

Zur Kenntnis des antiskorbutischen Vitamins (Vitamin C).

Von

P. KARRER, H. SALOMON, K. SCHÖPP u. R. MORF.

Vortrag gehalten in der Zürcher Chemischen Gesellschaft
am 29. November 1932.

(Als Manuskript eingegangen am 1. Dezember 1932.)

Zu Beginn dieses Jahres haben O. RYGH und A. RYGH¹⁾ eine Mitteilung veröffentlicht, wonach ein Entmethylierungsprodukt des Narkotins, ein Methylnornarkotin, antiskorbutische Wirkung besitzen soll. Diese Angaben sind in der Zwischenzeit von verschiedenen Seiten kontrolliert worden, konnten aber nicht bestätigt werden²⁾. O. RYGH und A. RYGH³⁾ halten aber trotzdem an ihrer Ansicht fest, dass Methylnornarkotin, eventuell mit anderen Substanzen zusammen, als antiskorbutischer Faktor wirksam sei.

Kurz nach den Veröffentlichungen von RYGH teilte SZENT-GYÖRGYI⁴⁾ mit, dass eine kristallisierte Substanz, welche er vier Jahre früher aus Nebennieren dargestellt hatte⁵⁾ und welche auf Grund ihrer chemischen Zusammensetzung $C_6H_8O_6$ vorläufig als eine Hexuronsäure angesprochen wurde, skorbutkranke Meerschweinchen zu heilen vermag, und dass in dieser Verbindung daher höchstwahrscheinlich der antiskorbutische Faktor vorliegt. Die Substanz kommt auch in zahlreichen Frucht- und anderen Pflanzensäften vor. Ihre Wirksamkeit konnten nachher WAUGH und

¹⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 204 105, 114 (1932).

²⁾ Vgl. z. B. ZILVA, Chem. and Industr. 51, 8, 166 (1932), TILLMANN'S u. HIRSCH. Bioch. Z. 250. 312 (1932). O. DALMER u. Th. MOLL, Ztschr. physiol. Chem. 209. 211 (1932). E. OTT u. K. PACKENDORFF, Ztschr. physiol. Chem. 210. 94 (1932). R. L. GRANT, S. SMITH, S. S. ZILVA, Biochem. J. 26. 1628 (1932). J. BRÜGGEMANN, Ztschr. physiol. Chem. 211. 231 (1932).

³⁾ Ztschr. physiol. Chem. 211. 275 (1932).

⁴⁾ Nature April 16, 576 (1932).

⁵⁾ Nature Mai 28 (1927). Biochem. J. 22. 1387 (1928).

KING bestätigen⁶⁾, und auch TILLMANN⁷⁾ und andere schlossen sich der Auffassung an, dass die sog. Hexuronsäure wahrscheinlich mit dem antiskorbutischen Prinzip identisch ist. Dafür spricht unter anderem auch die Tatsache, dass die Substanz von SZENT-GYÖRGYI bereits in saurer Lösung ausserordentlich starkes Reduktionsvermögen besitzt und nach Untersuchungen von TILLMANN⁸⁾ die antiskorbutische Wirksamkeit pflanzlicher Extrakte mit deren Reduktionsvermögen gegenüber Jod und anderen Stoffen parallel zu gehen scheint.

E. L. HIRST und R. J. W. REYNOLDS⁹⁾ bestätigen an mehrfach umkristallisiertem Material die chemische Zusammensetzung der sog. Hexuronsäure. Sie fanden sie frei von Stickstoff und Methoxyl und optisch aktiv ($[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 23^{\circ} \rightarrow 31^{\circ}$ in Wasser). Ferner bestätigten sie, dass es sich um eine monobasische Verbindung handelt, da sie zur Neutralisation 1 Mol NaOH erfordert. Bei der Oxydation mit Luftsauerstoff bei Gegenwart einer Spur Kupfer schien eine zweite Carboxylgruppe eingeführt zu werden. Ferner stellten die Autoren fest, dass bei der Einwirkung von p-Bromphenylhydrazin auf das Bariumsalz der genannten Verbindung ein p-Bromphenylosazon in mikrokristallinem Zustand entsteht, welchem die Bruttoformel $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_5\text{N}_4\text{Br}_2$ zugeschrieben wird. Ferner haben R. W. HERBERT und E. L. HIRST¹⁰⁾ das Absorptionsspektrum der sog. Hexuronsäure genau gemessen.

Im Einverständnis mit Herrn Prof. SZENT-GYÖRGYI haben wir uns ebenfalls mit der chemischen Konstitution und der physiologischen Wirkung dieser Substanz befasst; der eine von uns (P. K.) ist Herrn Kollegen SZENT-GYÖRGYI für die freundlichen Ratschläge und die viele Hilfe bei der Darstellung der Substanz zu herzlichem Dank verpflichtet.

25 gr Hexuronsäure wurden zunächst fraktioniert aus Methylalkohol kristallisiert, und zwar in so viel Lösungsmittel, dass zum Schluss noch eine schwerstlösliche Spitzenfraktion von ca. 1 gr übrig blieb. In allen Kristallisationen haben wir die Jodzahl und die Schmelzpunkte (189—190°) genau gleich befunden. Die Prüfung des nur einmal umkristallisierten Präparates sowie der fünfmal kristallisierten Spitzenfraktion auf antiskorbutische Wirkung, die durch H. v. EULER in Stockholm und im pharmakologischen Laboratorium von F. Hoffmann-

⁶⁾ W. A. WAUGH u. C. G. KING, *Jl. Biol. Chem.* 97. 324 (1932).

⁷⁾ *Ztschr. angew. Chem.* 1932. 479. *Biochem. Ztschr.* 250. 312 (1932).

⁸⁾ *Ztschr. f. Untersuchung der Lebensmittel* 63 1, 21 (1932). *Biochem. Ztschr.* 250. 312 (1932).

⁹⁾ *Nature* April 8. 577 (1932).

¹⁰⁾ *Nature* August 6. 205 (1932).

La Roche & Co. in Basel durch Herrn Dr. DEMOLE vorgenommen worden ist, zeigte für beide Fraktionen gleiche Resultate; die Fraktionen heilten in Dosen von 1—2 mgr skorbutkranke Meerschweinchen.

Dieses fünfmal aus Methanol umkristallisierte Vitamin-C-Präparat besass in Übereinstimmung mit SZENT-GYÖRGYI und mit HIRST die Zusammensetzung $C_6H_8O_6$, und zwar sowohl nach dem Trocknen im Vakuum bei Zimmertemperatur wie nach dem Trocknen im Hochvakuum bei 80° .

Die Substanz bildet ein Natriumsalz $C_6H_7O_6Na$, welches aus verdünntem Alkohol wasserfrei in prachtvollen Säulen kristallisiert. Es entsteht, wie aus der Bruttoformel hervorgeht, aus dem Vitamin C durch Austausch eines H-Atoms gegen Metall, ohne dass Wasser angelagert wird. Daraus ergibt sich, dass Vitamin C, entgegen der bisherigen Annahme, kein Lacton, sondern eine freie Säure $C_5H_7O_4COOH$ ist, wofür übrigens auch die stark saure Reaktion der Verbindung in Wasser spricht. Eine direkte Folgerung dieser Tatsache ist die, dass im Vitamin C eines der restlichen 5 C-Atome keinen Sauerstoff tragen kann.

Die Verbindung enthält 2 Carbonylgruppen, denn sie liefert bei der Einwirkung von p-Nitrophenylhydrazin ein Di-p-nitrophenylhydrazon. Um ein Osazon kann es sich hier nicht handeln, da die Substanz schon bei Zimmertemperatur in wenigen Stunden entsteht. Beim Kochen des Vitamins C mit o-Phenylendiamin bildet sich kein Azin; die beiden Carbonylgruppen werden daher wahrscheinlich nicht in Nachbarstellung stehen; Glucoson mit der Gruppierung $CHO.CO...$ geht mit o-Diaminen leicht in Diazinderivate über; auch die weitgehende Enolisierung des Vitamins lässt sich mit einer 1,2-Dicarbonylstruktur schwerlich vereinen.

Durch Bestimmung der aktiven H-Atome nach ZEREWITINOFF lassen sich im Vitamin C 4 Hydroxylgruppen nachweisen.

Die Verbindung ist ungesättigt, d. h. sie enthält eine Kohlenstoffdoppelbindung. Dies zeigt sich zunächst im Verhalten gegen Nitromethan, welches bei der Zugabe einer alkoholischen Vitamin-C-Lösung intensiv gelb gefärbt wird. Auch gegenüber aktiviertem Wasserstoff verhält sich Vitamin C ungesättigt. Es nimmt dabei ca. 3 Mol H_2 auf. Das Reduktionsprodukt konnte bisher nicht kristallisiert, sondern nur in Form eines zähen Öles gewonnen werden. Die Analyse desselben lässt aber erkennen, dass durch die Reduktion ein Atom Sauerstoff reaktiv entfernt wurde und das Reduktionsprodukt teilweise lactonisiert vorliegt.

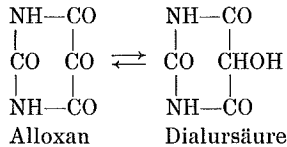
Bei der Einwirkung von Diazomethan bildet Vitamin C ein Dimethylderivat $C_6H_6O_6(CH_3)_2$. Auch dieses liegt bisher nur in Form eines dicken Öles, aber analysenrein, vor. Eine Methylgruppe lässt sich darin

durch Alkali verseifen, die andere ist gegen Alkalien beständig. Diese Beobachtung ist wichtig, weil sie zeigt, dass Vitamin C wirklich ein Carboxyl enthält, da sich die durch Methylierung daraus gebildete Estergruppe alkalisch verseifen lässt. Das zweite bei der Einwirkung von Diazomethan auf Vitamin C eingetretene Methyl muss dagegen ein enolisches Hydroxyl verschlossen haben, da es durch Alkalien nicht wieder abgespalten wird. Das Dimethylderivat und das durch alkalische Verseifung dargestellte Monomethylderivat reduzieren FEHLING'sche Lösung nur in der Hitze und nur wenig. Dieser Versuch spricht daher bereits für das Vorliegen einer Enolgruppierung in der Substanz.

Das Vorhandensein einer solchen Enolgruppierung wird weiter bewiesen durch die intensiv violettblaue Eisenchloridreaktion, welche Vitamin-C-Natrium gibt; ferner ist der Umstand bemerkenswert, dass Vitamin C, ähnlich wie Acetessigester oder Malonester, mit Diazoniumsalzen zu gelben bis braunen Azofarbstoffen kuppelt. Es darf daher die Schlussfolgerung gezogen werden, dass Vitamin C die Atomgruppierung $\dots \text{CO} \cdot \text{CH} \cdot \text{CO} \dots \rightleftharpoons \dots \text{CO} \cdot \text{C} = \text{C}(\text{OH}) \dots$ enthält.

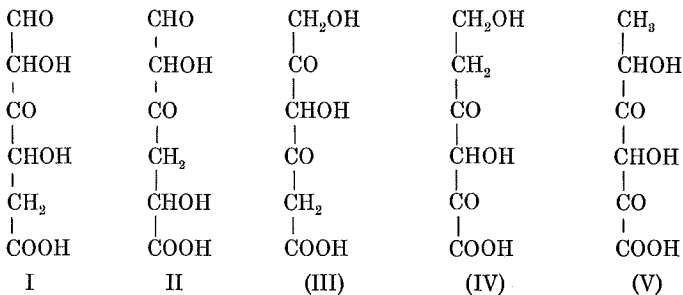
Wie bereits SZENT-GYÖRGYI festgestellt hat, wird Vitamin C sehr leicht schon in saurer Lösung oxydiert; dabei bildet sich zunächst ein Produkt, welches durch Austritt von Wasserstoff aus der ursprünglichen Substanz entstanden ist und aus welchem Vitamin C durch Einwirkung gelinder Reduktionsmittel, wie H_2S , regeneriert werden kann. Ein solches Oxydationsprodukt konnte in festem Zustande, allerdings noch nicht kristallisiert, dargestellt werden. Wir haben zu diesem Zwecke Vitamin C mit Kupferacetatlösung in der Kälte oxydiert, hierauf das überschüssige Kupferion durch Salicylaldehydoxim ausgefällt und nach Ausschütteln des Überschusses an Salicylaldehydoxim mit Äther durch Eindampfen das Dehydro-Vitamin C in Form eines lockeren amorphen Pulvers erhalten, welches in Wasser und Alkohol sehr leicht löslich ist. Es reduziert Kupferacetatlösung in der Kälte nicht, lässt sich dagegen durch Behandeln mit H_2S wieder in das kristallisierte Vitamin C zurückverwandeln. Seine analytische Zusammensetzung entspricht der Formel $(\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_6)_x$ oder $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_6$; es scheint somit pro 6 C-Atome 1 oder 2 H-Atom weniger als Vitamin C zu enthalten. Es reduziert FEHLING'sche Lösung, verbraucht dagegen in saurer Lösung kein Jod. Ein anderes, FEHLING'sche Lösung auch in der Hitze nicht reduzierendes Oxydationsprodukt des Vitamins C wird durch Titration der Verbindung in alkalischer Lösung mit Jod erhalten, wobei 4 Atome Jod verbraucht werden.

Der leichte Übergang von Vitamin C in Dehydro-Vitamin C und die ebenso leicht vor sich gehende Reduktion des letzteren zum Ausgangsstoff erinnert z. B. an die leichte gegenseitige Umwandlung von Alloxan in Dialursäure (bezw. Alloxanthin)



Auch Alloxan wird durch Einwirkung von H_2S zu Dialursäure (bezw. Alloxanthin) reduziert, und letzteres geht unter der Wirkung schwacher Oxydationsmittel, wie Jod etc., in Alloxan zurück. Es scheint daher möglich, dass die leichte Dehydrierbarkeit des Vitamins C auf eine ähnliche Atomgruppierung, wie sie z. B. im Alloxan vorliegt, zurückgeführt werden muss, d. h. auf einen zwischen 2 CO-Gruppen befindlichen CHOH-Rest, so dass im Vitamin C die Atomgruppierung ...CO.CHOH.CO... angenommen werden dürfte, welche unter der Wirkung schwacher Oxydationsmittel in die oxydierte Form ...CO.CO.CO... übergehen würde.

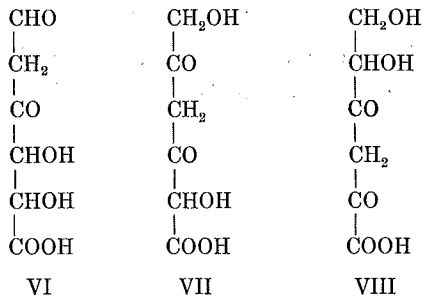
Für die Stellung der ...CO.CHOH.CO... Gruppe im Vitamin-C-Molekül kämen folgende Möglichkeiten in Betracht:



Von diesen scheidet jedoch Formel III, IV und Formel V aus; Formel III und IV, weil sie in enolisierter Form kein asymmetrisches C-Atom enthalten; Formel V wird ausgeschlossen durch den Nachweis, dass Vitamin C bei der Oxydation mit Chromsäure keine Essigsäure liefert; es kann also keine CH₃-Gruppe enthalten. Rhamnose, welche als Vergleichssubstanz ebenfalls mit Chromsäure abgebaut wurde, lieferte ca. 0,7 Mol CH₃COOH.

Wenn sich jedoch der Dehydrierungsvorgang am Vitamin C in einer Weise abspielt, welche das Vorhandensein einer zwischen den beiden

Carbonylgruppen stehenden CH_2 -Gruppe nicht ausschliesst, so würden für die Verbindung noch folgende Formeln zu diskutieren sein:



Von diesen fällt jedoch VII voraussichtlich ausser Betracht, da sie keine alkoholischen Hydroxyle in 1,2- oder 1,3-Stellung führt.

Für die endgültige Auswahl der Formel wird sich noch eine Beobachtung als wichtig erweisen, welche an einer Acetonverbindung des Vitamins C gemacht worden ist. Dieses Acetonderivat entsteht nach SZENT-GYÖRGYI (private Mitteilung) bei der Einwirkung von Aceton und einem wasserentziehenden Stoff auf Vitamin C, und zeichnet sich durch vorzügliches Kristallisationsvermögen aus. Wie SZENT-GYÖRGYI gefunden hat, entspricht es der Zusammensetzung $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_6$, d. h. es ist durch Austritt von 1 Mol H_2O aus den beiden Komponenten gebildet worden. Da es durch Wasser leicht wieder gespalten wird, kann die Bildung nur durch Wasseraustritt zwischen 2 OH-Gruppen des Vitamins C und dem Sauerstoff der Carbonylgruppe des Acetons erfolgt sein, also in gleicher Weise wie bei der Bildung der Acetonzucker. Dieses Acetonderivat lässt sich in alkoholischer Lösung als einbasische Säure scharf titrieren; das Natriumsalz, welches noch den Acetonrest enthält, kann isoliert werden. Die Carboxylgruppe hat somit bei der Bindung des Acetons nicht teilgenommen. Andererseits ist auch das enolische Hydroxyl nicht daran beteiligt, indem das Acetonderivat des Vitamins C in Form des Natriumsalzes noch die violette Eisenchloridreaktion besitzt, und weil das Acetonderivat bei der Einwirkung von Diazomethan wie das freie Vitamin C selbst 2 Methylgruppen aufnimmt, wobei ein prachtvoll kristallisiertes Dimethylderivat $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_6(\text{CH}_3)_2$ des Aceton-Vitamins C entsteht.

Bei der Bildung des Acetonderivates im Vitamin C müssen daher 2 alkoholische Hydroxylgruppen des Vitamins C in Reaktion treten. Nach den Erfahrungen bei der Synthese der Acetonzucker kommen für diese beiden Hydroxylgruppen nur 1,2- oder 1,3-Stellungen in Betracht,

wie sie z. B. die obenstehenden Formeln VI und VIII aufweisen, von denen VIII besonders wahrscheinlich ist.

Es sind weitere Versuche im Gang, um zwischen den in Frage stehenden Formeln eine Entscheidung herbeizuführen. Selbstverständlich können die meisten der vorstehenden Bilder als Enole und in der bei den Zuckern gebräuchlichen Cyclohalbacetalformel geschrieben werden.
