

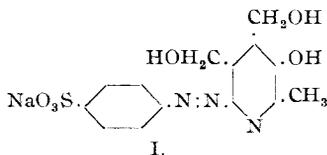
239. Richard Kuhn und Irmentraut Löw: Über eine spezifische Farbreaktion des Adermins.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizin. Forschung, Heidelberg, Institut für Chemie.]

(Eingegangen am 21. Juni 1939.)

Das Vitamin B₆ gibt mit dem Reagens von Folin-Denis¹⁾ eine tiefblaue Lösung. Wir haben uns bemüht, diese Reaktion zu einer quantitativen colorimetrischen Bestimmungsmethode auszuarbeiten. Bei genauer Einhaltung der im Versuchsteil angegebenen Bedingungen gelingt es in der Tat, Mengen von 0.02 bis 0.08 mg Adermin recht genau mit Hilfe des Stufenphotometers zu bestimmen. Man hat zu beachten, daß es sich um eine Zeitreaktion handelt. Ein erheblicher Nachteil des Verfahrens besteht darin, daß die blauen Lösungen leicht trübe werden oder gar weiße Niederschläge ausfallen lassen. β -Oxy-pyridin zeigt diese Erscheinung in der gleichen Weise wie Adermin, während man mit Phenol unter denselben Bedingungen stets ganz klare blaue Lösungen erhält. Wir haben gefunden, daß es günstig ist, die in der Vorschrift von Folin-Denis angegebene gesättigte Natriumcarbonatlösung im vorliegenden Fall durch eine 1-proz. Lösung von Lithiumhydroxyd zu ersetzen. Auf diese Weise sind die im Versuchsteil angegebenen Werte ermittelt worden. Mit gesättigter Lithiumcarbonatlösung an Stelle des Lithiumhydroxyds verläuft die Reaktion zu langsam.

Die bekannte Kupplungsreaktion mit diazotierter Sulfanilsäure ist für eine quantitative colorimetrische Bestimmung von Vitamin B₆ nicht geeignet. Während wir β -Oxy-pyridin auf diese Weise in Mengen von 0.02 bis 0.08 mg stufenphotometrisch recht genau bestimmen konnten (S. 1456), erwies sich der entsprechende orangefarbige Azokörper des Adermins (I) in verdünnten Lösungen als so unbeständig, daß eine quantitative Bestimmung praktisch unmöglich war. Die Frage, ob das Ausbleichen der Lösungen mit dem Zutritt von Luft bzw. Licht unter den üblichen Arbeitsbedingungen zusammenhängt, haben wir nicht geprüft. Die Unbeständigkeit des Azokörpers erinnert an die Erfahrungen von K. K. Koessler und M. T. Hanke²⁾ sowie von R. Kapeller-Adler³⁾ bei der Kupplung von Histidin mit diazotierter Sulfanilsäure. In Gegenwart von Formaldehyd — entsprechend dem Formaldehyd-Azo-Test⁴⁾ für Vitamin B₁ — gibt das Vitamin B₆ überhaupt keinen Azokörper.



Abgesehen von allen geschilderten technischen Schwierigkeiten sind die Blaufärbung mit dem Phenolreagens und die Orangefärbung mit dem Reagens von P. Ehrlich viel zu unspezifisch, um bei positivem Ausfall auf die Anwesenheit von Adermin bei Untersuchung biologischer Lösungen schließen zu dürfen. Beide Reaktionen werden ja nicht nur allgemein von Phenolen, sondern auch von verschiedenen Aminosäuren und andersartigen Zellbausteinen gegeben.

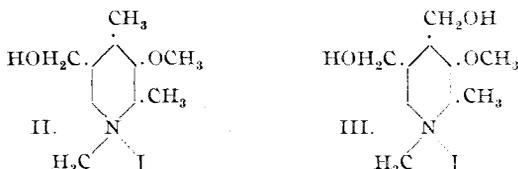
¹⁾ O. Folin u. W. Denis, *Journ. biol. Chem.* **12**, 239 [1912]; **22**, 305 [1915].

²⁾ *Journ. biol. Chem.* **39**, 497 [1919]. ³⁾ *Biochem. Ztschr.* **264**, 131 [1933].

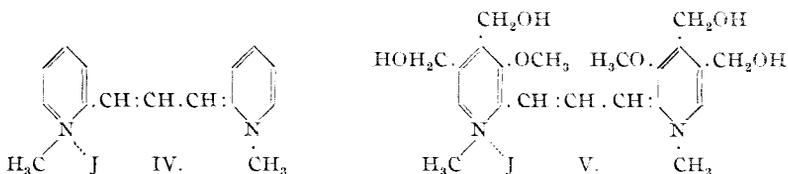
⁴⁾ H. Kinnersley u. R. Peters, *Biochem. Journ.* **28**, 667 [1934]; **29**, 2369 [1935]; **32**, 1516 [1938].

Für Nicotinsäure bzw. Nicotinsäure-amid sind im Laufe der letzten Jahre verschiedene colorimetrische Bestimmungsverfahren ausgearbeitet worden, die alle darauf fußen, daß es sich um ein Derivat des Pyridins handelt. Da auch das Vitamin B₆ ein Pyridinderivat ist, war es wichtig festzustellen, ob dieses dieselben Farbreaktionen gibt, ob mit anderen Worten bei der Bestimmung von Nicotinsäure-amid in tierischen und pflanzlichen Produkten ein Gehalt an Adermin zu hohe Werte vortäuschen kann. In dieser Hinsicht konnten wir die erfreuliche Feststellung machen, daß β -Oxy-pyridin und Adermin weder die E. Vongerichten-Reaktion mit 2,4-Dinitro-chlorbenzol⁵⁾ noch die W. J. Königsche Farbreaktion mit Bromcyan und Benzidin oder Anilin⁶⁾ geben, so daß die Bestimmung des Nicotinsäure-amids nach diesen Verfahren ohne Rücksicht auf etwa vorhandenes Adermin möglich ist.

Besondere Hoffnungen setzten wir auf die Erkenntnis, daß das Vitamin B₆ ein Derivat des α -Picolins ist. Denn es leitet sich von diesem bzw. seinen Halogenalkylaten eine Reihe von prachtvollen Cyaninfarbstoffen ab, und überdies scheinen andere α -Picolinderivate bisher weder im Tier- noch im Pflanzenreich aufgefunden worden zu sein. Unsere Erwartung fanden wir bestätigt. Es hat sich jedoch ergeben, daß 2,6-Dimethyl-4-oxy-pyridin, 4-Desoxy-adermin und Adermin für die Bildung von Cyaninfarbstoffen erst befähigt sind, wenn man die phenolische OH-Gruppe veräthert hat. Aus diesem Grunde hat man die auf Vitamin B₆ zu prüfende Substanz 1) durch Behandlung mit Diazomethan in den *O*-Methyläther überzuführen und 2) diesen durch Anlagerung von Jodmethyl, Dimethylsulfat oder *p*-Toluolsulfonsäure-methylester in eine quartäre Pyridiniumverbindung überzuführen. Die Jodmethylate des 4-Desoxy-adermin-methyläthers (II) und des Adermin-methyläthers (III) stellen schön krystallisierende Verbindungen dar, deren Gewinnung und Eigenschaften aus dem Versuchsteil zu ersehen sind.



Diese Verbindungen liefern bei kurzem Erhitzen mit Chloroform und 20-proz. wäßriger Kalilauge bei Gegenwart von Alkohol violette Farbstoffe der Carbo-pyridin-cyanin-Reihe. Nach allen Eigenschaften handelt es sich um Analoge des 1,1'-Dimethyl-2,2'-carbopyridin-cyanin-jodids (IV), das E. Rosenhauer und F. Barlet⁷⁾ aus α -Picolin-jodmethylat unter den auch von uns eingehaltenen Bedingungen erhalten haben.



⁵⁾ P. Karrer u. H. Keller, Helv. chim. Acta **21**, 463 [1938].

⁶⁾ A. Goris u. A. Larssonneau, Bull. Sciences pharmacol. **28**, 497 [1921]; M. Swaminathau, Nature (London) **141**, 830 [1938]; H. Kringstad u. Th. Naess, Naturwiss. **26**, 709 [1938]. ⁷⁾ B. **62**, 2724 [1929].

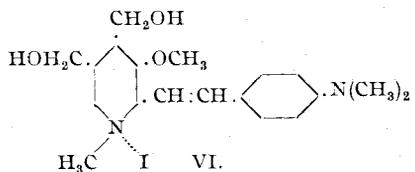
Für den aus 2.4-Dimethyl-3-methoxy-5-oxy-methyl-pyridin-jodmethylat gewonnenen Farbstoff läßt sich die Konstitution nicht eindeutig angeben, da sowohl die α - als auch die γ -ständigen Methylgruppen an der Kondensation beteiligt sein können. Dem Carbo-pyridin-cyanin aus Adermin-methyläther-jodmethylat ist die Formel V zuzusprechen. Die Bildung dieses Farbstoffes erscheint als spezifische Farbreaktion für das Vitamin B₆.

Am empfindlichsten und sichersten ist die Reaktion, wenn man nach einem von Hrn. H. Hartmann gemachten Vorschlag an Stelle der Natronlauge Natriumalkoholat verwendet. Eine Spur des Jodmethylats (Methosulfats, *p*-Toluolsulfomethylats) wird mit 2—3 Tropfen einer Lösung von 1 g Natrium in 20 ccm absol. Alkohol versetzt. Nach 10—20 Sek. gibt man zur gelben Lösung einige Tropfen Chloroform, wobei sofort schon in der Kälte Violettfärbung eintritt. Man kann auf diese Weise noch 0.025 mg Adermin-methyläther-jodmethylat nachweisen. Da sich das freie Vitamin präparativ mit einer Ausbeute von 30—40 % d. Th. in das Methyläther-jodmethylat verwandeln läßt, sollte es möglich sein, 0.08 mg zu erfassen. Bei Vorliegen kleiner Mengen hat man jedoch mit größeren Verlusten zu rechnen. Die Grenze der Nachweisbarkeit liegt, wie in zahlreichen Versuchen ermittelt wurde, bei etwa 0.1 mg Adermin-chlorhydrat.

Das Adermin-Violett (V) ist wie die anderen Farbstoffe dieser Reihe gegen verd. Säuren, die Entfärbung bewirken, sehr empfindlich. Gegen Alkalien ist es, wie schon aus den Darstellungsbedingungen hervorgeht, recht beständig. Die verd. Lösung in Chloroform fluoresciert lebhaft rot und zersetzt sich im Lichte nach kurzer Zeit. Aber auch im Dunkeln sind Lösungen des Adermin-Violetts nur wenig haltbar. Charakteristisch sind die schmalen Absorptionsbanden, deren Lage eine Unterscheidung von anderen Carbopyridincyaninen gestattet: 599 $m\mu$ und 555 $m\mu$ in alkoholhaltigem Chloroform, 592 $m\mu$ und 543 $m\mu$ in 20-proz. Kalilauge.

Das 4-Desoxy-adermin-Violett zeigt: 590 $m\mu$ in alkoholhaltigem Chloroform, 580 $m\mu$ in Methanol und 585 $m\mu$ in Wasser. Beim α -Picolin-Violett (IV) liegen die Banden bei: 568 und 531 $m\mu$ in alkoholhaltigem Chloroform, 558 und 521 $m\mu$ in Methanol, 552 $m\mu$ in Wasser.

Mit *p*-Dimethylamino-benzaldehyd kondensiert sich das Vitamin-B₆-methyläther-jodmethylat, wenn die aequimolare Mischung der Komponenten in Alkohol unter Zusatz von etwas Piperidin mehrere Stunden kocht, zu dem orangefarbigem Styrylfarbstoff VI, der eine breite Absorptionsbande um 470 $m\mu$ zeigt. Zur Charakterisierung ist dieses Derivat des Vitamins nicht sonderlich geeignet.



Im Hinblick auf die Wirkungsweise des Adermins in den Zellen und seine noch nicht näher bekannte Bindungsart in Aderminprotein haben wir das Jodmethylat des Methyläthers vergleichend mit Nicotinsäureamid-jodmethylat⁸⁾ auf sein Verhalten gegen Reduktionsmittel untersucht. Es ergab sich, daß das B₆-Derivat auf Zusatz von Natriumhydrosulfit unter reinem Stickstoff keine „gelbe Stufe“ gibt. Bei den von Hrn. W. Möhle photographisch gemessenen Absorptionsbanden im Ultraviolett ließ sich

⁸⁾ P. Karrer, G. Schwarzenbach, F. Benz u. U. Solmssen, Helv. chim. Acta 19, 811 [1936].

nach Zusatz von Natriumhydrosulfit keine Veränderung feststellen. Diese Versuche sind sowohl in 1-proz. Natriumbicarbonatlösung, in 1-proz. Soda-lösung wie auch in $n/_{10}$ -Natronlauge ausgeführt worden. Der Überschuß an Hydrosulfit wurde in jedem Falle vor Aufnahme des Spektrums durch kurzes Durchleiten von Sauerstoff zerstört.

Beschreibung der Versuche.

2,4-Dimethyl-3-methoxy-5-oxymethyl-pyridinium-jodmethylat.

1.2 g 2,4-Dimethyl-3-oxy-5-oxymethyl-pyridin-chlorhydrat (Schmp. 262⁰) wurden in 40 ccm absol. Methanol mit Diazomethan nach R. Kuhn und G. Wendt⁹⁾ methyliert. Den durch Destillation (150—180⁰ Luftbad, 10⁻³ mm) gereinigten Methyläther (0.58 g) haben wir mit 2—3 ccm Jodmethyl im Mikrobombenrohr 2 Stdn. auf 100⁰ erhitzt. Das Jodmethylat schied sich beim Erkalten in asbestähnlich faserförmigen Krystallen vom Schmp. 152⁰ ab. Ausb. 0.85 g. Nach dem Umfällen aus wenig absol. Äthylalkohol mit Benzol war der Schmp. unverändert. Das schwach gelbstichige Jodmethylat ist leicht löslich in Wasser und Alkohol, nahezu unlöslich in Äther, Hexan, Benzol, Aceton und Chloroform.

4.045 mg Sbst.: 5.730 mg CO₂, 1.980 mg H₂O. — 7.162 mg Sbst.: 0.274 ccm N₂ (27⁰, 758 mm).

C₁₀H₁₆O₂NJ (309.1). Ber. C 38.80, H 5.22, N 4.53. Gef. C 38.63, H 5.48, N 4.34.

2-Methyl-3-methoxy-4,5-bis-oxymethyl-pyridinium-jodmethylat.

0.1 g Adermin-methyläther⁹⁾ wurde mit 1 ccm Jodmethyl 2 Stdn. im Mikrobombenrohr auf 100⁰ erhitzt. Beim Erkalten schied sich das Adermin-methyläther-jodmethylat in seidenglänzenden schwach gelbstichigen Nadeln ab. Ausb. 0.16 g. Zur Analyse wurde aus ganz wenig absol. Alkohol umkrystallisiert. Im übrigen sind die Löslichkeitseigenschaften denjenigen der Desoxyverbindung sehr ähnlich. Der Schmp. liegt bei 125—126⁰.

4.010 mg Sbst.: 5.41 mg CO₂, 1.80 mg H₂O. — 2.962 mg Sbst.: 3.977 mg AgJ (Methylimid-Bestimmung).

C₁₀H₁₆O₃NJ (325.1). Ber. C 36.92, H 4.95. Gef. C 36.79, H 5.02.

Ber. CH₃ (Methoxyl + Methylimid) 9.23. Gef. CH₃ 8.59.

Bestimmung von β-Oxy-pyridin mit diazotierter Sulfanilsäure.

Reagenzien: Man löst 4.5 g Sulfanilsäure (2H₂O) in 45 ccm konz. Salzsäure und füllt mit Wasser zu 500 ccm auf. 25 g Natriumnitrit, p. a., in 500 ccm Wasser²⁾. 1.1-proz. Lösung von Natriumcarbonat in Wasser. Die Diazoniumsalzlösung wird jeden Tag frisch bereitet, indem man 1.5 ccm der Sulfanilsäure-Lösung unter Eiskühlung im Laufe von 10 Min. in kleinen Anteilen mit insgesamt 7.5 ccm der Nitritlösung versetzt und nach weiteren 5 Min. mit Wasser auf 50 ccm auffüllt. Vor Gebrauch soll diese Lösung mindestens 15 Min. gestanden haben.

Das β-Oxy-pyridin (4.177 mg) wurde in 50 ccm Wasser gelöst. Hiervon wurden 0.20—1.00 ccm in ein 10-ccm-Meßkölbchen gegeben, das mit 5 ccm der Sodalösung und 2 ccm der Diazoniumsalzlösung beschickt und durch schmelzendes Eis gekühlt war. Nach dem Auffüllen bis zur Marke mit Wasser ließ man etwa 1 Stde. bei etwa 20⁰ stehen. Dann wurde am Stufenphotometer

⁹⁾ B. 71, 1534 [1938].

in Küvetten von 2 cm Schichtdicke die Extinktion gemessen (Vergleichslösung: Wasser), Filter S 50.

	0.1 ccm = 8.35 γ β -Oxy-pyridin.						
ccm β -Oxy-pyridin	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.8	0.9
k	0.115	0.153	0.199	0.246	0.284	0.364	0.409

Die angeführten Einzelwerte liegen bei graphischer Auftragung auf einer Geraden.

Bestimmung von Adermin mit dem Phenolreagens.

Reagenzien: 100 g Natriumwolframat, 20 g Phosphormolybdänsäure, 50 ccm 85-proz. Phosphorsäure und 75 ccm Wasser werden 2 Std. unter Rückfluß gekocht und nach dem Abkühlen und Filtrieren auf 1000 ccm mit Wasser aufgefüllt¹⁾. Etwa 1-proz. Lösung von Lithiumhydroxyd, die man aus der bei 20^o gesättigten Lösung durch Verdünnen auf das 10-fache Volumen mit Wasser bereitet.

Adermin-chlorhydrat (5.117 mg) in 50 ccm Wasser. Hiervon wurden 0.3—0.9 ccm mit 1 ccm Phenolreagens und 3.5 ccm Lithiumhydroxyd versetzt und mit Wasser auf 10 ccm gebracht. Nach 60 Min. wurde am Stufenphotometer in 2 cm dicken Küvetten abgelesen. Filter S 75, Vergleichslösung Wasser.

0.1 ccm = 10.2 γ Adermin-chlorhydrat = 8.4 γ Vitaminbase.

0.3 ccm	k = 0.160	} Mittelwerte aus je 3 Versuchen, in denen die Lösungen klar geblieben waren.
0.5 ccm	k = 0.210	
0.7 ccm	k = 0.239	
0.9 ccm	k = 0.295	

Die gefundenen Mittelwerte lassen sich, wenn man sie auf Millimeterpapier aufträgt, durch eine Gerade verbinden.

Der Chemischen Fabrik E. Merck, Darmstadt, haben wir für die Überlassung von Präparaten, der Justus-Liebig-Gesellschaft für die Gewährung eines Stipendiums zu danken.

240. Alfredo Dansi und Alberto Vercellone: Biochemische Reduktion eines Derivates des 1,2-Benzanthracens.

[Aus d. Istituto „Giuliana Ronzoni“, Mailand.]

(Eingegangen am 19. Juni 1939.)

Biochemische Umwandlungen mittels gärender Hefe auf dem Gebiet der Steroide und im besonderen der Sexualhormone sind seit einiger Zeit bekannt und werden bereits in der Praxis angewandt. Beobachtungen dieser Art sind an unserem Institute von A. Vercellone und L. Mamoli¹⁾

¹⁾ Über die biochemischen Reduktionen s. C. Neuberg u. G. Gorr, „Phytochemische Reduktion“ in Oppenheimer-Pincussen „Methodik der Fermente“ 1929, S. 1212, Ausg. G. Thieme, Leipzig; C. Neuberg u. A. Vercellone, Biochem. Ztschr. **279**, 140 [1935]; A. Vercellone, Biochem. Ztschr. **279**, 237 [1935]; Vercellone u. Mamoli, Ztschr. physiol. Chem. **248**, 277 [1937]; B. **71**, 152 [1938]; Mamoli u. Vercellone, Ztschr. physiol. Chem. **248**, 93 [1937]; B. **70**, 470, 2079 [1937]; B. **71**, 154, 1686 [1938].