

Über die Wirkung einiger organische Amine auf die Abaureaktion von Thiamin

Autor(en): **Somogyi, J.C. / Koller, A.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften = Bulletin de l'Académie Suisse des Sciences Medicales = Bollettino dell' Accademia Svizzera delle Scienze Mediche**

Band (Jahr): **14 (1958)**

Heft 2

PDF erstellt am: **21.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-307368>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern. Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Aus dem Biochemischen Laboratorium des Zahnärztlichen Instituts
der Universität Zürich

Über die Wirkung einiger organischer Amine auf die Abbaureaktion von Thiamin¹

Von J. C. Somogyi² und A. Koller

Die Wirkung organischer Amine auf den Abbau von Thiamin durch Fischeingeweide- und Farnkrautextrakt wurde von verschiedenen Verfassern untersucht. So haben *Sealock* und *Livermore* (1941) (1) mitgeteilt, daß m-Aminobenzylthiazolium-Salze die durch Fisch-«Thiaminase» verursachte Spaltung von Thiamin um 17,5–50% aktivierten. (Im Gegensatz dazu sollen die ortho- und para-Verbindungen unter den gleichen Versuchsbedingungen eine Hemmung ausüben.) Auch andere organische Amine, wie m-Nitranilin und m-Aminobenzoessäure wiesen eine ähnliche aktivierende Wirkung auf (*Sealock* und *Davis* [1949] [2]). *Sealock* u. Mitarb. (2) meinten, daß diese aktivierenden Amine, nachdem Ferment und Substrat einen Komplex gebildet haben, an der Abbaureaktion von Thiamin teilnehmen.

Fujita u. Mitarb. (1952) (3) und (1954) (4) untersuchten die Wirkung einer größeren Anzahl aromatischer und heterozyklischer Amine auf den Thiaminabbau, welcher u. a. durch Extrakte von Krustaceen (*Meretrix meretrix* L.), Fischeingeweiden (*Carassius carassius* L.) und von Farnkraut (*Pteris aquilina*) verursacht wurde. Anilin und Pyridin zeigten den größten Aktivierungseffekt. Die von *Fujita* mitgeteilte prozentuale Erhöhung des Vitamin B₁-Abbaues infolge der Wirkung von organischen Aminen war viel größer (bis zu 120% bei Fisch-, bis 790% bei Farnkraut- und bis 1200% bei «Krustaceen-Thiaminasen») als diejenige, von der *Sealock* berichtete. Ebenfalls im Gegensatz zu *Sealock* konnten allgemein *Fujita* u. Mitarb. keinen wesentlichen Unterschied in der Wirkung beobachten, je nachdem, ob es sich bei den aktivierenden Aminen um eine ortho-, meta- oder para-Verbindung handelte.

¹ Diese Arbeit wurde mit der Unterstützung des «Schweiz. Nationalfonds für wissenschaftliche Forschung» durchgeführt.

² Herrn Prof. J. Tomcsik zum 60. Geburtstag.

In Zusammenhang mit unseren Versuchen zur Isolierung von Anti-aneurinfaktoren von Farnkraut hat uns die Wirkung dieser organischen Amine auf die Abbaureaktion von Thiamin aus verschiedenen Gründen interessiert.

Da die bisherigen Versuchsergebnisse betreffend die Größe der Aktivierung und die Art der Amine, die einen solchen Effekt hervorrufen sollen, einander widersprechen, wurde die Wirkung einiger organischer Amine einer neuen Prüfung unterzogen.

Bestimmt wurde die Wirkung von zwei aromatischen primären Aminen, nämlich von Anilin- und *m*-Nitranilin und von einer heterozyklischen Verbindung: Pyridin. Anilin wurde zur Prüfung ausgewählt, weil es gemäß Versuchen von *Fujita* (l.c.) die größte Aktivierung bei sämtlichen «Thiaminasen» ausübte.

Die Wirkung dieser drei Amine untersuchten wir auf den Vitamin B₁-Abbau, hervorgerufen durch Farnkrautextrakt und durch einen gereinigten Karpfeneingeweideextrakt.

Methodik

Die Versuchsanordnung zur Bestimmung der Inaktivierung von Thiamin blieb die gleiche, wie wir sie früher ausführlich beschrieben haben (*Somogyi* [1952] [5]), jedoch enthielt die Versuchslösung 100 µg Thiamin/20 ml. Die Versuche wurden größtenteils bei 37° C, einige bei Zimmertemperatur durchgeführt. Die Thiaminbestimmungen wurden sowohl nach der Thiochrommethode als auch nach der von *Auerbach* (1948) (6) modifizierten *Melnick-Field* (1939) (7)-Methode durchgeführt. Die Intensität der Fluoreszenz wurde mit einem Fluorimeter, welches wir aus einem Beckman-Kolorimeter (Modell C) entwickelt haben, bestimmt. Die Farbintensität bei der Vitamin B₁-Bestimmung nach *Auerbach* wurde mit dem Beckman-Spektrophotometer, Modell DU, festgestellt. Weitere methodische Einzelheiten werden bei der Beschreibung der Versuche mitgeteilt.

Experimenteller Teil

1. Versuche mit Farnkrautextrakten

A. Die «Aktivierung» der Thiamin-Abbau-Reaktion durch Anilin, m-Nitranilin und Pyridin gemessen mit der Thiochrom-Methode

In einer ersten Versuchsreihe wurde die Wirkung von Anilin, *m*-Nitr-

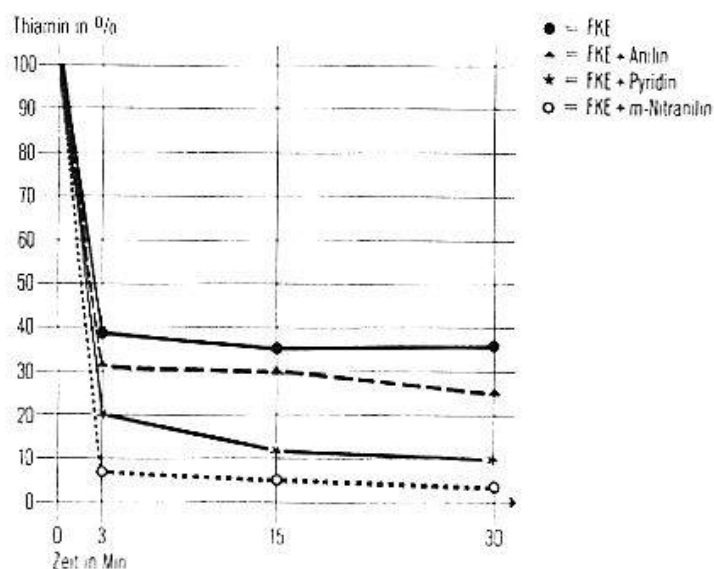


Abb. 1.

anilin und Pyridin bestimmt. Die Konzentration dieser Amine betrug in den Versuchsgemischen m/1000. Temp. 37° C.

Wie aus der Abb. 1 ersichtlich ist, inaktiviert der Farnkrautextrakt (FKE) rund 65% des vorgelegten Thiamins. Die Zugabe von m/1000 Anilin erhöht den «Abbaugrad» um 10–15%, Pyridin um ca. 30%, m-Nitranilin um ca. 40–45%.

Gemäß diesem Versuch schien m-Nitranilin den Abbau von Thiamin am meisten zu aktivieren. Im Gegensatz dazu fand *Fujita* (1954) (4), wie bereits erwähnt, daß Anilin den Vitamin B₁-Abbau rund 7mal mehr aktiviert als m-Nitranilin.

Um einen weiteren Einblick in den Wirkungsmechanismus dieser Amine zu erhalten, wurde in einer nächsten Versuchsreihe die Konzen-

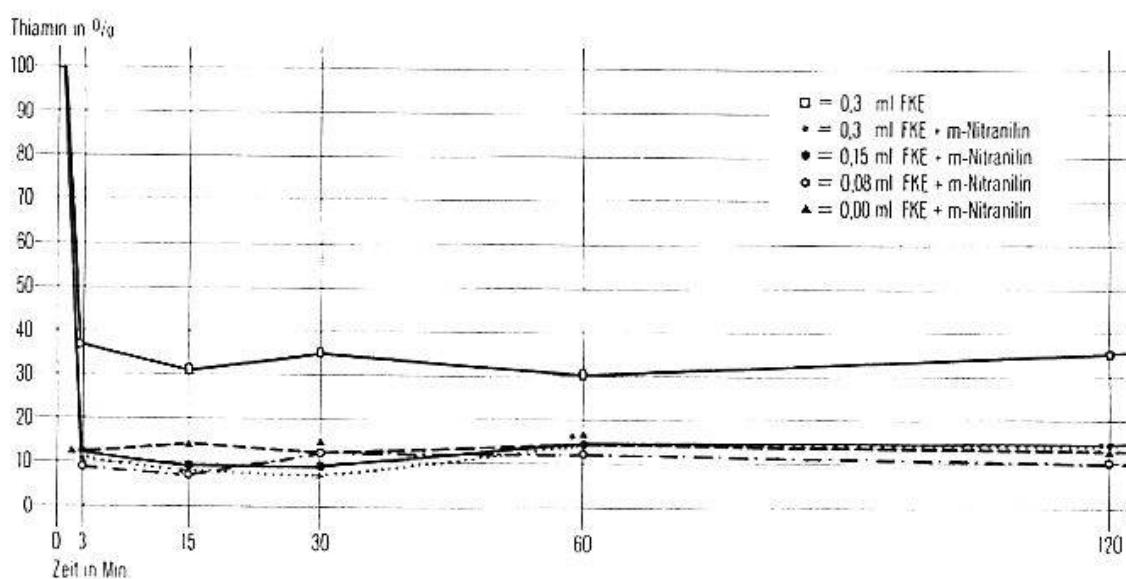


Abb. 2.

tration von m-Nitranilin konstant (m/1000) gehalten und diejenige des FKE zwischen 0,3–0 ml variiert.

Die Versuchstemperatur betrug 37° C. Weitere Einzelheiten sind aus Abb. 2 zu ersehen.

Es geht daraus hervor, daß 1. durch 0,3 ml FKE-Präparat wiederum ca. 65–70% des vorgelegten Thiamins abgebaut wurden; 2. wird in einem Parallelversuch dem Versuchsgemisch soviel m-Nitranilin zugegeben, daß seine Konzentration darin m/1000 beträgt so wird *scheinbar* mehr Thiamin, inaktiviert, nämlich 90%; 3. wird in den Versuchslösungen bei gleichbleibender m-Nitranilinkonzentration die FKE-Menge stufenweise von 0,3 bis 0 ml reduziert, so wird trotzdem jedesmal gleichviel Thiamin «inaktiviert». Diese Beobachtung ließ uns vermuten, daß es sich bei der Wirkung der organischen Amine nicht um eine wahre Aktivierung des Thiaminabbaus handeln könne.

Diese Vermutung wurde durch einen weiteren Versuch bekräftigt, in welchem man die Wirkung von m-Nitranilin allein auf die Vitamin B₁-«Inaktivierung» untersuchte. Die Konzentration von m-Nitranilin wurde von m/1000 bis m/60 000 reduziert. Das Resultat dieser Versuche ist in Abb. 3 und 4 zusammengefaßt. Die Wirkung von m-Nitranilin wurde nach 5, 15, 30 und 60 Minuten bestimmt. Versuchstemperatur: 37° C.

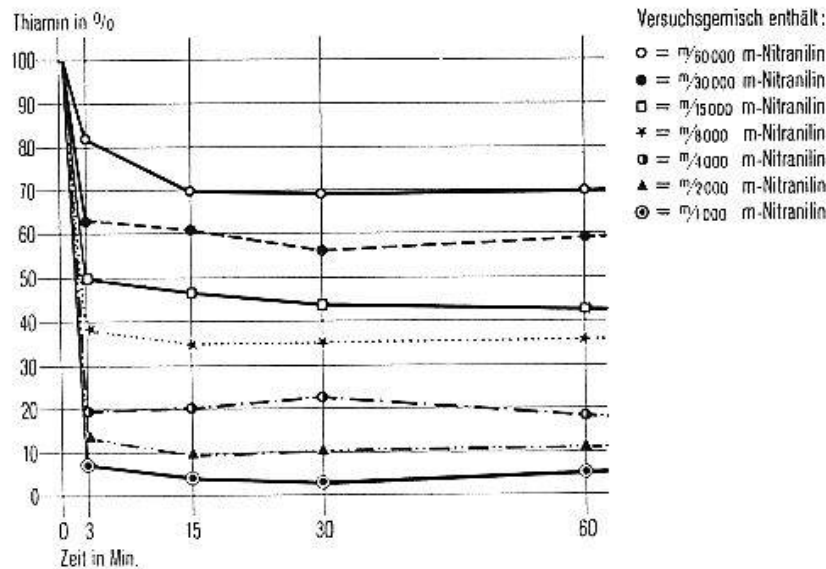


Abb. 3.

Wie aus Abb. 3 ersichtlich ist, wurde nach Zugabe von m-Nitranilin, auch in Abwesenheit von FKE, im Versuchsgemisch schon nach einer kurzen Reaktionsdauer (3 Min.) weniger Vitamin B₁ bestimmt als darin ursprünglich enthalten war. Diese Wirkung von m-Nitranilin war proportional mit seiner Konzentration (Abb. 4).

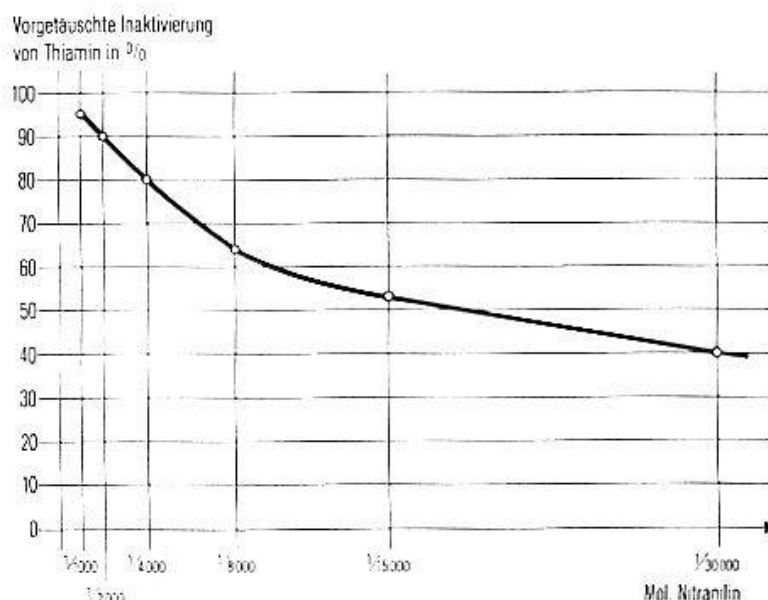


Abb. 4.

B. Interferenz der organischen Amine mit der Thiochrom-Methode

Um die Frage zu klären, ob es sich bei der eben besprochenen Erscheinung um eine Interferenz oder um eine tatsächliche Inaktivierung des Thiamins handelt, haben wir folgende Versuche angesetzt:

Je eine Versuchslösung wurde von m-Nitranilin, Anilin und Pyridin *ohne* Thiamin und ohne FKE hergestellt. Mit diesen Proben wurde der übliche Analysengang wie bei der Vitamin B₁-Bestimmung nach der Thiochrommethode ausgeführt. Die resultierenden Isobutylalkohollösungen wurden im Verhältnis 1:1 mit einer isobutylalkoholischen Lösung von Thiochrom bekannter Konzentration gemischt, und die Intensität der Fluoreszenz dann im Fluorimeter gemessen. Als Vergleich diente eine Probe der gleichen Thiochromlösung, die mit reinem Isobutylalkohol im Verhältnis 1:1 verdünnt wurde. Die Lösungen der oxidierten organischen Amine wiesen eine geringere Fluoreszenz als die Vergleichslösung auf. Diese Erscheinung deutet mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine Interferenz der organischen Amine mit der Vitamin B₁-Bestimmung nach der Thiochrommethode hin, da doch das Thiochrom nicht mehr wie das Thiamin inaktiviert werden kann.

Um Genaueres über diese Frage zu erfahren, wurden Versuchsgemische zur Bestimmung von

1. der Antithiaminaktivität des zu den Versuchen verwendeten Farnkrautextraktes allein,
2. der *scheinbaren* «Antithiaminaktivität» von FKE und organischen Aminen,
3. der *scheinbaren* «Antithiaminaktivität» der organischen Amine allein, parallel untersucht.

In den Versuchslösungen 1, 2 und 3 waren jeweils 100 Mikrogramm Thiamin enthalten, in den Testlösungen 2 und 3 betrug die Konzentration der organischen Amine m/1000. Die Gesamtmenge einer Versuchslösung war, wie immer, 20 ml, von welchen jeweils 2 ml zur Bestimmung gelangten. Diese wurden nach 5 Min. und 30 Min. Reaktionszeit durchgeführt.

4. Außerdem wurde die Intensität der Fluoreszenz von Testlösungen bestimmt, die aus einem Gemisch von Thiochrom, dessen Konzentration derjenigen von Thiamin der Testlösungen 1, 2 und 3 entsprach, und aus je einem organischen Amin bestanden. (Messung der Interferenz zwischen Thiochrom und organischen Aminen (s. S. 176, Absatz 2))

Die Resultate dieser Versuchsreihe (30 Min.-Werte) sind in Abb. 5 graphisch dargestellt.

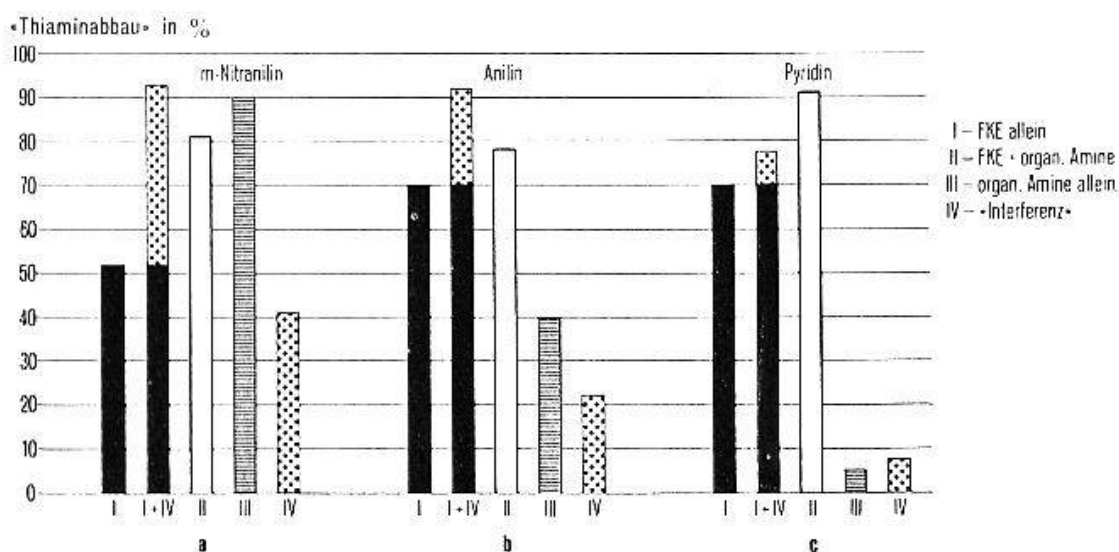


Abb. 5.

Wie aus dieser Abbildung hervorgeht, ist die Summe (Kolonne I+IV) von Kolonne I (Aktivität von FKE allein) und Kolonne IV («Interferenz» von Thiochrom und organischen Aminen) beim m-Nitranilinversuch und beim Anilinversuch stets größer als die Kolonne II (scheinbare «Aktivität» von FKE und organischen Aminen im Gemisch).

Beim Pyridin-Versuch ist die Kolonne II größer als die Summe von Kolonne I und IV. Eine geringe Aktivierung der Antithiaminaktivität von FKE durch Pyridin scheint demnach möglich, dagegen kann eine Aktivierung des Vitamin B₁-Abbaues durch m-Nitranilin und Anilin ausgeschlossen werden. Es handelt sich um eine Interferenzerscheinung zwischen Thiochrom und den erwähnten Aminen. Die Interferenzen betragen für m-Nitranilin 40–50%, Anilin 20–25% und für Pyridin 4–10%.

Interessant ist in diesem Zusammenhang zu erwähnen, daß die Interferenz zwischen m-Nitranilin und Thiochrom bei steigender Konzentra-

tion von *m*-Nitranilin zunimmt, während sie bei Pyridin bzw. Anilin bei höheren Konzentrationen als $m/2000$ praktisch konstant bleibt (Abb. 6).

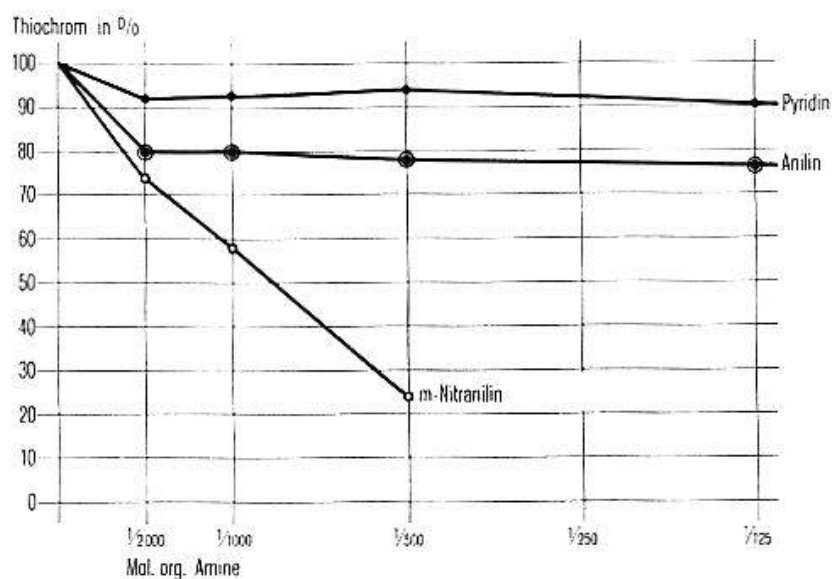


Abb. 6.

Der Grund dieser Interferenz hat uns näher interessiert. Bevor wir aber in der Besprechung auf die diesbezüglichen weiteren Versuche eingehen, scheint es uns notwendig, das verwendete Fluorimeter kurz zu beschreiben. Dieses ist in Abb. 7 schematisch dargestellt.

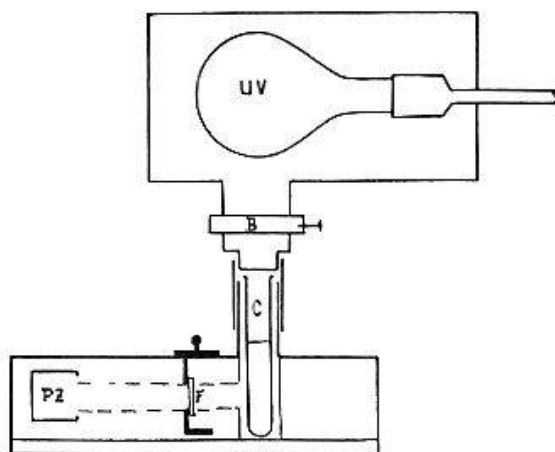


Abb. 7. UV = UV-Lampe, B = Blende, C = Küvette mit Meßlösung, F = Filter, PZ = Photozelle.

Die zu bestimmende Thiochromlösung wird in eine speziell geeichte Küvette gegeben und im Fluorimeter von oben mit UV-Licht bestrahlt. Die verwendete Lampe war eine Philips-UV-Lampe HPW 125 W Typ 57 202 E/70 mit einem Kobaltfilter. Das von ihr ausgestrahlte Licht hat eine Wellenlänge von $365,5 \text{ m}\mu$. Das Fluorimeter wird mittels Testlösungen bekannter Thiochromkonzentrationen und mit Hilfe einer

Blende geeicht. Das so dosierte UV-Licht erzeugt in der Lösung eine durch das Thiochrom verursachte Fluoreszenz. Dadurch wird seitlich aus der Küvette sichtbares Licht ausgestrahlt, das durch ein Sekundärfilter tritt und schließlich in die Photozelle gelangt.

Unsere Hypothese für die «Interferenz» der organischen Amine mit Thiochrom war nun die folgende: Die «oxydierten» organischen Amine gelangen bei der Vitamin B₁-Bestimmung durch das Ausschütteln mit Isobutylalkohol wie das Thiochrom ebenfalls in die Meßlösung. Da die oxydierten organischen Amine die Eigenschaft haben, UV-Licht zu absorbieren, wirkt die Schicht vom Flüssigkeitsspiegel bis zur Meßstelle als Filter. Es trifft somit weniger UV-Licht an die Meßstelle als oben eingestrahlt wird. Diese absorbierende Schicht hat die gleiche Wirkung wie ein Schließen der Blende. Aus diesem Grunde kann nicht die wahre Konzentration des Thiochroms abgelesen werden.

Um diese Annahme zu beweisen, haben wir m/1000 Versuchslösungen der drei untersuchten organischen Amine hergestellt. Je 2 ml dieser Lösungen wurden 2 Min. lang mit je 10 ml Isobutylalkohol ausgeschüttelt. Die Absorption der Isobutylalkoholextrakte wurde zwischen den Wellenlängen 300 und 400 m μ in einer Schichtdicke von 1 cm mit dem Beckman-Spektrophotometer DU gemessen (Abb. 8a).

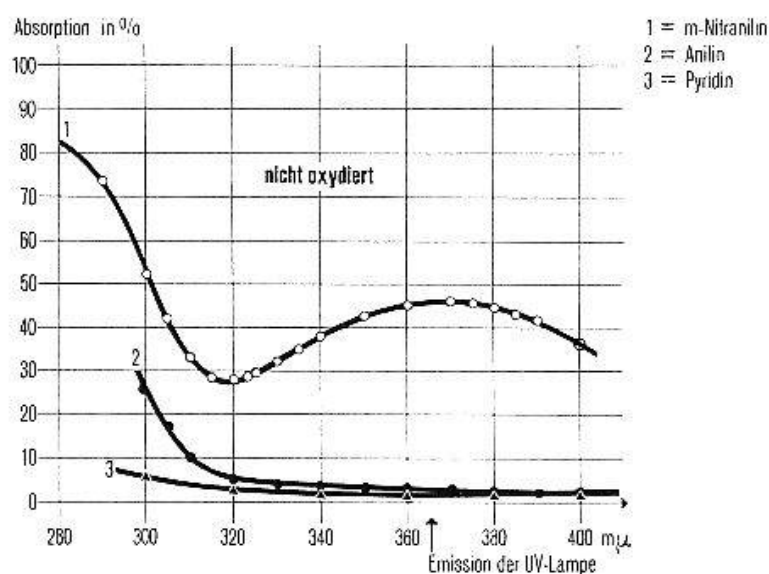


Abb. 8a.

Außerdem wurden von den drei Versuchslösungen je 2 ml alkalisch oxydiert und ebenfalls mit 10 ml Isobutylalkohol ausgeschüttelt, ähnlich wie das bei der Vitamin B₁-Bestimmung geschieht. Die erhaltenen Lösungen enthielten die «oxydierten» Amine. Ihre Absorptionskurven zeigt Abb. 8b.

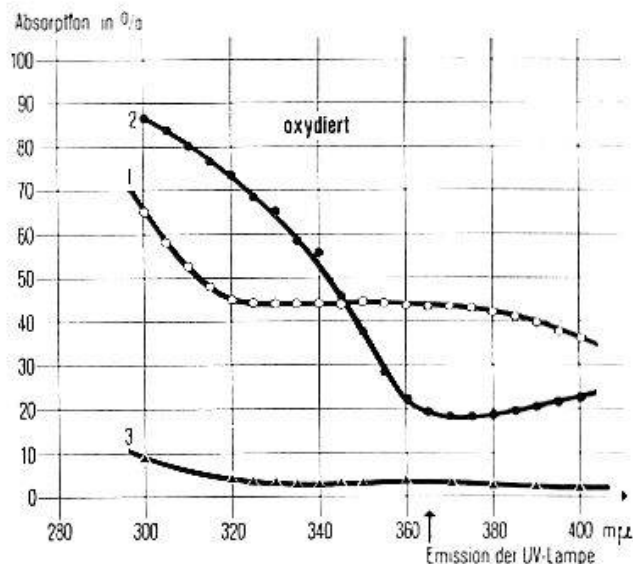


Abb. 8b.

Aus der Abb. 8b ist ersichtlich, daß durch die «alkalische Oxydation» die Absorptionskurven von m-Nitranilin und Anilin wesentlich verändert werden, während diejenige von Pyridin praktisch unverändert bleibt. Für die Interferenz der organischen Amine mit Thiochrom ist die Absorption der «oxydierten» Amine verantwortlich (Abb. 8b), da bei der alkalischen Oxydation des Thiamins zu Thiochrom die Amine ebenfalls mitoxydiert werden.

Die von uns im Fluorimeter verwendete UV-Lampe hat eine Emissionsbande mit dem Maximum bei 365,5 mμ, die nach beiden Seiten sehr steil abfällt. Somit ist die Absorption bei dieser Wellenlänge von Bedeutung. Die so gemessenen Absorptionen einer Schichtdicke von 1 cm der «oxydierten» Amine (Konzentration im Versuchsgemisch m/1000, entspricht einer Endkonzentration in der Meßlösung von m/5000) betragen: für m-Nitranilin 44%, für Anilin 19%, für Pyridin 4%. Diese Werte stimmen gut mit den in unserem Fluorimeter gemessenen Interferenzen überein (s. Abb. 5).

C. Die Wirkung von organischen Aminen auf den Thiaminabbau, gemessen mit der Auerbach-Methode

Die Versuche, die in Abschnitt A besprochen wurden, wiederholten wir, jedoch wurden die Vitamin B₁-Bestimmungen nicht mit der Thiochrom-, sondern nach der von Auerbach (1948) (6) modifizierten Melnick-Field-Methode durchgeführt.

Der Grund dafür liegt einerseits darin, daß Sealock u. Mitarb. (1, 2) zu ihren Versuchen diese Methode verwendeten, und andererseits schien

es uns von Bedeutung, die bisher erhaltenen Ergebnisse mit einer anderen B₁-Bestimmung nachzuprüfen.

Die *Auerbach-Melnick-Field-Methode*, die auf einer Azofarbreaktion basiert, ist viel weniger empfindlich als die Thiochrom-Methode, doch ergibt sie in geeignetem Bereich zufriedenstellende Resultate. Die Intensität der Farbreaktion wurde in einem Beckman-Spektrophotometer DU bei 250 m μ gemessen. In diesem Fall konnte eine eventuelle Interferenz durch die Kontrollösungen in der Vergleichsküvette im voraus ausgeschaltet werden. Die Konzentration der organischen Amine betrug im Versuchsgemisch m/1000. Die Versuchsanordnung war die gleiche wie bei den früheren Experimenten. Die Versuche bestätigten unseren ersten Befund. Wie aus Abb. 9 ersichtlich ist, aktivierten Anilin und m-Nitranilin den Vitamin-B₁-Abbau gar nicht und Pyridin in geringem Maße.

Zu gleichen Ergebnissen gelangten wir, wenn die Versuchsgemische 2 Stunden bei 37° gehalten wurden.

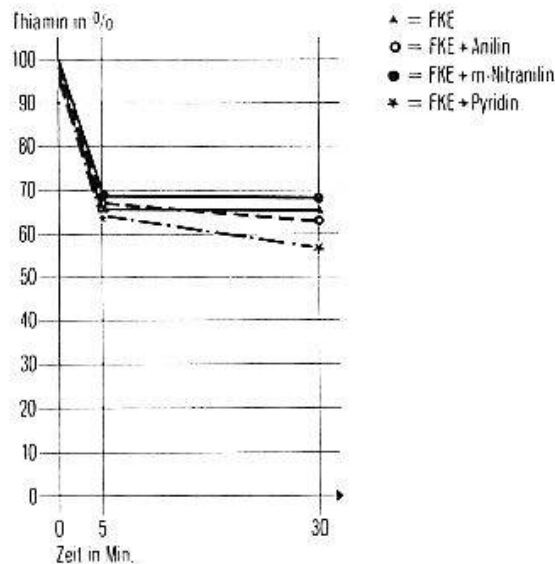


Abb. 9.

2. Versuche mit Karpfen-«Thiaminase»

Die Versuche, die vorhergehend mit FKE durchgeführt wurden, haben wir mit einem gereinigten Karpfeneingeweideextrakt (KEE) wiederholt. Die Versuchsanordnung blieb unverändert. Die Bestimmungen wurden mit der Thiochrommethode durchgeführt.

Auch die Versuchsergebnisse, abgesehen von kleineren Abweichungen, von welchen nachfolgend berichtet wird, decken sich weitgehend mit denjenigen, die wir mit FKE erhalten haben. Darum werden diese Versuche nur kurz besprochen. Die wichtigsten Ergebnisse sind die folgenden:

Reduziert man bei gleichbleibender m-Nitranilinkonzentration (m/1000)

die KEE-Menge stufenweise, so wird scheinbar – ähnlich wie bei FKE – gleich viel Thiamin «inaktiviert».

Wir haben diesen Versuch ergänzt, indem bei gleichbleibenden KEE-Mengen die Konzentration von m-Nitranilin im Versuchsgemisch von m/8000 bis m/1000 erhöht wurde. Die Menge des «inaktivierten» Thiamins ist proportional der m-Nitranilin-Konzentration (Abb. 10).

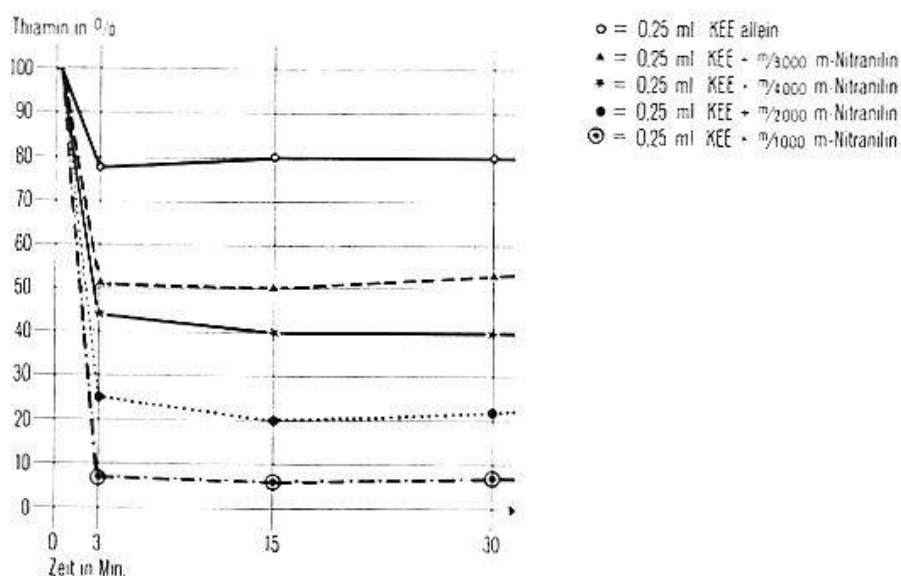


Abb. 10.

Zu ähnlichen Ergebnissen führten die Versuche mit Anilin. Wird dagegen dem Versuchsgemisch Pyridin zugegeben, so kann nach 30 Min. Reaktionsdauer in der Testlösung praktisch die gleiche Menge Thiamin (nur 5–10 % Abnahme) wie vor der Zugabe von Pyridin bestimmt werden (Abb. 11, Pyridin allein).

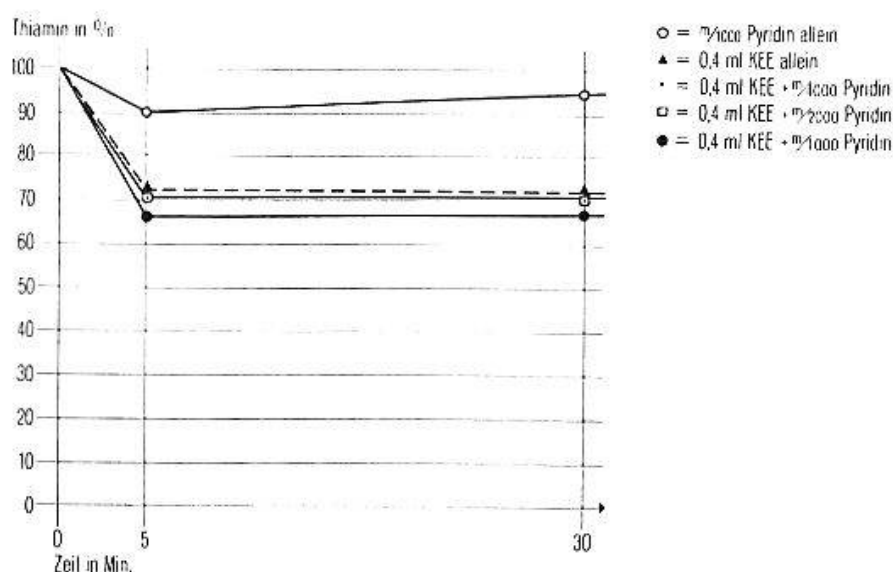


Abb. 11.

Wie aus der Abb. 11 weiter ersichtlich ist, aktiviert Pyridin den durch KEE verursachten Thiaminabbau nicht.

Dieses Resultat stimmt gut mit den Ergebnissen der nachfolgenden Versuche überein, die zeigen, daß Pyridin keine Wirkung auf den durch KEE hervorgerufenen Thiaminabbau ausübt. Das Pyridin verhält sich demnach gegenüber KEE anders als gegenüber FKE.

Die weiteren Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 12 zusammengefaßt (vgl. mit Abb. 5).

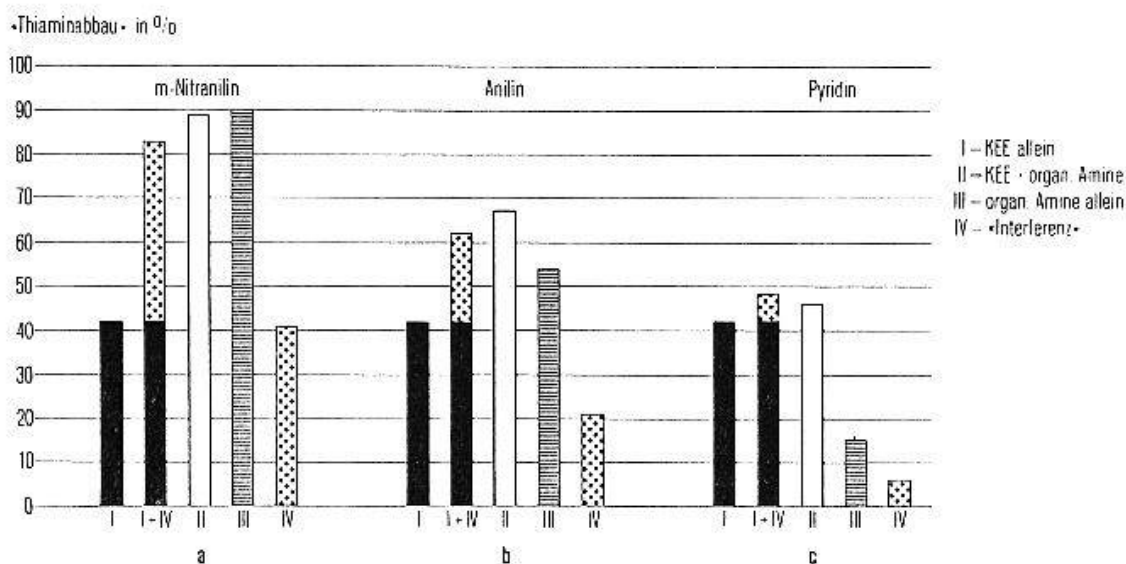


Abb. 12.

Daraus geht hervor, daß die Summe (Kolonne I + IV) des durch KEE inaktivierten Thiamins (Kolonne I) und der gemessenen Interferenz von Thiochrom mit m-Nitranilin (Kolonne IV) etwas geringer ist (s. auch S. 176, Absatz 2) als die «Inaktivierung» von Thiamin, falls im Versuchsgemisch KEE und organische Amine enthalten sind (Kolonne II). Zu den gleichen Ergebnissen führten die Versuche mit Anilin (Abb. 12 b). In beiden Fällen ist die Differenz zwischen Kolonne I + IV und Kolonne II sehr klein (ca. 6%) und nicht signifikant, so daß dies nicht als Aktivierung des Thiaminabbaues betrachtet werden darf.

Folgende weitere Versuche beweisen, daß die zwei erwähnten organischen Amine den durch KEE hervorgerufenen Thiaminabbau nicht aktivieren:

1. Das Gemisch von KEE und von m-Nitranilin (Kolonne II) weist keine größere scheinbare «Antithiaminaktivität» auf als das m-Nitranilin allein (Kolonne III).

2. Die Summe des durch KEE inaktivierten Thiamins (Kolonne I) und der durch m-Nitranilin bzw. Anilin vorgetäuschten «Aktivität» (Kolonne III) ist größer als die scheinbare «Inaktivierung» von Thiamin,

falls im Versuchsgemisch KEE und m-Nitranilin bzw. Anilin (Kolonne II) enthalten sind.

Im Gegensatz zu den Thiaminabbauversuchen mit FKE, bei welchen eine geringe Aktivierung durch Pyridin möglich zu sein scheint, erhöht Pyridin die *Antithiaminaktivität* von KEE nicht, wie das aus Abb. 12c gut ersichtlich ist. Die Summe (Kolonne I+ IV) von inaktiviertem Thiamin (Kolonne I) und von der Interferenz von Pyridin mit Thiochrom (Kolonne IV) ist demnach auch praktisch gleich groß, wie die scheinbare «Inaktivierung» durch KEE und Pyridin zusammen (Kolonne II). Dies ist der auffallende Unterschied zwischen den Versuchen mit FKE und KEE in Anwesenheit von Pyridin.

Aus den vorliegenden Versuchen geht hervor, daß von den untersuchten Aminen das m-Nitranilin und Anilin den durch FKE und KEE verursachten *Abbau von Thiamin nicht aktivieren*. Gleichermassen beeinflußt Pyridin die Antithiaminaktivität von KEE in keiner Weise und übt nur eine sehr geringe Aktivierung auf den Vitamin B₁-Abbau durch FKE aus.

Zu gleichen Ergebnissen gelangten wir unabhängig davon, ob die Thiaminbestimmungen mit der Thiochrom- oder mit der Auerbach-Methode durchgeführt wurden.

Die scheinbare Aktivierung der Vitamin B₁-Abbaureaktion ist durch die Lichtabsorption der in der Testlösung vorhandenen Amine, wie das die fluorimetrischen Bestimmungen zeigen, vorgetäuscht.

Die erwähnten organischen Amine *ändern auch den Verlauf und den Charakter der Thiaminabbaureaktion nicht*. Dieser Befund ist von Bedeutung, da es ein weiterer Beweis dafür sein dürfte, daß die organischen Amine keine wesentliche Rolle in der Thiaminabbaureaktion spielen, wie das bis anhin angenommen wurde (*Sealock und Davis (1949) (2), Woolley (1953) (8)*).

Unsere Versuche berühren aber nicht die Frage, wie weit diese Abbaureaktion von bestimmten spezifischen Reaktionsprodukten, wie z. B. das von *Hennessy u. Mitarb. (1952) (9), (1957) (10)* beschriebene «Iethiamin» (4-Amino-5(2-aminoäthansulfonyl)methyl-2-methylpyridin), welches während der B₁-Spaltung durch KEE entsteht, beeinflußt wird.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob organische Amine (Anilin, m-Nitranilin und Pyridin) den durch Farnkrautextrakt (FKE) bzw. Karpfeneingeweideextrakt (KEE) hervorgerufenen Thiaminabbau aktivieren oder nicht. Die Bestimmung von Thiamin wurde größtenteils

mit der *Thiochrom*-, kontrollshalber nach der *Auerbach-Melnick-Field*-Methode durchgeführt. Unsere Versuche ergaben folgende Resultate:

1. Enthält das Versuchsgemisch eines der organischen Amine in m/1000 Konzentration, so wird der durch FKE hervorgerufene Thiaminabbau durch m-Nitranilin um 40–45 %, durch Pyridin um ca. 30 % und durch Anilin um 10–15 % *scheinbar* erhöht.

2. Wurde in den Versuchslösungen bei gleichbleibender m-Nitranilinkonzentration (m/1000) die FKE-Menge stufenweise von 0,3–0 ml reduziert, so wurde trotzdem jedesmal gleichviel Thiamin «inaktiviert». Diese Beobachtung führte zu der Vermutung, daß es sich bei der Wirkung der organischen Amine nicht um eine eigentliche Aktivierung des Thiaminabbaues handeln könne.

3. Nachfolgend wurde die Wirkung von m-Nitranilin allein auf die Vitamin B₁-Aktivierung untersucht. Im Versuchsgemisch wurde nach Zugabe von m-Nitranilin (Konzentrationen m/1000–m/60 000) auch in Abwesenheit von FKE weniger Vitamin B₁ bestimmt als ursprünglich enthalten war. Diese Wirkung von m-Nitranilin war proportional mit seiner Konzentration in der Versuchslösung.

4. Weitere Versuche ergaben, daß die organischen Amine mit dem Thiochrom, in welches das Vitamin B₁ bei der Bestimmung übergeführt wird, interferieren. Die Interferenzen betragen für m-Nitranilin 40–50 %, Anilin 20–25 %, Pyridin 4–10 %. Auf Grund dieser Experimente kann eine Aktivierung des Vitamin B₁-Abbaues durch m-Nitranilin und Anilin ausgeschlossen werden; eine geringe Aktivierung durch Pyridin scheint möglich.

5. Durch die Bestimmung der Absorptionskurven von «oxydierten» und nichtoxydierten Aminen konnte der Grund der Interferenz abgeklärt werden. Die Ursache dieser Interferenz ist die Absorption des UV-Lichtes durch die «oxydierten» organischen Amine. Die gemessenen Absorptionen betragen: für m-Nitranilin 44 %, für Anilin 19 %, für Pyridin 4 %.

6. Die Versuche, in welchen die Vitamin B₁-Bestimmungen nach der *Auerbach-Melnick-Field*-Methode durchgeführt wurden, haben obige Befunde bestätigt.

7. Die vorhergehenden Versuche wurden mit einem gereinigten KEE wiederholt. Der durch KEE hervorgerufene Thiaminabbau wird durch Anilin, m-Nitranilin sowie auch durch Pyridin nicht aktiviert. Die Versuchsergebnisse decken sich somit weitgehend mit denjenigen, die mit FKE erhalten wurden. Der einzige Unterschied besteht darin, daß Pyridin den Thiaminabbau durch FKE in geringem Maße aktiviert, nicht dagegen denjenigen durch KEE.

Résumé

Dans le présent travail les auteurs ont cherché à déterminer si des amines organiques (aniline, m-nitraniline et pyridine) activent ou non la dégradation de la thiamine, comme le font l'extrait de fougère (FKE) ou l'extrait d'intestins de carpe (KEE). La détermination de la thiamine a été faite la plupart du temps par la *méthode au thiochrome*, et contrôle selon la méthode de *Auerbach-Melnick-Field*. Les essais nous ont donné les résultats suivants:

1. Lorsque la solution à examiner contient une des amines organiques à une concentration de m/1000, la dégradation de la thiamine par la FKE *semble être* augmentée de 40–45 % par la m-nitraniline, d'environ 30 % par la pyridine, et de 10–15 % par l'aniline.

2. Si, dans la solution examinée l'on maintient la concentration de m-nitraniline au même niveau (m/1000), mais réduit la quantité de FKE progressivement de 0,3 à 0 ml, l'on constate que la quantité de thiamine «inactivée» est restée constante. Cette constatation permet l'hypothèse que les amines organiques n'ont pas une véritable action accélératrice dans la désintégration de la thiamine.

3. Puis nous avons examiné l'action de la m-nitraniline seule dans l'inactivation de la vitamine B₁. Dans le mélange examiné, après adjonction de m-nitraniline (en concentrations de m/1000 à m/60 000) et en l'absence de FKE, on a trouvé moins de vitamine B₁ qu'il n'en avait été mise auparavant. Cet effet de la m-nitraniline était en relation directe avec sa concentration dans la solution examinée.

4. D'autres expériences ont montré que ces amines organiques interfèrent avec le thiochrome, substance en laquelle la vitamine B₁ se transforme lors de la détermination. Cette interférence est de 40–50 % pour la m-nitraniline, 20–25 % pour l'aniline, 4–10 % pour la pyridine. Sur la base de ces essais, l'on peut exclure une activation de la dégradation de la vitamine B₁ par la m-nitraniline ou l'aniline; une activation minime par la pyridine semble par contre possible.

5. En déterminant les courbes d'absorption d'amines «oxydées» et non oxydées, l'on parvient à expliquer la cause de ces interférences. Elle réside dans l'absorption des rayons U.V. de la lumière par les amines organiques «oxydées». Les mesures d'absorption faites ont donné les valeurs suivantes: pour le m-nitraniline 44 %, pour l'aniline 19 %, pour la pyridine 4 %.

6. Les expériences, au cours desquelles la détermination de la vitamine B₁ a été faite selon la méthode de *Auerbach-Melnick-Field*, ont confirmé les résultats précités.

7. Tous les essais précités ont été répétés avec un KEE purifié. La dégradation de la thiamine par le KEE n'est pas accélérée par l'aniline, la m-nitraniline ou la pyridine. Le résultat de ces expériences est donc tout à fait comparable à celui obtenu avec le FKE. La seule différence réside en le fait que la pyridine accélère un peu la dégradation de la thiamine induite par le FKE, et n'influence pas celle due au KEE.

Riassunto

Nel presente lavoro fu studiata l'azione di alcune amine organiche (Anilina, m-Nitroanilina, Piridina) in relazione alla loro facoltà di attivare o meno l'azione demolitrice, rispetto alla molecola della Tiamina, del principio attivo contenuto nell'estratto di felce (FKE) e nell'estratto di interiora di carpione (KEE).

Le determinazioni della Tiamina furono condotte col metodo del Tio-cromo e controllate col metodo di Auerbach-Melnick-Field. I nostri esperimenti diedero i seguenti risultati:

1. Se il miscuglio di prova contiene una delle amine organiche in concentrazione m/1000, l'azione demolitrice del FKE ne risulta *apparentemente* aumentata e precisamente del 40-45%, 30%, 10-15% a seconda se è presente m-Nitroanilina, Piridina o Anilina.

2. Mantenendo costante la concentrazione della m-Nitroanilina nel liquido da esaminare e variando gradualmente la quantità di FKE da 0,3 a 0 ml, è stato osservato che ogni volta veniva inattivata la stessa quantità di Tiamina, il qual fatto portò alla conclusione che non poteva trattarsi di un effettivo incremento del potere degradatore per opera delle amine organiche.

3. In seguito fu esaminata l'azione della m-Nitroanilina sull'inattivazione della vitamina B₁. Nel miscuglio di prova, in seguito all'aggiunta di m-Nitroanilina (conc. m/1000 a m/60 000) anche in assenza di FKE, fu trovata una quantità di vitamin B₁ inferiore a quella originaria.

4. Da altre prove risultò che le amine organiche interferiscono sul tiocromo nel quale la vitamina B₁ viene trasformata nel corso della determinazione. Tale interferenza è del 40-50% per la m-Nitroanilina, 20-25% per l'Anilina, 4-10% per la Piridina. In base a questi esperimenti può escludersi che la m-Nitroanilina e l'Anilina possano incrementare il processo di degradazione della molecola della vitamina B₁; ciò appare possibile, per quanto in misura molto limitata, soltanto per la Piridina.

5. Si potè chiarire la causa della suddetta interferenza mediante la determinazione delle curve di assorbimento delle amine «ossidate» e

«non ossidate», inquantochè si potè osservare che le amine organiche ossidate assorbono la luce ultravioletta. Tale assorbimento è del 44% per la m-Nitroanilina, 19% per l'Anilina, 4% per la Piridina.

6. I nostri esperimenti, dei quali le varie determinazioni della vitamina B₁ furono fatte secondo il metodo di Auerbach-Melnick-Field, confermarono i suddetti risultati.

7. Gli esperimenti furono ripetuti con KEE purificato. Il processo di degradazione della molecola della Tiamina per opera del KEE non viene attivato dalla presenza di Anilina, m-Nitroanilina e Piridina. I risultati degli esperimenti concordano con quelli ottenuti con FKE. L'unica differenza consiste nel fatto che la Piridina incrementa l'azione del FKE sulla Tiamina, anche se in misura limitata, fatto che non si osserva trattandosi di KEE.

Summary

The purpose of the present paper was to study whether organic amines (aniline, m-nitroaniline and pyridine) activate the breakdown of thiamine caused by extract of fern and extract of carp intestines or not. Thiamine was determined mainly by the *Thiochrome method*—and as a check by the *Auerbach-Melnick-Field method*. Our experiments gave the following results:

1. If the test mixture contains one of the organic amines in a concentration of m/1,000, then the thiamine degradation caused by extract of fern is *apparently* increased 40 to 45 per cent by m-nitroaniline, about 30 per cent by pyridine and 10 to 15 per cent by aniline.

2. If, with the concentration of m-nitroaniline remaining the same (m/1,000), the amount of extract of fern was reduced step by step from 0.3 to 0 ml, yet just as much thiamine was “inactivated” each time. This suggested that the effect of organic amines could not actually be due to activation of thiamine degradation.

3. Subsequently the effect of m-nitroaniline alone on vitamin B₁ inactivation was studied. In the test mixture after addition of m-nitroaniline (concentration of m/1,000 to m/60,000), even in the absence of extract of fern, less vitamin B₁ was found than was originally present. This effect was proportional to the concentration of m-nitroaniline in the test solution.

4. Further experiments showed that the organic amines interfere with the thiochrome into which vitamin B₁ is converted during assay. The interference amounts to 40 to 50 per cent for m-nitroaniline, 20 to 25 per cent for aniline and 4 to 10 per cent for pyridine. These experiments exclude the possibility of m-nitroaniline or aniline activating the break-

down of vitamin B₁; slight activation by pyridine would seem to be possible.

5. Determination of the absorption curves of "oxidized" and non-oxidized amines clarified the cause of the interference, i.e. the absorption of ultra-violet light by "oxidized" organic amines. The absorptions measured were: 44 per cent for m-nitroaniline, 19 per cent for aniline and 4 per cent for pyridine.

6. Experiments in which vitamin B₁ was assayed by the *Auerbach-Melnick-Field* method confirmed the above findings.

7. The preceding tests were repeated with a purified extract of carp intestines. The thiamine degradation caused by extract of carp intestines is not activated by aniline, m-nitroaniline or pyridine. The test results agree therefore to a large extent with those obtained with extract of fern. The only difference is that pyridine activates thiamine degradation by extract of fern to a slight extent, but not that by extract of carp intestines.

Wir danken Herrn Prof. A. Muralt, für die anregenden Diskussionen und für sein Interesse, welches er diesen Versuchen entgegengebracht hat.

Dem «Schweizerischen Nationalfonds für wissenschaftliche Forschung» möchten wir auch an dieser Stelle für die gewährte Unterstützung unseren besten Dank aussprechen.

1. Sealock, R. R., und Livermore, A. H.: J. Biol. Chem. **177**, 553 (1949).
2. Sealock, R. R., und Davis, N. C.: J. Biol. Chem. **177**, 987 (1949).
3. Fujita, A., u. Mitarb.: J. Biol. Chem. **196**, 289 (1952).
4. Fujita, A.: Advances in Enzymol. XV, 389 (1954).
5. Somogyi, J. C.: Die Antianeurin-Faktoren. Verlag Hans Huber, Bern 1952.
6. Auerbach, H. E.: J. Amer. pharm. Ass., sci. Ed. **29**, 313 (1940).
7. Melnick, D., und Field, H.: J. Biol. Chem. **127**, 495 (1939).
8. Woolley, D. W.: Nature **171**, 323 (1953).
9. Barnhurst, J. D., und Hennessy, D. J.: J. Amer. chem. Soc. **74**, 353, 356 (1952).
10. Kupstas, E. E., und Hennessy, D. J.: J. Amer. chem. Soc. **79**, 5217 (1957).

