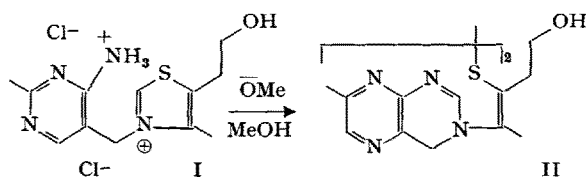


Thiamine Disulfide Anhydride: A New Fluorescent Derivative of Thiamine

Recent investigations^{1,2} on the functions of the 6-aminopyrimidyl and 5- β -hydroxyethyl groups of thiamine have led us to reinvestigate the reports by KINNERSLEY et al.³ on the existence of biologically active fluorescent derivatives of thiamine. This reinvestigation has also included the effect of sodium methoxide on the vitamin, and this study has led to the isolation of a new fluorescent derivative. The conditions for the reaction are as follows: Thiamine hydrochloride (I) (1.348 g, $4 \cdot 10^{-3}$ m) and sodium methoxide (1.000 g, $1.8 \cdot 10^{-2}$ m) were dissolved in absolute methanol (45 cm³). The solution was then refluxed for 12 h, and at the end of this time it exhibited a strong blue fluorescence. The alkaline solution was then diluted with saturated sodium chloride (100 cm³), and extracted with isobutyl alcohol. The extract was then concentrated to approximately one-fifth of its original volume and cooled. The solution was then filtered to remove the salt, and the filtrate was heated again until the product hardened upon cooling. After cooling it was washed with petroleum ether, and then acetone was added, at which time a white crystalline product precipitated. The yield was about 250 mg, 25%, m.p. 168–170°.



Analyzed for C₂₄H₃₀O₂N₂S: Found: C 53.8%; H 6.4%; N 21.1%; S 11.8%. Calculated: C 54.5%; H 6.1%; N 21.2%; S 12.1%. UV: λ_{max} (EtOH) = 305 m μ , log ϵ = 3.97. IR: (CHCl₃), 3.95 μ , 3.35 μ , 5.98 μ , 6.20 μ , 6.30 μ , 6.96 μ .

We have assigned structure (II) to the derivative on the basis of the UV- and IR-spectra, and two chemical facts: (1) When the compound is allowed to stand overnight in 5% sodium hydroxide, it is converted to thiamine disulfide⁴. (2) Reduction of the compound with tin and hydrochloric acid affords thiamine hydrochloride (Rf = 0.56; butyl alcohol:acetic acid:H₂O (1:1:1))⁵.

Zusammenfassung. Es wird die Isolierung eines neuen fluoreszierenden Thiaminderivates beschrieben.

G. E. RISINGER, P. N. PARKER,
and H. H. HSIEH

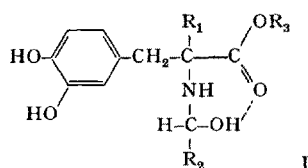
Department of Biochemistry, Louisiana State University,
Baton Rouge, and Department of Chemistry, Louisiana
Polytechnic Institute, Ruston (La. USA),

- ¹ G. E. RISINGER and M. F. DOVE, Chem. and Ind., in press.
- ² G. E. RISINGER and F. E. PELL, Biochim. biophys. Acta, in press.
- ³ H. W. KINNERSLEY, J. R. O'BRIEN, and R. A. PETERS, Biochem. J. 29, 2369 (1935).
- ⁴ O. ZIMA and R. R. WILLIAMS, Ber. dtsch. chem. Ges. 73 B, 941 (1940).
- ⁵ This investigation was supported in part by Public Health Research Grant AM-08590-01 from the National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases.

Über neue geminale Aminocarbinole

Geminale Aminocarbinole (Carbinolamine) aus primären Aminen und Aldehyden konnten nur in wenigen Fällen isoliert werden¹⁻⁴.

Beim Versuch Dopa und ihre in α -Stellung alkylierten Abkömmlinge, sowie die entsprechenden Ester mit Aldehyden in Reaktion zu bringen, haben wir nun sehr stabile geminale Aminocarbinole isoliert. Die Ausbeuten sind meistens gut, sie werden erhöht bei der Zugabe von Säuren, welche die Reaktion katalysieren. Als Medium kann Wasser oder Alkohol dienen. Das Infrarotspektrum der hergestellten geminalen Aminocarbinole ist sehr charakteristisch (ν OH) ν bedeutet die Frequenz der Valenzschwingung (Phenol) = 3410 cm⁻¹; ν CO (aliph. Ester) = 1730 cm⁻¹; ν OH (Wasserstoffbrücke vom OH...OC Typ) = 3200–2400 cm⁻¹; ν NH = 3280 cm⁻¹, und entspricht der folgenden Struktur:



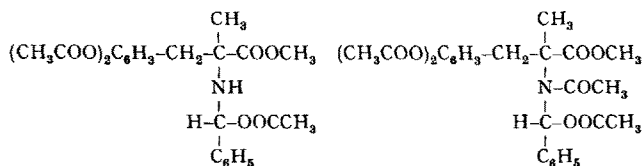
In den Verbindungen tritt also infolge einer Wasserstoffbrücke ein siebengliedriger Ring auf, welcher die

Aminocarbinolstruktur stabilisiert. Bei der Acetylierung der Ester-Addukte-I werden typische Acetylprodukte erhalten. Als in I R₂ ein aromatischer Rest war (z.B. R₁ = CH₃, R₂ = C₆H₅ und R₃ = CH₃) wurde unter milden Bedingungen eine Triacetylverbindung vom Typ II gewonnen [Schmp. 148–149°C; Ber. auf C₂₄H₂₇NO₈ (475,4); C 63,01, H 5,95, N 3,06; Gef. C 62,88, H 6,06, N 3,09; ν NH = 3330 cm⁻¹; ν CO (Phenolester) = 1770 cm⁻¹; ν CO (aliph. Ester) = 1728 cm⁻¹], bis unter energiereichen Bedingungen das Tetracetat III sich bildete [Schmp. 194–195°C; Ber. auf C₂₈H₂₉NO₉ (499,5); C 62,51, H 5,85, N 2,81; Gef. C 62,58, H 5,86, N 3,09; ν CO (Phenolester) = 1775 cm⁻¹; ν CO (aliph. Ester) = 1730 cm⁻¹; ν CO (Amid-I Bande) = 1650 cm⁻¹].

Das Addukt aus einem aliphatischen Aldehyd z.B. Acetaldehyd (I, R₁ = R₂ = R₃ = CH₃) lieferte nach Acetylieren den Diester der Schiffchen-Base IV [Schmp. 123–124°C; Ber. auf C₁₇H₂₁NO₈ (369,3); C 64,48, H 5,73, N 3,79; Gef. C 64,32, H 5,67, N 3,92; ν CO (Phenol-

- ¹ A. HANTSCH und O. SCHWAB, Ber. dtsch. chem. Ges. 34, 830 (1901).
- ² O. DIMROTH und R. ZOEPFRITZ, Ber. dtsch. chem. Ges. 35, 984 (1902).
- ³ O. DIMROTH und R. ZOEPFRITZ, Ber. dtsch. chem. Ges. 35, 993 (1902).
- ⁴ L. RÜGHEIMER, Ber. dtsch. chem. Ges. 39, 1653 (1906).

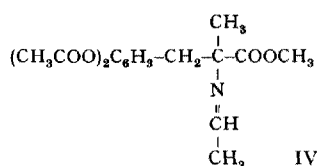
ester) = 1775 cm^{-1} , νCO (aliph. Ester) = 1730 cm^{-1} , $\nu\text{C}=\text{N}$ = 1630 cm^{-1}].



II

III

Da diese Verbindungen mit Säuren stabile Salze liefern, können sie mit optisch aktiven Säuren in die optischen Antipoden gespalten werden. So konnten wir z. B. die beiden enantiomeren N-Benzaldehyd- α -methyldopa-methylester aus ihrem Racemat mit *d*-Weinsäure als Spaltmittel herstellen.



Durch Kristallisieren der Salze aus Aceton haben wir N-Benzaldehyd-D- α -methyldopa-methylester-*d*-tartarat erhalten ($[\alpha]_D^{20} = -56^\circ$, C = 2 in Wasser) bis aus Methanol N-Benzaldehyd-L- α -methyldopa-methylester-*d*-tartarat ($[\alpha]_D^{20} = +73^\circ$, C = 2 in Wasser) gewonnen wurde.

Aus letzterem Salz wurde N-Benzaldehyd-L-methyldopa-methylester in Freiheit gesetzt (Schmp. 173-174°C, $[\alpha]_D^{20} = +32^\circ$, C = 1 in Methanol; -48° , C = 2 in Dimethylformamid).

Die IR-Aufnahmen wurden mit einem Zeiss-UR-10 Apparat in Kaliumbromid-Pastillen aufgenommen.

Summary. By reacting dopa, α -methyl- and α -ethyldopa and the corresponding esters with aldehydes geminate amino-carbinols of the general formula I can be prepared. The acetylation of the adduct of α -methyldopa-methylester with acetaldehyde and benzaldehyde and the resolution of the latter compound with *d*-tartaric acid is described.

A. HAJÓS und P. SOHÁR

Institut für Arzneimittelforschung, Budapest (Ungarn), 8. Februar 1965.

Histochemische Untersuchungen zur Natur der Cytoplasma-Einschlüsse des Lungentumors der Maus

In induzierten wie spontanen Lungentumoren der Maus wurden elektronenmikroskopisch regelmässig charakteristische Cytoplasma-Einschlüsse gefunden, die nach Form, Grösse, Lage in der Tumorzelle und Häufigkeit weitgehend lichtmikroskopisch nachweisbaren PAS-positiven Cytoplasma-Einschlüssen entsprechen^{1,2}.

Zur näheren histochemischen Untersuchung dieser Einschlüsse wurden 6 bis 8 Wochen alte weibliche Mäuse des Stammes A/J Han³ innerhalb von 3 Tagen zweimal i. p. mit 1 mg Äthylurethan pro g Körpergewicht behandelt. Tötung durch Äther nach 3–4 Monaten. Die Lungen wurden nach CARNOY oder mit Formol fixiert und einige Tumoren nach Paraffineinbettung in Serien geschnitten. Von einem Tumor wurden nach Fixierung in Osmiumtetroxyd und Einbettung in Vestopal Serien von Halbdünnschnitten (1–2 μ) hergestellt. – An Paraffinschnitten wurden folgende Färbungen bzw. Reaktionen angewandt: PAS (HOTCHKISS⁴) mit MAYER's Hämalaun; BEST'sches Karmin⁵; PAS bzw. BEST'sches Karmin nach einstündiger Speichel-Einwirkung bei 20°C; PAS nach 6-stündiger α -Amylase-Einwirkung⁴; Alcianblau⁴; Astrablau⁴; Gallocyanin-Chromalaun⁶; Kresylviolett⁶; Toluidinblau⁴; Pyronin⁴ (Färbedauer 50 min); Kresylviolett bzw. Toluidinblau nach Ribonuclease-Einwirkung (s. u.); FEULGEN⁵; Berlinerblau⁵; TURNBULL-Blau⁵. – An den Vestopal-Halbdünnschnitten erwiesen sich folgende Verfahren als brauchbar: PAS (HOTCHKISS⁴, modifiziert: 70% Alkohol, 0,5% Perjodsäure 20 min, SCHIFF's Reagens 30 min, WEIGERT's Eisenhämatoxylin⁶ 30 min); Kresylviolett⁶; Kresylviolett nach Ribonuclease-Einwirkung; FEULGEN⁵. – Ribonuclease (N.B.C., Cleveland, Ohio) kam in der Konzentration 0,5 mg/ml *Aq. dest.*, bei Halbdünns-

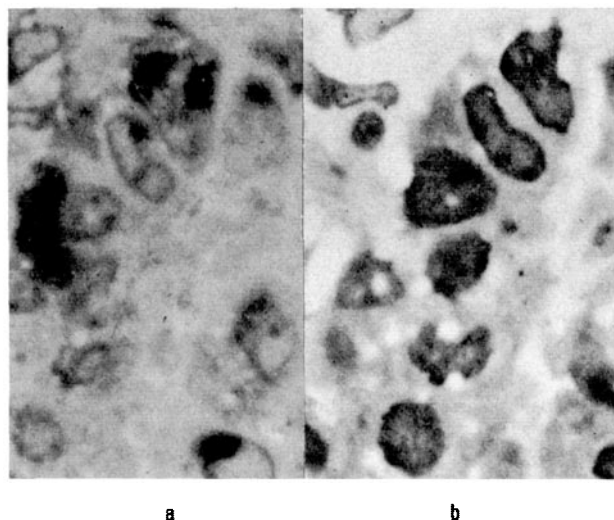


Fig. 1. Vestopal-Halbdünnschnitt des Lungentumors der Maus. Die Tumorzellen in Fig. 1a sind mit denen in Fig. 1b identisch. Kresylviolett-positive Cytoplasma-Einschlüsse (a) sind nach Ribonuclease-Behandlung und erneuter Anfärbung desselben Schnittes nicht mehr nachweisbar (b). $\times 1600$.

¹ P. KLÄRNER und R. GIESEKING, Z. Krebsforsch. 64, 7 (1960).

² P. KLÄRNER und R. GIESEKING, Frankfurt. Z. Path. 73, 138 (1963).

³ Zentralinstitut für Versuchstierzucht, Hannover.

⁴ A. G. E. PEARSE, *Histochemistry, Theoretical and Applied* (Little, Brown & Cie., Boston 1960).

⁵ B. ROMEIS, *Mikroskopische Technik* (Leibniz-Verlag, München 1948).

⁶ C. RITTER, H. S. DI STEFANO und A. FARAH, J. Histochem. Cytochem. 9, 97 (1961).