wurden in einem Rotationsverdampfer am Vakuum bei 40-50°C eingengt und am Hochvakuum (ca. 1 mm Hg) im Exsikkator getrocknet. Nach der gleichen Versuchsanordnung wurde Präparat IA auch mit den Anionenaustauschern Dowex 1-x4 und Amberlite IR-4B, beide in der Formiatform, behandelt. Die Behandlung von Präparat IA mit Dowex-3 in der Formiatform bei fortgesetzter Elution wurde analog durchgeführt. 280 mg vereinigte Präparate III A und III B wurden in 250 ml destilliertem Wasser gelöst und mit 10 ml Dowex-3 in der Formiatform einen Tag lang geschüttelt. Der Dowex-3 wurde abfiltriert, mit destilliertem Wasser gewaschen und in ein Chromatographierohr über 20 ml frischen Dowex-3 in der Formiatform geschichtet. Die Antithiamin-Wirkstoffe wurden mit Ameisensäure steigender Konzentration, gleich wie bei der ersten Elution, eluiert. Die Durchflussgeschwindigkeit betrug 80 ml in der Std.

Vor der Behandlung der Antithiamin-Wirkstoffe mit Anionenaustauscher in grossen Ansätzen wurden 8000 ml Präparat I A mit 5-n. Ameisensäure auf pH 3,5 angesäuert. Der ausgefällte Niederschlag wurde mit ca. 200 g Celite abgenutscht. Es wurde eine klare Lösung (→ Präparat II) erhalten. Das Präparat II wurde in zwei Portionen mit 3000 ml Dowex-3 in der Formiatform in einem Becherglas einen Tag lang gerührt. Die Lösung wurde abdekantiert. Der viermal mit je ca. 3000 ml destilliertem Wasser gewaschene Dowex-3 wurde in ein 8,7 cm dickes und 50 cm langes Chromatographierohr eingeschlämmt und nochmals mit 6 l destilliertem Wasser gewaschen. Die Antithiamin-Wirkstoffe wurden mit Ameisensäure steigender Konzentration in Fraktionen von 3000 ml eluiert. Die zwei mit 0,5-n. und die zwei mit 1-n. Ameisensäure eluierten Fraktionen waren inaktiv und wurden verworfen. Die Durchlaufgeschwindigkeit bei der Elution der ersten der vier Fraktionen von Präparat III A war 150 ml in einer Std. Sie wurde dann stufenweise verlangsamt und betrug bei der vierten Fraktion von Präparat III B noch 60 ml in einer Std.

532 Behandlung mit Salzsäure

80 mg Präparat III B wurden in 10 ml 1-n. Salzsäure 3 Std. auf dem kochenden Wasserbad erhitzt. Das abgekühlte Gemisch wurde am Vakuum eingengt und ergab 78,5 mg Trockensubstanz. Diese wurde in 100 ml destilliertem Wasser aufgenommen. Es blieb ein schwarzer unlöslicher Rückstand, der abfiltriert wurde. Das Filtrat wurde dreimal mit je 20 ml Äther ausgezogen. Die wässrige Lösung wurde am Vakuum eingengt und ergab 21,2 mg Präparat IV A. Der Ätherauszug wurde mit 10 ml destilliertem Wasser gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Einengen und Trocknen wurden 27,6 mg Präparat IV erhalten. 20 mg Präparat IV wurden in 100 ml Äther aufgenommen und dreimal mit je 10 ml gesättigter Natriumbikarbonatlösung ausgezogen. Die Natriumbikarbonatauszüge wurden sofort in eine Vorlage von 30 ml 2-n. Salzsäure gegeben. Die angesäuerten Natriumbikarbonatauszüge wurden dreimal mit je 20 ml Äther ausgezogen. Die gewaschenen Ätherauszüge ergaben nach dem Einengen und Trocknen 11,5 mg Präparat V. Die Ätherlösung von Präparat IV wurde, nachdem sie mit Natriumbikarbonatlösung ausgezogen worden war, dreimal mit je 10 ml 2-n. Sodalösung ausgeschüttelt. Die bleibende Ätherlösung wurde neutralgewaschen, getrocknet und eingengt. Sie ergab 3,4 mg Präparat V B. Der

Sodauszug wurde sofort mit 2-n. Salzsäure angesäuert und dreimal mit je 20 ml Äther ausgezogen. Der Ätherauszug wurde neutralgewaschen, getrocknet und eingeengt. Die Ausbeute betrug 1,1 mg Präparat V A. Die spezifische Aktivität von Präparat V A wurde mit 0,9 mg bei einer Vorlage von 25 γ Thiamin in 5 ml Gesamtvolumen bestimmt, die spezifische Aktivität von Präparat V B mit 1,8 mg und 50 γ Thiamin in 10 ml. Von den Präparaten III B, IV, IV A und V wurden zur Bestimmung der spezifischen Aktivität je 3,6 mg bei einer Vorlage von 100 γ Thiamin in einem Gesamtvolumen von 20 ml verwendet. Die Behandlung mit 1-n. Salzsäure wurde mit Präparat III A wiederholt. Ferner wurde Präparat III A und III B auch mit 6-n. Salzsäure gleich behandelt.

Die Papierchromatogramme wurden auf Schleicher & Schuell Chromatographiepapier, No. 2043 b, glatt, durchgeführt. Von 0,1-proz. Lösungen der Präparate III A + B, IV, IV A, V, V A und V B wurde je ein Tropfen auf einer waagrechten Startlinie im Abstand von 4 cm vom untern Blattrand aufgetragen. Die Punkte hatten einen Abstand von 4 cm und ihr Durchmesser betrug 5 bis 6 mm. Das Chromatogramm wurde bei 20⁰ C entwickelt. Dabei tauchte der untere Blattrand 8 bis 10 mm in das Fließmittel ein. Nachdem das Fließmittel ca. 20 cm nach oben gestiegen war, wurde das Chromatogramm aus der Glaswanne gehoben und in einem Trockenschrank bei 40⁰ C getrocknet. Das trockene Blatt wurde unter der UV-Lampe betrachtet. Die gelblich-fluoreszierende Frontlinie wurde bezeichnet. Das Chromatogramm wurde dann mit einer wässrigen 0,0015-proz. Thiamin-Lösung gleichmässig besprüht. Das bei 40⁰ C im Trockenschrank getrocknete Chromatogramm wurde mit einer Lösung von 1 ml 1-proz. Kaliumferricyanidlösung und 2 ml 30-proz. Natronlauge, die mit Wasser auf 50 ml aufgefüllt worden war, besprüht. Das getrocknete Chromatogramm wurde unter einer UV-Lampe (Philips HPW, 125 W, Typ 57 202 E/70) betrachtet. Die auf dem blau-fluoreszierenden Chromatogramm dunkel erscheinenden Punkte wurden mit Bleistift umrandet.

Der Verbrauch an Perjodsäure wurde nach Wintersteiner und Moore (1950) und Hegedüs, Tamm und Reichstein (1955) bestimmt.

1 mg Präparat V wurde in 10 ml Äthanol gelöst und seine UV-Absorption mit einem Beckman-Spektrophotometer DU in einer Quarzküvette von 1 cm Schichtdicke gemessen. Als Vergleichslösung wurde Äthanol

verwendet. Für die Messungen unterhalb 260 $m\mu$ wurde die Lösung des Präparates V mit Äthanol auf das zehnfache Volumen verdünnt.

Die Chromatogramme zum Zucker-Nachweis wurden auf Schleicher & Schuell Chromatographiepapier, No. 2043 b, mittelglatt, durchgeführt. Von 0,1-proz. Lösungen der Präparate III B, IV A und V und von Glucose wurde je ein Tropfen (s. S. 72) auf das Chromatographiepapier aufgetragen. Das Chromatogramm wurde bei 20°C über Nacht in der Unterphase des Fließmittels n-Butanol:Eisessig:Wasser (4:1:5) klimatisiert. Anschliessend wurde das Chromatogramm mit der Oberphase des gleichen Fließmittels entwickelt und getrocknet. Das trockene Chromatogramm wurde mit einer Lösung von 50 ml 0,1-n. Silbernitratlösung, 50 ml 5-n. Ammoniaklösung und 50 ml 2-n. Natronlauge besprüht. Anschliessend wurde das Chromatogramm über einem kochenden Wasserbad kurz gedämpft und mit 10-proz. Natriumthiosulfatlösung 15 Min. behandelt. Das fixierte Chromatogramm wurde 3 Std. in fließendem Wasser gewaschen und getrocknet.

533 Chromatographische Methoden

80 mg Präparat III B wurden in 10 ml Äthanol gelöst und auf eine Aluminiumoxidsäule der Aktivität III (5 g Aluminiumoxid grob purum, Ciba) aufgetragen. Es wurde mit 200 ml absolutem Äthanol, 200 ml 50-proz. Äthanol, 200 ml Wasser und 200 ml 2-n. Essigsäure eluiert.

80 mg Präparat IV bzw. 50 mg Präparat V wurden in je 10 ml Äther gelöst und auf eine Aluminiumoxidsäule von 5 g bzw. 4 g Aluminiumoxid aufgetragen. Anschliessend wurde gleich wie Präparat III B eluiert.

An 12 halben Bogen Schleicher & Schuell Chromatographiepapier No. 2043 b, wurden am untern Rand 2 cm lange Zacken geschnitten. Die Zacken hatten einen Abstand von 1 cm. Die Blätter wurden am obern Rand in Glaswannen mit dem Fließmittel n-Butanol:Eisessig:Wasser (4:1:1) eingehängt. Das Fließmittel floss durch die Blätter und tropfte an den Zacken ab. Nach 2 Tagen wurden die Blätter auf gleiche Weise in Wannen mit dest. Wasser gehängt. Nach weitem 2 Tagen wurden die Blätter getrocknet. Die Zacken wurden abgeschnitten. Präparat III A + B wurde längs einer waagrechten Linie mit 4 cm Abstand vom untern Blattrand dreimal auf alle 12 Blätter aufgetragen. Die Konzentration betrug 1 mg Präparat III A + B in 1 ml Lösung. Die trockenen Chromatogramme wurden mit dem Fließmittel n-Butanol:Eisessig:Wasser (4:1:1) aufsteigend entwickelt. Aus den getrockneten

Chromatogrammen wurde je ein 1 cm breiter Streifen längs der Fliessrichtung ausgeschnitten. Die Streifen wurden mit einer Thiamin-Lösung und einer Kaliumferricyanid-Natronlauge-Lösung besprüht (vgl. Abschnitt 532). Die unter der UV-Lampe dunkel erscheinenden Stellen wurden bezeichnet und aus jedem zugehörigen Chromatogramm wurden Streifen auf gleicher Höhe parallel zur Startlinie ausgeschnitten. Alle Streifen mit gleichem Rf-Wert (0,72 bzw. 0,46) wurden in einem Becherglas mit 200 ml destilliertem Wasser während 15 Min. gerührt. Die Lösung wurde filtriert und am Vakuum eingeeengt. Es wurden, auf alle 12 Blätter verteilt, 3,6 mg Präparat III A + B aufgetragen. Aus den ausgeschnittenen Streifen wurden 4,7 mg (2,5 bzw. 2,2 mg) eluiert. Die spezifische Aktivität wurde mit der gesamten Menge der Substanzen bestimmt. Es wurden 100% Thiamin in einem Gesamtvolumen von 20 ml vorgelegt.

12 mg Präparat III A wurden auf 4 halbe Chromatographiekarton Schleicher & Schuell, No. 2230, auf einer Geraden parallel zum untern Rand aufgetragen. Die Chromatogramme wurden gleich wie oben beschrieben entwickelt und weiterbehandelt. Die Komponente 1 hatte einen Rf-Wert von 0,36, die Komponente 2 einen solchen von 0,65. Die ausgeschnittenen Streifen wurden zerkleinert und in ein Chromatographierohr (30x200 mm) eingefüllt und mit Wasser eluiert. Der Trockenrückstand der Komponente 1 bzw. 2 betrug 19,6 bzw. 19,8 mg. Die spezifische Aktivität wurde mit 3,6 mg des Trockenrückstandes bei einer Thiamin-Vorlage von 100% in 20 ml Gesamtvolumen bestimmt.

100 mg Präparat III A wurden in 8,5 ml Alkohol gelöst und gleichmässig auf 20 Rundfilter aus Schleicher & Schuell Chromatographiepapier, No. 2043 b, glatt, aufgetragen. Die Filter hatten einen Durchmesser von 9 cm. Die getrockneten Filter wurden in ein Chromatopile auf 500 frische Filter gelegt und mit 30 ebenfalls frischen Filtern gleicher Qualität zugeeckt. Das Filterpaket wurde im Chromatopile möglichst stark zusammengepresst. Das Fliessmittel n-Butanol:Eisessig:Wasser (4:1:1) wurde oben zugegeben und aus einem tieferstehenden Vorratsgefäss nachgesogen. Nach 34 Std. war das Filterpaket fertig entwickelt. Die Filter wurden auseinander genommen und an einem Faden zum Trocknen aufgehängt. Von jedem fünfzehnten Filter wurde ein Segment abgeschnitten und mit Thiamin und Kaliumferricyanid-Natronlauge besprüht (vgl. Abschnitt 532). Ein gleicher

Versuch wurde auch mit dem Fließmittel n-Butanol : Methanol : Benzol : Wasser (1 : 2 : 1 : 1) durchgeführt.

In ein Perkolationsrohr von 18 mm Durchmesser wurde auf eine Höhe von 380 mm Cellulosepulver (Whatman, cellulose powder for chromatography) im Fließmittel n-Butanol : Methanol : Benzol : Wasser (1:2:1:1) eingeschlämmt. Die Säule wurde mit dem Fließmittel gewaschen, bis die Waschlösung farblos war und keinen Trockenrückstand mehr aufwies. 15,6 mg Präparat V wurden in 2 ml Fließmittel gelöst und auf die Säule aufgetragen. Das Präparat V wurde mit dem gleichen Fließmittel (s. o.) eluiert. Die Durchflussgeschwindigkeit betrug 100 ml in 1 Std.

50 mg Präparat IV wurden in 50 ml destilliertem Wasser gelöst. Diese Lösung wurde 5 Min. mit 1 g Aktivkohle geschüttelt. Vor und nach dieser Behandlung wurde die Aktivität des Antithiamin-Wirkstoffpräparates bestimmt.

534 Papierelektrophorese

Ein Chromatographiepapier Schleicher & Schuell, No. 2040 a, wurde in den Elphor Va-Apparat der Firma Dr. Bender & Dr. Hobein AG., München-Zürich, eingespannt und mit Pufferlösung besprüht (vgl. auch Grassmann und Hannig, 1950). In die Wanne wurde Pufferlösung eingefüllt. Nach 3 Std. wurde soviel Spannung (320 bis 560 Volt) angelegt, dass der Anschlusswert (Spannung mal Strom) 8 Watt betrug. Die Elektrodenräume wurden mit der gleichen Pufferlösung gespült. 13 mg Präparat III B wurden in 10 ml Pufferlösung gelöst und mit einer Dosierpumpe in der Mitte des Apparates aufgetragen, nachdem die Kammer weitere 3 Std. klimatisiert worden war. In 1 Std. wurden 0,35 mg (=0,27 ml) des Antithiamin-Wirkstoffpräparates aufgetragen. Von den aufgefangenen Fraktionen wurde die Aktivität bestimmt. Das Chromatographiepapier wurde am Schluss des Versuches getrocknet und mit Thiamin und Kaliumferricyanid-Natronlauge besprüht. Es wurde mit Acetatpuffer von pH 3,72 und 4,1 bei einer Ionenstärke von 0,05 und mit Phosphatpuffer von pH 5,93, 7,1 und 7,82 bei Ionenstärken von 0,05 und 0,025 gearbeitet.

535 Herstellung eines Brucinsalzes

98 mg Präparat V wurden in 2,5 ml absolutem Äthanol gelöst, mit 75 mg Brucin versetzt und auf ca. 45⁰ C erwärmt. Die klare, wieder etwas

abgekühlte Lösung wurde mit 20 ml Äther versetzt. Dabei wurde die Lösung trüb, und es fiel ein feiner Niederschlag aus. Das Gemisch wurde für 5 Std. in den Kühlschrank gestellt. Der Niederschlag wurde abgenutscht und mit Äther gewaschen. Nach dem Trocknen wurden 57 mg eines amorphen, hellbraunen Pulvers (Präparat VI) erhalten. Die Mutterlauge wurde auf ca. 1,5 ml eingengt und erneut mit 20 ml Äther versetzt. Es fiel ein Niederschlag aus, der abgenutscht, mit Äther gewaschen und getrocknet wurde. Die Ausbeute betrug 43 mg Präparat VI, 2. Fraktion. Die Mutterlauge wurde in den Kühlschrank gestellt. Nach 2 Tagen waren 3,1 mg weissliche Kristalle auskristallisiert. Der Schmelzpunkt dieser Kristalle betrug 165-170^o C. Der Schmelzpunkt von Brucin und der Mischschmelzpunkt dieser beiden Substanzen betrug ebenfalls 165 - 170^o C. Das Präparat VI (1. und 2. Fraktion) färbte sich von 190 - 200^o C dunkelbraun und schien sich bei 214 - 226^o C bei gleichzeitigem Schmelzen zu zersetzen.

52 mg Präparat VI wurden in 70 ml absolutem Äthanol gelöst und auf eine Aluminiumoxidsäule der Aktivität III (18 x 75 mm) aufgetragen. Die oberste Schicht der Säule färbte sich braun. Die ausfliessende Lösung war farblos. In 400 ml Eluat (absolutem Äthanol) wurden 55 mg Trockensubstanz erhalten. Die Durchflussgeschwindigkeit betrug 60 ml in 1 Std. Mit Wasser konnte nichts mehr eluiert werden.

93 mg Präparat VI wurden in 200 ml destilliertem Wasser gelöst und auf eine Kationenaustauschersäule Amberlite IRC-50 (18 x 280 mm = 70 ml) in der H-Form aufgetragen. Die Durchlaufgeschwindigkeit betrug 100 ml in 1 Std. Es wurden Fraktionen von je 50 ml aufgefangen. Mit 200 ml Wasser wurde weiter eluiert. Anschliessend wurde mit 100 ml 50-proz. Äthanol eluiert. Dieses Eluat ergab 66 mg Trockensubstanz (Präparat VII) in Form von einem "Glas", das als feine Plättchen vom Kolbenboden abgekratzt werden konnte.

82 mg Präparat VI wurden in 200 ml 1-n. Salzsäure gelöst. Diese Lösung wurde dreimal mit je 50 ml Äther ausgezogen. Die neutralgewaschenen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrockneten Ätherauszüge ergaben nach dem Einengen und Trocknen 43 mg Präparat VIII.

Von Brucin, Präparat VI und Präparat VII wurden die UV-Spektren aufgenommen. Mit Lösungen der Konzentration 0,1 bzw. 1 mg pro 10 ml

Lösung wurde zwischen den Wellenlängen 220 und 280 m μ bzw. 260 und 410 m μ die Absorption gemessen. Lösungsmittel war Äthanol.

536 Behandlung mit Kationenaustauscherharz

40 ml Kationenaustauscher Amberlite IRC-50 wurden durch Behandlung mit 2-n. Salzsäure in die H-Form übergeführt. 160 mg Präparat V wurden in 300 ml destilliertem Wasser gelöst und auf die neutralgewaschene Säule aufgetragen. Es wurde mit Wasser (\rightarrow Präparat IX A), 10-proz., 30-proz. und 50-proz. Äthanol (\rightarrow Präparat IX B) eluiert. Die Durchflusgeschwindigkeit betrug 20 ml in 1 Std.

170 mg Präparat IX A wurden in 200 ml destilliertem Wasser gelöst und erneut auf eine Kationenaustauschersäule von 40 ml Amberlite IRC-50 in der H-Form aufgetragen. Es wurden 2 Fraktionen mit je 200 ml und 1 Fraktion mit 100 ml Wasser eluiert. Fraktion 4 bis 6 wurde mit je 100 ml 10-proz. Äthanol, Fraktion 7 bis 9 mit je 100 ml 30-proz. Äthanol eluiert. Von den Fraktionen 4, 5, 7 und 8 wurden die UV-Absorptionen gemessen.

54 Bestimmung der Stabilität der Antithiamin-Wirkstoffe

541 Bestimmung der Thermostabilität

50 g getrocknete Fiedern von Adlerfarnkraut wurden in einem Haushaltsmixer mit 400 ml auf 0^o C abgekühltem Wasser und 100 g feinen Eisstücken zerkleinert. Als sich das Gemisch auf ca. 10^o C erwärmt hatte, wurde der Becher mit dem Gemisch in den Kühlschrank gestellt. Nachdem das Gemisch auf -1^o C abgekühlt worden war, wurde das Gemisch weiter zerkleinert. Der feine Brei hatte eine Temperatur von 8^o C und wurde 16 Std. im Kühlschrank bei + 4^o C stehen gelassen. Das Gemisch wurde durch ein Filtertuch gepresst und in der Kühlzentrifuge zentrifugiert (3000 g). Die Ausbeute betrug 350 ml Präparat I A. 100 ml Präparat I A wurden 48 Std. bei 4^o C gegen 1000 ml destilliertes Wasser dialysiert. Der dialysierbare Anteil wurde am Vakuum bei ca. 8-10^o C auf 100 ml eingeeengt (\rightarrow Präparat I B). Je 50 ml Präparat I A, I B und I C wurden in einem verschlossenen Glasrohr während 1 Std. im kochenden Wasserbad gehalten. Von diesen 3, auf 20^o C abgekühlten Präparaten wurde die Aktivität bestimmt. Parallel wurde auch die Aktivität der unbehandelten Präparate I A, I B und I C bestimmt.

Die Vorlage betrug für alle Aktivitätsbestimmungen 100 γ Thiamin in 20 ml Gesamtvolumen. Die Inaktivierungstemperatur war 20⁰ C.

In 6 Reagensgläser wurden je 3 ml eines fünfmal verdünnten Präparates I B gegeben. Alle Reagensgläser wurden mit einem Wattepfropf verschlossen. 3 der Reagensgläser wurden während 1 Std. im kochenden Wasserbad gehalten. Nach 3 Std. wurde diese Behandlung wiederholt. Die 6 Proben wurden bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Nach 1 Tag wurde von je 1, 5 ml einer nicht-sterilisierten und einer sterilisierten Probe die Aktivität bestimmt. Die Vorlage betrug 100 γ Thiamin. Das Gesamtvolumen betrug 20 ml. Die Aktivitätsbestimmung wurde nach 8 Tagen und nach 35 Tagen wiederholt. Nach 8 Tagen waren die nicht-sterilisierten Proben trüb, nachdem sie nach 1 Tag noch klar gewesen waren. Nach 35 Tagen war auf der nicht-sterilisierten Probe ein Pilz gewachsen. Die sterilisierte Probe war immer noch klar.

542 Bestimmung der Stabilität gegen Säure und Lauge

27 mg Präparat III A wurden in 10 ml destilliertem Wasser gelöst und mit 0, 1-n. Salzsäure auf pH 3, 25 eingestellt. Eine zweite Probe von 27 mg Präparat III A wurde mit 2 ml Phosphatpuffer nach Sörensen auf pH 6, 0 eingestellt. Ferner wurden 4 Proben von je 27 mg Präparat III A mit 0, 1-n. Natronlauge auf pH 7, 65; 8, 8; 11, 0 bzw. 11, 55 eingestellt. Alle Proben wurden während 1 Std. in einem kochenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das pH der Proben gemessen. Jede Probe wurde mit 0, 1-n. Natronlauge bzw. mit 0, 1-n. Salzsäure und Phosphatpuffer auf pH 6 eingestellt. Die Proben wurden mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 50 ml aufgefüllt. Die spezifische Aktivität der Proben wurde mit je 7, 5 ml (entspricht 3, 6 mg Präparat III A) bestimmt. Die Vorlage betrug 100 γ Thiamin in einem Gesamtvolumen von 20 ml.

55 Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus der Antithiamin - Wirkstoffe

551 Bestimmung des Einflusses der Mengenverhältnisse

Es wurden Inaktivierungsgemische mit einer konstanten Vorlage von je 100 γ Thiamin hergestellt. Das Gesamtvolumen betrug immer 20 ml, die

Inaktivierungs-Dauer 5 und 30 Min. Die Mengen der Antithiamin - Wirkstoffpräparate wurde erhöht. In einer ersten Versuchsreihe wurden Aktivitätsbestimmungen mit 0, 2; 0, 4; 0, 75; 1, 5 und 3, 0 ml Präparat I A durchgeführt. In einer zweiten Versuchsreihe wurden 0, 2; 0, 4; 0, 75; 1, 5 und 2,5 ml Präparat I B und in einer dritten Versuchsreihe 0, 2; 0, 4; 0, 75; 1, 5 und 3,0 ml Präparat I C verwendet.

Für die Bestimmung der Aktivität bei konstanter Menge Antithiamin-Wirkstoffpräparat wurde die Thiamin-Vorlage erhöht. Das Gesamtvolumen betrug immer 20 ml, die Inaktivierungs-Dauer 5 und 30 Min. In einer ersten Versuchsreihe wurden Inaktivierungsgemische mit je 0, 5 ml Präparat I A und 100, 150, 200, 250, 300, 500 und 1000 γ Thiamin hergestellt. Für die zweite Versuchsreihe wurden je 3 mg Präparat V und 100, 200, 300, 500 und 1000 γ Thiamin verwendet. Das Fluorimeter wurde mit einem 50- γ -Thiochrom-Test geeicht. Die Isobutanollösungen aus den Inaktivierungsgemischen mit 500 γ Thiaminvorlage wurden zur Bestimmung der Fluoreszenz im Verhältnis 1:1, jene aus den Inaktivierungsgemischen mit 1000 γ Thiamin-Vorlage im Verhältnis 1:3 mit reinem Isobutanol verdünnt.

Es wurden 4 Inaktivierungsgemische mit einer Vorlage von je 100 γ Thiamin und je 0, 5 ml Präparat I A hergestellt. Das Gesamtvolumen betrug 5, 10, 20 bzw. 40 ml. Zur Bestimmung der Thiamin-Inaktivierung wurden 0,5; 1,0; 2,0 bzw. 4,0 ml verwendet.

552 Bestimmung des Einflusses von Kochsalz

Es wurden Inaktivierungsgemische mit konstanten Mengen Thiamin und Antithiamin-Wirkstoffpräparat hergestellt. Den Gemischen wurden steigende Mengen Kochsalz zugegeben. Das Gesamtvolumen betrug 20 ml, die Inaktivierungs-Dauer 5 und 30 Min. In einer ersten Versuchsreihe wurde den Inaktivierungsgemischen, die je 100 γ Thiamin und 2, 5 mg Präparat III B enthielten, 0,2; 1,0; 2,0; 4,0 bzw. 5,0 g Kochsalz zugegeben. Den Inaktivierungsgemischen einer zweiten Versuchsreihe, die je 100 γ Thiamin und 1,8 mg Präparat V enthielten, wurde 0,2; 1,0; 2,0 bzw. 4,0 g Kochsalz zugegeben. Die Thiamin-Inaktivierung wurde mit je 2 ml der Inaktivierungsgemische bestimmt.

553 Bestimmung des Einflusses von Luftsauerstoff

Ein 100-ml-Weithalsrundkolben wurde mit einem Gummistopfen mit 2 Bohrungen verschlossen. In die eine Bohrung wurde ein Glasrohr, in die andere ein Glashahn gesteckt. Bei verschlossenem Glashahn wurde der Rundkolben durch das Glasrohr mit einer Hochvakuumpumpe evakuiert. Nun wurde eine Druckflasche mit chemisch reinem Stickstoff an den Glashahn angeschlossen. Die Druckflasche wurde langsam geöffnet. Bei zugepresster Zuleitung zur Hochvakuumpumpe wurde der Rundkolben mit Stickstoff gefüllt. Der Glashahn wurde wieder geschlossen. Der Kolben wurde wieder evakuiert, usw. Nachdem der Rundkolben dreimal evakuiert und mit Stickstoff gefüllt worden war, wurde der Anschluss zur Vakuumpumpe entfernt. Es wurde dauernd ein leichter Stickstoffstrom durch den Kolben geschickt. Durch das Glasrohr wurde mit einer Pipette 1 ml einer Lösung von Präparat IV (=3,6 mg), 2 ml Phosphatpuffer pH 6, 16 ml destilliertes Wasser und zuletzt 1 ml Thiaminlösung (=100%) in den Rundkolben gegeben. Dieser Versuch wurde zweimal mit je 3,6 mg Präparat IV und dreimal mit je 3,6 mg Präparat III B wiederholt. Mit jedem der obigen Gemische wurde gleichzeitig je ein Inaktivierungsgemisch gleicher Zusammensetzung unter Luftatmosphäre hergestellt. Die Thiamin-Inaktivierung im Gemisch unter Stickstoffatmosphäre und die im entsprechenden Gemisch unter Luftatmosphäre wurden parallel nach 5 und 30 Min. Inaktivierungs-Dauer bestimmt.

554 Versuche zur Spaltung der Thiamin-Antithiamin-Wirkstoff-"Additionsverbindung"

Es wurde versucht, aus einem Inaktivierungsgemisch von 200 mg Thiamin und 500 mg Präparat IV das Pikrat der Thiazolkomponente des Thiamins, nach der Vorschrift von Krampitz und Woolley (1944) zu isolieren. Der Chloroformextrakt enthielt praktisch keine Substanz. Ein gleiches Inaktivierungsgemisch wurde dann mit einer gesättigten alkoholischen Lösung von 200 mg Pikrinsäure versetzt. Die Lösung wurde etwas eingeeengt und ergab 244 mg gelbe Plättchen vom Schmelzpunkt 195°C.

Das Pikrat des Thiamins wurde mit 200 mg Thiamin in 10 ml Wasser und 200 mg Pikrinsäure in 20 ml Äthanol hergestellt. Die Ausbeute betrug 261 mg gelbe Plättchen vom Schmelzpunkt 195°C.

Das Pikrat der Thiazolkomponente wurde aus 500 mg 4-Methyl-5-

(β -hydroxyäthyl)-thiazol in 10 ml Äthanol mit 800 mg Pikrinsäure in 40 ml Äthanol hergestellt. Die Ausbeute betrug 980 mg gelbe Nadeln vom Schmelzpunkt 163,5°C.

Es wurde ein Inaktivierungsgemisch, das 1'660 γ Thiamin und 60 mg Präparat V enthielt, hergestellt. Das Gesamtvolumen betrug 332 ml. Mit je 2 ml wurde zweimal die Thiamin-Inaktivierung bestimmt. Die restlichen 328 ml des Inaktivierungsgemisches wurden auf eine Kationenaustauschersäule von 40 ml Amberlite IRC-50 in der H-Form aufgetragen. Die Durchflusgeschwindigkeit betrug 60 ml in 1 Std. Die Säule wurde mit 300 ml destilliertem Wasser gewaschen. Von den wässrigen Eluaten wurde mit je 2 ml bzw. 4 ml der Thiamin-Gehalt bestimmt. Ferner wurde mit je 19 ml der beiden wässrigen Eluate die Aktivität bestimmt. Die Vorlage betrug 100 γ Thiamin, das Gesamtvolumen 20 ml. Die Kationenaustauschersäule wurde mit 600 ml 30-proz. Äthanol weitereluiert. Es wurden 3 Fraktionen von je 200 ml aufgefangen. Die Fraktionen wurden am Vakuum eingeeengt. Mit je 3,6 mg Präparat X wurde die spezifische Aktivität bestimmt. Die Säule wurde anschliessend mit 300 ml Wasser gewaschen. Das Waschwasser wurde eingeeengt. Vom Trockenrückstand wurde die spezifische Aktivität bestimmt. Das Thiamin wurde mit 400 ml 2-n. Salzsäure eluiert. Es wurden Fraktionen von je 100 ml aufgefangen. Der Thiamin-Gehalt der ersten und zweiten Fraktion wurde mit je 1 ml, derjenige der dritten und vierten Fraktion mit je 2 ml bestimmt.

Es wurde ein Inaktivierungsgemisch mit 18 mg Präparat V und 500 γ Thiamin in einem Gesamtvolumen von 100 ml hergestellt. Mit je 2 ml wurde zweimal die Thiamin-Inaktivierung bestimmt. Die restlichen 96 ml des Inaktivierungsgemisches wurden auf eine Anionenaustauschersäule von 20 ml Dowex-3 in der Formiatform aufgetragen. Die Durchflusgeschwindigkeit betrug 30 ml in 1 Std. Das Eluat floss farblos ab. Die Säule wurde mit 80 ml Wasser gewaschen. Das erste Eluat und das Waschwasser wurden vereinigt und mit Wasser auf 192 ml aufgefüllt. Der Thiamin-Gehalt wurde mit je 4 ml bestimmt. Ein zweiter Versuch zur Rückgewinnung von Thiamin aus einem Inaktivierungsgemisch wurde mit 90 mg Präparat V und 2500 γ Thiamin durchgeführt. Das Gesamtvolumen betrug 450 ml. In zwei Proben von je 2 ml wurde die Thiamin-Inaktivierung bestimmt. 396 ml des Inaktivierungsgemisches wurden auf eine Anionenaustauschersäule von 60 ml Dowex-3 in der

Formiatform aufgetragen. Die Durchlaufgeschwindigkeit betrug 80 ml in 1 Std. Die Säule wurde mit 290 ml Wasser gewaschen. Es wurde je 1 Fraktion von 444 ml, 142 ml und 100 ml aufgefangen. Der Thiamin-Gehalt wurde zweimal mit 2 bzw. 4 ml der ersten Fraktion und mit je 4 ml der zweiten und dritten Fraktion bestimmt. Die restlichen 50 ml des Inaktivierungsgemisches (enthielten ursprünglich 250 γ Thiamin) wurden bei 40^o C am Vakuum eingeengt. 71 ml der ersten Fraktion aus der Anionenaustauschersäule (enthielten 250 γ Thiamin) wurden ebenfalls bei 40^o C am Vakuum eingeengt. 50 ml einer 0,0005-proz. Thiaminlösung (=250 γ Thiamin) wurden auf eine Anionenaustauschersäule von 20 ml Dowex-3 in der Formiatform aufgetragen. Die Säule wurde mit 50 ml Wasser gewaschen. Die vereinigten Eluate (100 ml) wurden bei 40^o C am Vakuum eingeengt. Alle drei Trockenrückstände (Inaktivierungsgemisch aus Anionenaustauschersäule, Inaktivierungsgemisch und Thiaminlösung aus Anionenaustauschersäule) wurden in je 2,5 ml Wasser gelöst. Der Thiamin-Gehalt dieser drei Lösungen war somit 100 γ Thiamin in 1 ml Lösung. Je 0,01 ml dieser Lösungen (=1 γ Thiamin) wurde auf drei Chromatographieblätter Schleicher & Schuell, No. 2043 b, mittelglatt, aufgetragen. Der Abstand zwischen 2-Punkten und der Abstand der Startlinie vom untern Blattrand war je 4 cm. Als Vergleichssubstanz wurde auf jedes Chromatogramm 0,01 ml einer reinen 0,01-proz. Thiaminlösung (=1 γ Thiamin) und 0,01 ml einer 0,18-proz. Lösung von Präparat V in je einem Punkt aufgetragen. Die Chromatogramme wurden aufsteigend bei 18^o C entwickelt. Das erste Chromatogramm wurde mit dem Fliessmittel n-Butanol:Eisessig:Wasser (4:1:5) entwickelt, nachdem es mit der Wasserphase klimatisiert worden war. Das zweite Chromatogramm wurde mit dem Fliessmittel n-Butanol:Äthanol:Wasser (2:1:1) klimatisiert und entwickelt. Das dritte Chromatogramm wurde mit Wasser klimatisiert und nachher mit dem Fliessmittel n-Butanol:Methanol:Wasser (2:1:1) entwickelt. Die getrockneten Chromatogramme wurden, wie in Abschnitt 532 ausführlich beschrieben, mit Thiamin und Kaliumferricyanid-Natronlauge besprüht und unter der UV-Lampe ausgewertet.

555 Bestimmung des Einflusses von organischen Aminen

Es wurden 4 "Inaktivierungs"-Gemische mit je 0,3 ml Präparat I A hergestellt. Zu 3 "Inaktivierungs"-Gemischen wurde je 0,02 mmol Anilin bzw. Pyridin bzw. m-Nitroanilin gegeben. Das Gesamtvolumen betrug 20 ml.

Die "Inaktivierungs"-Temperatur betrug 37° C. Die scheinbare Aktivität wurde mit je 2 ml nach einer "Inaktivierungs"-Dauer von 3, 15 und 30 Min. mit der Thiochrom-Methode bestimmt.

In einer zweiten Versuchsreihe wurden 4 "Inaktivierungs"-Gemische mit je 0,02 mmol m-Nitroanilin hergestellt. Die Präparat I A-Menge betrug 0,3; 0,15; 0,08 bzw. 0,0 ml. Als Vergleich wurde ein Inaktivierungsgemisch mit 0,3 ml Präparat I A ohne m-Nitroanilin hergestellt. Das Gesamtvolumen aller Gemische war 20 ml. Die "Inaktivierungs"-Dauer betrug 3, 15, 30 und 60 Min. Die "Inaktivierungs"-Temperatur war 37° C.

Die scheinbare Thiamin-Inaktivierung durch m-Nitroanilin allein wurde in 7 "Inaktivierungs"-Gemischen mit 0,02; 0,01; 0,005; 0,0025; 0,0013; 0,0006 und 0,0003 mmol m-Nitroanilin bestimmt. Die Vorlage war immer 100 γ Thiamin in 20 ml Gesamtvolumen. Die "Inaktivierungs"-Temperatur betrug 37° C. Die scheinbare Thiamin-Inaktivierung wurde nach 3, 15, 30 und 60 Min. gemessen.

Zur Messung der Senkung der Thiochrom-Ablesung durch die organischen Amine wurde ein Versuchsgemisch von 100 γ Thiamin in 20 ml Gesamtvolumen hergestellt. Mit je 2 ml des Versuchsgemisches wurde fünfmal der übliche Analysengang zur Thiamin-Bestimmung nach der Thiochrom-Methode durchgeführt (s. Abschnitt 52). Die daraus resultierenden Lösungen wurden vereinigt und ergaben eine Thiochromlösung bekannter Konzentration (100- γ Thiochrom-Test-Lösung). Ferner wurden drei Versuchsgemische mit je 0,02 mmol Anilin, Pyridin bzw. m-Nitroanilin hergestellt. Die Gemische enthielten kein Thiamin. Ihr Gesamtvolumen war 20 ml. Mit je 2 ml dieser drei Versuchsgemische wurde je zweimal der übliche Analysengang zur Thiamin-Bestimmung nach der Thiochrom-Methode durchgeführt (s. Abschnitt 52). Je 4 ml der resultierenden Lösungen wurden mit 4 ml der Thiochrom-Test-Lösung gemischt. Von diesen Gemischen wurde die Fluoreszenz gemessen. Als Vergleichslösung zum Eichens des Fluorimeters diente eine Lösung, die aus 4 ml Thiochrom-Test-Lösung und 4 ml reinem Isobutanol hergestellt wurde. Der gleiche Versuch wurde auch mit Versuchsgemischen mit je 0,01 mmol bzw. mit je 0,04 mmol organischem Amin durchgeführt. Die resultierenden Lösungen wurden ebenfalls mit einer 100- γ -Thiochrom-Test-Lösung im Verhältnis 1:1 gemischt.

Zur Messung der UV-Absorption der organischen Amine wurden wieder drei 20-ml - Versuchsgemische mit je 0,02 mmol Anilin , Pyridin bzw. m-Nitroanilin hergestellt. Je 2 ml der Gemische wurden mit je 10 ml Isobutanol 2 Min. lang ausgeschüttelt. Von diesen Isobutanolauszügen aus wässriger Aminlösung wurde die UV-Absorption zwischen den Wellenlängen 300 und 400 μ in einem Beckman-Spektrophotometer DU gemessen. Als Vergleichslösung diente reiner Isobutylalkohol, der vorher mit 2 ml Wasser 2 Min. lang ausgeschüttelt worden war. Mit je 2 ml der gleichen 20-ml-Versuchsgemische wurde der übliche Analysengang zur Thiamin-Bestimmung nach der Thiochrom-Methode durchgeführt. Daraus wurden die Isobutanolauszüge aus wässriger Aminlösung nach der Behandlung mit Kaliumferricyanid und Natronlauge erhalten. Von diesen Lösungen wurde ebenfalls die UV-Absorption gemessen (s.o.). Als Vergleichslösung diente reiner Isobutylalkohol, der vorher mit 2 ml Wasser, Kaliumferricyanid und Natronlauge ausgeschüttelt worden war.

Es wurden vier "Inaktivierungs"-Gemische von 20 ml Gesamtvolumen hergestellt. Die Vorlage war in allen Gemischen je 1000 γ Thiamin und je 0,5 ml Präparat I A. Zu drei dieser "Inaktivierungs"-Gemischen wurde noch je 0,02 mmol eines organischen Amins (Anilin, Pyridin bzw. m-Nitroanilin) zugegeben. Mit je 2 ml wurde die Thiamin-Inaktivierung mit der Melnick-Field-Methode nach einer "Inaktivierungs"-Dauer von 5 bzw. 30 Min. bestimmt. Die "Inaktivierungs"-Temperatur war 37^o C.

556 Bestimmung der Aktivität von Verbindungen bekannter Konstitution

Von den untersuchten Verbindungen wurde die spezifische Aktivität mit je 3,6 mg bei einer Vorlage von 100 γ Thiamin in 20 ml Gesamtvolumen bestimmt. Die Inaktivierungs-Temperatur war 20^o C und die Inaktivierungs-Dauer 5 und 30 Min.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die Antithiamin-Wirkstoffe aus wässrigen Extrakten der getrockneten Blattpiedern von *Pteridium aquilinum* zu reinigen und über ihre Natur und Wirkungsweise Näheres zu erfahren.

1. Die Antithiamin-Wirkung der Präparate wurde fast ausschliesslich mit der Thiochrom-Methode unter standardisierten Bedingungen gemessen.

2. Zur Reinigung wurden die Antithiamin-Wirkstoffe an Anionenaustauscher Dowex-3 in der Formiatform adsorbiert und mit Ameisensäure steigender Konzentration eluiert. Die aktivsten Fraktionen, die auf dem Papierchromatogramm nach dem Besprühen mit Thiamin und Kaliumferri-cyanid-Natronlauge unter der UV-Lampe 2 dunkle Flecken zeigten, wurden mit 1-n. Salzsäure 3 Std. bei 100^o C behandelt. Dadurch wurde das Antithiamin-Präparat ätherlöslich; auf dem Papierchromatogramm war nur noch ein Fleck sichtbar. Im ätherunlöslichen Anteil, der keine Antithiamin-Wirkung hatte, konnte papierchromatographisch Glucose nachgewiesen werden. Das ätherlösliche Antithiamin-Präparat wurde mit Natriumbikarbonat ausgezogen und anschliessend an einer Cellulosepulversäule bzw. Kationenaustauschersäule Amberlite IRC-50 in der H-Form fraktioniert. Die Antithiamin-Wirkung der aktivsten Präparate war 60-mal grösser als die des Ausgangsmateriales. Das Antithiamin-Präparat ist frei von Stickstoff, Schwefel, Phosphor und Halogenen; es enthält 61,52 % C und 5,56 % H. Sein UV-Spektrum zeigt bei 285 m μ eine Absorptionsbande.

3. Das Antithiamin-Präparat bildet mit Brucin ein amorphes Salz, das an einem Kationenaustauscher wieder zerlegt werden kann.

4. Die Antithiamin-Wirkstoffe sind thermostabil, gegen Säure sehr beständig, gegen Lauge dagegen unbeständig.

5. Bei konstanter Thiamin-Vorlage nimmt der Logarithmus des nicht-inaktivierten Thiamins mit der Zunahme der Antithiamin-Präparat-Menge linear ab.

6. Bei konstanter Antithiamin-Präparat-Vorlage nimmt die Thiamin-Inaktivierung mit der Thiamin-Vorlage linear zu.

7. Bei konstanter Thiamin- und Antithiamin-Präparat-Vorlage nimmt die Thiamin-Inaktivierung mit der Zunahme der Kochsalzkonzentration linear ab.

8. Die Thiamin-Inaktivierung wird von Luftsauerstoff nicht beeinflusst.

9. Aus Inaktivierungsgemischen, in denen 77 bis 86 % des vorgelegten Thiamins inaktiviert waren, konnte durch Behandlung mit Anionen- bzw. Kationenaustauscher 98 bis 100 % der vorgelegten Thiamin-Menge zurückgewonnen und papierchromatographisch identifiziert werden. Auf den Papierchromatogrammen von Inaktivierungsgemischen war sowohl das Thiamin als auch der Antithiamin-Wirkstoff nachweisbar. Dagegen gelang es bis anhin noch nicht, die Thiamin-Antithiamin-Wirkstoff-Additionsverbindung sichtbar zu machen.

10. Anilin und m-Nitroanilin fördern die Thiamin-Inaktivierung nicht; die Förderung, die durch die Ergebnisse der Thiochrom-Methode vorgeschätzt wird, ist durch die Lichtabsorption dieser oxydierten Amine bedingt. Pyridin scheint die Thiamin-Inaktivierung ein wenig zu erhöhen. Diese Ergebnisse wurden mit der Melnick-Field-Methode bestätigt.

11. Die nach chemischen Methoden ermittelte Antithiamin-Aktivität der Präparate wurde von anderer Seite durch mikrobiologische Bestimmungen und durch Versuche an Nervfasern des Frosches bestätigt.

12. Die Verbindungen Quercetin, Quercitrin, Flavaspidsäure und Aspidin haben hohe bis mittelmässige Antithiamin-Aktivitäten. Brenzkatechin ist die aktivste der untersuchten Verbindungen.

Summary

In the present study the attempt was made to purify the antithiamin agents contained in the aqueous extracts of dried leaves of fern (*Pteridium aquilinum*) and to gain insight into the chemical nature and mode of action of the active principals.

1. The antithiamin activity of the different fractions was determined almost exclusively by the thiochrom method under standardized conditions.

2. For purification, the antithiamin factors were adsorbed on an anion exchange resin column (Dowex-3) in the formate form and the columns were eluted with increasing concentrations of formic acid. The most active fractions, which, after spraying with thiamin and a potassium ferricyanide-sodium hydroxide solution revealed under the UV lamp two dark spots on paper chromatograms, were treated with 1-n. hydrochloric acid for 3 hours at 100 °C. which rendered the antithiamin preparation ether soluble. The acid treated material exhibited only one spot on the paper chromatogram. In the fraction, which is insoluble in ether and possesses no antithiamin activity, glucose could be detected by paper chromatography. The ether soluble antithiamin preparation was extracted with sodium bicarbonate and was further fractionated on a column of cation exchange resin (Amberlite IRC-50) in H-form. The antithiamin activity of the most active preparation was 60 times that of the starting material. The antithiamin preparation is free of nitrogen, sulfur, phosphorous, and halogenes. It contains 61.52 % C and 5.56 % H. The UV spectrum shows a maximum at 285 μ .

3. The antithiamin preparation forms an amorphous salt with brucine which can be decomposed on a cation exchange resin.

4. The antithiamin factors are thermostable, highly resistant to treatment with acid but labile towards alkali.

5. Using constant thiamin levels, the logarithm of the non inactivated thiamin decreased linearly with the increase of the added antithiamin preparation.

6. Using constant levels of the antithiamin factor, the thiamin in-activation increases linearly with the addition of thiamin.

7. Using constant levels of thiamin and of antithiamin agent, thiamin inactivation decreases linearly with increasing concentration of sodium chloride.

8. The presence of atmospheric oxygen does not influence the thiamin inactivation.

9. From the inactivation mixtures in which 77 - 86 % of the employed thiamin was inactivated, a recovery of 98 - 100 % of the thiamin could be achieved by treatment with anion or cation exchange resins and identified by paper chromatography. On the chromatograms of the inactivation mixtures the thiamin as well as the antithiamin factor could be detected. On the other hand it has not yet been possible to locate the thiamin-antithiamin addition compound.

10. Anilin and m-nitroanilin fail to increase the thiamin inactivation. The activation which is simulated by the results of the thiochrom method finds its explanation in the light absorption of the above mentioned oxidized amines. The addition of pyridine seems to accelerate slightly the thiamin inactivation. These findings were confirmed by the use of the determination with the Melnick-Field-method.

11. The chemically determined antithiamin activity of the preparations has been verified by other workers both by microbiological determinations and by experiments with nerve fibres of frogs.

12. The compounds quercetine, quercitrine, flavaspidic acid, and aspidine have medium resp. high antithiamin activities. Pyrocatechol is the most active of the tested compounds.

Literatur

- Aebi A., 1956. *Helv. Chim. Acta*, 39: 153
- Ågren G., 1945. *Acta Physiol. Scand.*, 10 : 381
- Ågren G., 1946. *Acta Physiol. Scand.*, 12 : 34
- Anderson R. E. und R. D. Hansen, 1955. *Ind. Eng. Chem.*, 47 : 71
- Auerbach H. E., 1940. *J. Amer. Pharm. Ass., Sci. Ed.*, 29 : 313
- Ballard C. W. und E. J. Ballard, 1949. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1 : 330
- Bär F., 1952. *Arzneimittel-Forsch.*, 2: 365, 486
- Bhagvat K. und P. Devi, 1944. *Ind. J. Med. Res.*, 32 : 131, 139
- Bönicke R., 1953. *Zentralbl. Bakt.*, 160 : 202
- Bönicke R., 1959. persönliche Mitteilung
- Bonner J. und E. R. Buchmann, 1938. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 24 : 431
- Büchi J., 1957. *Pharm. de Belgique*, 391
- Davis C. W. und G. G. Thomas, 1951. *J. Chem. Soc.*, 2624
- Derungs R. und H. Deuel, 1954. *Helv. Chim. Acta*, 37 : 657
- Evans E. T. R. und W. C. Evans, 1949. *Biochem. J.*, 44: IX
- Evans E. T. R., W. C. Evans und H. E. Roberts, 1951. *Brit. Vet. J.*, 107 : 364, 399
- Evans W. C. und E. T. R. Evans, 1949. *Brit. Vet. J.*, 105: 175
- Evans W. C., E. T. R. Evans und L. E. Hughes, 1954. *Brit. Vet. J.*, 110: 295, 265, 426
- Evans W. C. und N. R. Jones, 1952. *Biochem. J.*, 50: XXVIII
- Evans W. C., N. R. Jones und R. A. Evans, 1950. *Biochem. J.*, 46: XXXVIII
- Fellenberg Th. von, 1942. *Mitt. Lebensmittel Hygiene*, 33: 3, 67
- Forenbacher S., 1950. *Vet. Arch.*, 20: 405, ref. *Dtsch. tierärztl. Wschr.*, 88: 297 (1951)
- Forenbacher S., 1952. *Schweiz. Arch. Tierhk.*, 94: 153
- Fujita A., 1954. *Advances Enzymol.*, 15: 389 - 421
- Fujita A., Y. Nose, S. Kozuka, T. Tashiro, K. Ueda und S. Sakamoto, 1952. *J. Biol. Chem.*, 196: 289 - 320
- Fujita A., Y. Nose und K. Kuratani, 1954. *J. Vitaminol.*, 1: 1
- Fujita A., T. Okamoto und Y. Nose, 1955. *J. Vitaminol.*, 1: 108
- Fujiwara M. und H. Watanabe, 1952. *Proc. Jap. Acad.*, 28: 156
- Grassmann W. und K. Hannig, 1950. *Naturwiss.*, 37: 397
- Green R. G., 1936. *Minn. Wildlife Dis. Invest.*, 2: 106, ref. *Somogyi (1952)*
- Green R. G., 1937. *Minn. Wildlife Dis. Invest.*, 3: 83, ref. *Somogyi (1952)*

- Green R. G. , W. E. Carlson und C. A. Evans, 1941. *J. Nutr.*, 21:243, ref. Somogyi (1952)
- Gstirner F. , 1951. *Chemisch-physikalische Vitaminbestimmungsmethoden*, 72, F. Enke Verlag, Stuttgart
- Haag J. R. , P. H. Weswig und A. M. Freed, 1947. *Fed. Proc.* , 6: 408
- Hasegawa E. , 1955. *Vitamins (Japan)*, 8:421, ref. *Chem. Abstr.* , 49:14827 (1955)
- Hasegawa E. , S. Sakamoto, K. Nagayama und A. Fujita, 1956. *J. Vitaminol.*, 2: 31
- Hasegawa E. , T. Tamaki, T. Tanaka und A. Fujita, 1957. *J. Vitaminol.* , 3:30
- Hegedüs H. , Ch. Tamm und T. Reichstein, 1955. *Helv. Chim. Acta*, 38:122
- Hess P. F. , 1950. *Diss.* , Bern
- Hoff-Jørgensen E. und B. Hansen, 1955. *Acta Chem. Scand.* , 9: 562
- Horwitt M. K. , 1959. *Ann. Rev. Biochem.*, 28: 414
- Jacobsohn K. P. , 1948. *Arch. Portug. Sc. Biol.* , 10: 52
- Janson B. , 1936. *Rec. trav. chim. Pays-Bas*, 55: 1046
- Janson B. , 1938. *Z. Vitaminforsch.* , 7: 239
- Kenten R. H. , 1957 a. *Biochem. J.*, 67: 25
- Kenten R. H. , 1957 b. *Report of the Rothamsted Experimental Station*, 242
- Kimura R. und S. Aoyama, 1951. *Vitamins (Japan)*, 4: 366, ref. Somogyi (1956)
- Kimura R. und T. H. Liao, 1952. *Vitamins (Japan)*, 5: 604, ref. Somogyi (1956)
- Kimura R. und T. H. Liao, 1953. *Vitamins (Japan)*, 6: 288, ref. Somogyi (1956)
- Krampitz L. O. und D. W. Woolley, 1944. *J. Biol. Chem.*, 152: 9
- Lhoest W. J. , L. W. Busse und C. A. Baumann, 1958. *J. Amer. Pharm. Ass.* , 47: 254
- Matsukawa D. und T. Kawakami, 1955. *J. Vitaminol.*, 1 : 208
- Matsukawa D. und H. Misawa, 1949. *Proc. Comm. Vit. Res.* , 31: 16, ref. Somogyi (1956)
- Matsukawa D. und H. Misawa, 1950. *Vitamins (Japan)*, 2 : 137, ref. Somogyi (1956)
- Matsukawa T. , H. Kawasaki, T. Iwatsu und S. Yurugi, 1954. *J. Vitaminol.*, 1 : 13
- Matsukawa T. und S. Yurugi, 1952. *Proc. Jap. Acad.*, 28 : 146
- Matsukawa T. , S. Yurugi und T. Matsuoka, 1953. *Science*, 118 : 325
- Melnick D. und H. Field jr., 1939. *J. Biol. Chem.*, 127 : 505, 515, 531
- Mitchell H. K. und F. A. Haskins, 1949. *Science*, 110 : 278
- Muralt A. von, 1939. *Naturwiss.*, 27: 265
- Muralt A. von, 1958. *Neue Ergebnisse der Nervenphysiologie*, Springer Verlag, Berlin
- Nakabayashi T. , 1955. *Vitamins (Japan)*, 8:410, ref. G. W. E. Plant und J. J. Bethel, 1956. *Ann. Rev. Biochem.*, 25 : 485

- Nakabayashi T., 1957. *J. Vitaminol.*, 3:129, ref. M. K. Horwitt, 1959. *Ann. Rev. Biochem.*, 28:414
- Peters R. A. und J. R. O'Brien, 1955. *Moderne Meth. Pfl. -Analyse (Paech-Tracey)*, 4: 345, Springer Verlag, Berlin, ref. W. Grab, 1960. *Hoppe-Seyler/Thierfelder, Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse*, 10. Aufl., 4: 1373, Springer Verlag, Berlin.
- Petropulos S. F., 1960. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 56: 7
- Prebluda H. J. und E. V. McCollum, 1939. *J. Biol. Chem.*, 127:495
- Reddy K. K., K. V. Giri und R. Das, 1948. *Enzymologia*, 12: 238
- Roberts H. W., E. T. R. Evans und W. C. Evans, 1949. *Vet. Rec.*, 61: 549
- Sakamoto S. und A. Fujita, 1956. *J. Vitaminol.*, 2: 39
- Sargent R. S. und W. Rieman III, 1957. *J. Physical Chem.*, 61: 354
- Schopfer W. H., 1949. *Plants and Vitamins*, published by the Chronica Botanica Company, Waltham Mass., U. S. A.
- Sealock R. R. und N. C. Davis, 1949. *J. Biol. Chem.*, 177: 987
- Sealock R. R. und R. L. Goodland, 1944. *J. Amer. Chem. Soc.*, 66: 507
- Sealock R. R. und A. H. Livermore, 1949. *J. Biol. Chem.*, 177: 553
- Sealock R. R., A. H. Livermore und C. A. Evans, 1943. *J. Amer. Chem. Soc.*, 65: 935
- Sieber O., 1950. *Diss.*, Bern
- Simon W., 1958. *Helv. Chim. Acta*, 41: 1835
- Somogyi J. C., 1949 a. *Helv. Physiol. Acta*, 7: C 24
- Somogyi J. C., 1949 b. *Int. Ztschr. Vitaminforsch.*, 21: 341
- Somogyi J. C., 1949 c. *persönliche Mitt.*
- Somogyi J. C., 1950. *Helv. Physiol. Acta*, 8: C 75
- Somogyi J. C., 1951. *Helv. Physiol. Acta*, 9: C 79
- Somogyi J. C., 1952. *Die Antianeurin-Faktoren*, Verlag Hans Huber, Bern
- Somogyi J. C., 1956. *Ergebnisse der Medizin. Grundlagenforsch.*, 141, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Somogyi J. C., 1960. *Nutr. et Dieta*, 1: 77
- Somogyi J. C. und A. Koller, 1958. *Bull. Schweiz. Akad. Medizin. Wiss.*, 14: 172
- Somogyi J. C. und A. Koller, 1959. *Int. Ztschr. Vitaminforsch.*, 29: 234
- Somogyi J. C. und A. von Muralt, 1949. *Helv. Physiol. Acta*, 7: C 56
- Thomas A. J., J. E. Watkin, I. A. Evans und W. C. Evans, 1955. *Biochem. J.*, 61: VIII
- Thomas B. und H. F. Walker, 1949. *J. Soc. Chem. Ind.*, 68: 6
- Watkin J. E., A. J. Thomas und W. C. Evans, 1953. *Biochem. J.*, 54: XIII
- Weakley F. B., A. C. Eldridge und L. L. McKinney, 1958. 134th Meeting *Amer. Chem. Soc.*, 30 A

- Weswig P.H., A.M. Freed und J.R. Haag, 1946. J. Biol. Chem., 165: 737
- Williams R.R., R.E. Waterman, J.C. Keresztesy und E.R. Buchman, 1935.
J. Amer. Chem. Soc., 57: 536
- Wintersteiner O. und M. Moore, 1950. J. Amer. Chem. Soc., 72: 1928
- Woolley D.W., 1941. J. Biol. Chem., 141: 997
- Woolley D.W., 1953. Nature, 171: 323
- Yudkin W.H., 1949. Physiol. Rev., 29: 389, ref. Somogyi (1956)

Lebenslauf

Ich, Anton Koller, wurde am 14. Januar 1932 in Luzern als Bürger von Littau (Kanton Luzern) geboren. Nach 6 Jahren Primarschule in Kriens besuchte ich 3 Jahre die Realschule der Kantonsschule Luzern und anschliessend 4 Jahre die technische Abteilung der Kantonsschule Zug. Im Juli 1952 erlangte ich das Maturitätszeugnis, Typus C.

Im Oktober 1952 begann ich das Studium an der chemischen Abteilung der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich. Im Juli 1956 erhielt ich das Diplom als Ingenieur-Chemiker. Im Herbst 1956 begann ich die vorliegende Arbeit am Biochemischen Laboratorium des Zahnärztlichen Institutes der Universität Zürich unter der Leitung von Herrn Prof. T. Wikén, Vorstand des Institutes für Landwirtschaftliche Bakteriologie und Gärungsbiologie der Eidgenössischen Technischen Hochschule, und von Herrn Dr. J. C. Somogyi, heute Direktor des Institutes für Ernährungsforschung, Rüschtikon. Nachdem Herr Prof. T. Wikén die Eidgenössische Technische Hochschule verlassen hatte, übernahm im Frühling 1957 Herr Professor Dr. H. Deuel, Vorstand des Agrikulturchemischen Institutes der Eidgenössischen Technischen Hochschule, die Leitung dieser Arbeit. Seit November 1958 wurde die Arbeit am Institut für Ernährungsforschung in Rüschtikon weitergeführt.