

Leitfähigkeitsmessung an einer 0.001 mol. Lösung in Nitrobenzol bei 25°: $\Lambda = 4.05 \text{ cm}^2 \cdot \text{Mol}^{-1} \cdot \text{Ohm}^{-1}$.

Magnetische Messung: $\chi_g = - (0.46 \pm 0.05) \cdot 10^{-6} \cdot \text{g}^{-1}$ ¹⁸⁾

$(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{PLi} \cdot \text{OC}(\text{C}_6\text{H}_5)_2$: In einem Schlenk-Gefäß löst man unter N_2 2.2 g $\text{LiP}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ in 60 ccm absol. Äther und gibt 10 g $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{CO}$ zu. Unter Erwärmung bildet sich sofort eine intensiv grüne Lösung, aus der sich nach einigen Minuten farblose Kristalle abscheiden. Sie werden unter Luft- und Feuchtigkeitsausschluß über eine G3-Fritte filtriert, zweimal mit je 20 ccm absol. Äther gewaschen und i. Vak. getrocknet. Die Molekülverbindung ist äußerst luft- und feuchtigkeitsempfindlich und löst sich wenig in THF und Äther. Ausb. 4.5 g (71% d. Th.).

$\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{OPLi}$ (278.2) Ber. P 11.13 Li 2.49 Gef. P 11.08, 10.86 Li 2.50, 2.55

Hydrolyse der Molekülverbindung: Hierzu werden 2.4 g in 100 ccm Äther suspendiert und mit 20 ccm Wasser zersetzt. Die äther. Schicht wird abgetrennt, der Äther abdestilliert und der Rückstand bis auf 100° erhitzt. Im Rückstand wird I als $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{C}=\text{N}-\text{NHC}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)_2$ vom Schmp. 236° identifiziert. Ausb. 3 g (95% d. Th.).

Das äther. Destillat wird mit 66-proz. Jodwasserstoffsäure versetzt. Nach Einengen der Lösung kristallisiert das $[(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{PH}_2]\text{J}$ aus ¹⁹⁾.

¹⁸⁾ Herrn Dr. PERTHEL vom Institut für magnetische Werkstoffe Jena der DAW zu Berlin danken wir für die Durchführung der magnetischen Messung.

¹⁹⁾ K. ISSLEIB und A. TZSCHACH, Chem. Ber. 92, 704 [1959].

KURT WALLENFELS und MANFRED GELLRICH

Über den Mechanismus der Wasserstoffübertragung
mit Pyridinnucleotiden, XVII¹⁾

Modelluntersuchungen zur chemischen Natur des „Aktivierten Wasserstoffs“

Aus dem Chemischen Laboratorium der Universität Freiburg i. Br.

(Eingegangen am 17. Februar 1959)

Durch Einwirkung von Elektronendonatoren auf DPN^{\ominus} -Modelle²⁾ werden dime-re Reduktionsprodukte erhalten. Diese unterscheiden sich in ihrem Reduktionsvermögen gegenüber Substraten, die als Wasserstoff- bzw. Elektronenacceptoren charakterisiert sind, von den bisher bekannten Dihydropyridinen. Die Möglichkeit der reduzierenden Dimerisierung des DPN in der lebenden Zelle sowie die Bedeutung einer solchen Reaktion für den Mechanismus der biologischen Oxydation werden diskutiert.

Im Jahre 1912 hat H. WIELAND in einer berühmten Arbeit³⁾ seine Theorie der chemischen Oxydation entwickelt und durch Modelluntersuchungen begründet. Der

¹⁾ XVI. Mitteil.: K. WALLENFELS und H. SCHÜLY, Liebigs Ann. Chem. 621, 215 [1959].

²⁾ Abkürzungen: DPN = Diphospho-pyridin-nucleotid; (DPN^{\ominus}) = oxydierte Form, DPNH = reduzierte Form; Py^{\oplus} = quartäres Pyridiniumkation; PyH = Dihydropyridin; Py-Py = Tetrahydro-bipyridyl-Derivat; MB^{\oplus} = Methylenblau-Kation; MBH = Lukeomethylenblau. ³⁾ Ber. dtsch. chem. Ges. 45, 484, 2606 [1912].

Grundgedanke der Theorie, die „Aktivierung des Wasserstoffs“, ist bis heute eine Basis für die Diskussion des Mechanismus auch der biologischen Oxydation geblieben. Die durch die Arbeiten von HABER angeregten Entdeckungen von MICHAELIS prägten dann das Bild, welches sich der Biochemiker vom chemischen Mechanismus der Oxydo-Reduktion in der Zeit zwischen 1935 und 1954 machte, in dem alle diese Prozesse im Prinzip als Ein-Elektronenübergänge unter intermediärer Bildung mehr oder weniger stabiler semichinoider Zwischenstufen erklärt wurden⁴⁾. Der Standpunkt erfuhr eine starke Erschütterung durch die Entdeckung der Tatsache, daß bei der enzymatischen Reduktion von Pyridinnucleotiden der Wasserstoff direkt — ohne mit den Protonen des Mediums ausgetauscht zu werden! — vom Substrat auf die Pyridinverbindung übergeht⁵⁾. Untersuchungen bezüglich des Mechanismus dieser Reaktionen an reinen enzymatischen Systemen^{6,7)} haben gezeigt, daß die Gleichgewichtsreaktionen zwischen reduziertem Substrat (z. B. C_2H_5OH , Glutaminsäure u. a.) und Pyridiniumkation (DPN^{\oplus} , TPN^{\oplus}) sich am besten durch einen polaren Mechanismus, d. h. durch eine Übertragung von Hydridionen erklären lassen. Die schwerwiegendsten Argumente für diesen Mechanismus wurden durch die kinetischen Untersuchungen an zahlreichen Modellsystemen, bestehend aus Dihydropyridinen verschiedener Konstitution und Chinonen auf der einen Seite und Gleichgewichtsmessungen an Systemen aus Pyridiniumsalzen und CN^{\ominus} -Anionen auf der anderen Seite, beigebracht^{8,9)}. Während, wie diese Versuche gezeigt haben, der Übergang des Wasserstoffs vom H^{\ominus} abgebenden Dihydropyridin auf das aufnehmende Substrat einen sehr geringen Betrag an Aktivierungsenergie erfordert (3–4 Kcal/Mol), ist, wie auch die polarographische Untersuchung der Reduktion von Pyridiniumsalzen zeigt¹⁰⁾, die Bildung eines Dihydropyridyl-Radikals energetisch wenig begünstigt.

Der Wasserstoff ist in der Form der Dihydropyridine also nur in der Weise aktiviert, daß diese als H-Donatoren für geeignete Acceptoren dienen können. Wie D. MAUZERALL und F. H. WESTHEIMER¹¹⁾ zeigten, können als solche z. B. die Kationen der Triphenylmethanfarbstoffe dienen, die wiederum durch direkte H-Übertragung zu den sauerstoffstabilen Leukoverbindungen hydriert werden. Kürzlich ist es auch gelungen, eine Carbonylverbindung, die Brenztraubensäure, durch direkte Wasserstoffübertragung von einem Dihydropyridin zu Milchsäure zu reduzieren¹²⁾. 1,4-Dihydro-pyridine wie $DPNH$ sind dagegen nicht befähigt, wie wir an verschiedenen Beispielen festgestellt haben, Farbstoffe vom Typ der Viologene (1,1'-Dialkyl-4,4'-

4) L. MICHAELIS in „The Enzymes“, Academic Press Inc., Publ. New York 1951 Bd. II, S. 1.

5) F. H. WESTHEIMER und B. VENNESLAND in „Symposium on the Mechanism of Enzyme Action“ (Herausgeber: W. D. McELROY und B. GLASS), John Hopkins Press, Baltimore 1954, S. 321, 357.

6) K. WALLENFELS und H. SUND, *Biochem. Z.* **329**, 59 [1957].

7) H. R. MAHLER und J. DOUGLAS, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 1159 [1957].

8) K. WALLENFELS und M. GELLRICH, XI. Mitteil. dieser Reihe, *Liebigs Ann. Chem.* **621**, 149 [1959]; M. GELLRICH, *Dissertat. Univ. Freiburg i. Br.* 1958.

9) K. WALLENFELS und H. DIEKMANN, XII. Mitteil. dieser Reihe, *Liebigs Ann. Chem.* **621**, 166; H. DIEKMANN, *Diplomarb. Univ. Freiburg i. Br.* 1958.

10) B. KE, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **20**, 547 [1956].

11) *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 2261 [1957].

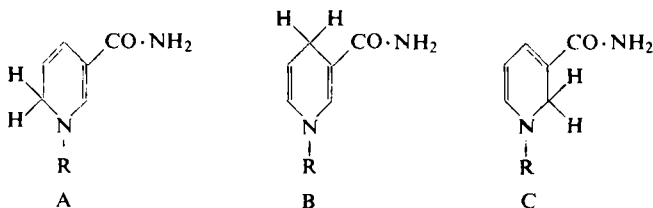
12) R. ABELES und F. H. WESTHEIMER, *J. Amer. chem. Soc.* **80**, 5459 [1958].

bipyridyliumsalze) zu reduzieren. Im ursprünglichen Sinne Wielands stellt also das Dihydropyridin keinen „Aktivierten Wasserstoff“ dar, da in der Atmungskette zum Sauerstoff ein Elektronentransport über die metallhaltigen gelben Enzyme und Cytochrome erfolgt.

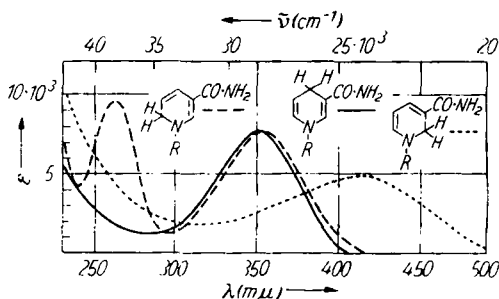
Im folgenden sind die Eigenschaften aller aus DPN-Modellen bisher herstellbaren Reduktionsprodukte einander gegenübergestellt.

1. DIE DREI TYPEN VON DIHYDROPYRIDINEN

Wie früher gezeigt werden konnte, führt die Reduktion von DPN[⊕] und einer großen Zahl von DPN[⊕]-Modellen mit Na₂S₂O₄ fast ausnahmslos zu 1.4-Dihydropyridinen, während die Reduktion mit NaBH₄ mehrere Reduktionsprodukte liefert, von welchen bei Derivaten des Nicotinamids die 1.6-Dihydro-pyridin-Verbindung überwiegt und in den meisten Fällen in reiner Form isoliert werden konnte^{13,14}. Ein Reduktionsprodukt, das sich von den genannten unterscheidet, dem daher 1.2-Dihydro-pyridin-Struktur zukommen muß, konnte erst in einem einzigen Fall (1-[2.6-Dichlorbenzyl]-4.6-dimethyl-1.2-dihydro-nicotinsäureamid) kristallin erhalten werden¹⁾. Die wichtigste Eigenschaft, in welcher sich die drei Typen von Dihydropyridinen A, B und C



klar unterscheiden, ist das Absorptionsspektrum, welches für die drei Verbindungstypen in Abbild. 1 dargestellt ist.



Abbild. 1. UV-Absorption der Dihydronicotinsäureamide (R = 2.6-Dichlor-benzyl). Das Spektrum der 1.2-Dihydro-Verbindung wurde aus der Differenz des Rohproduktes und der reinen 1.6-Dihydro-Verbindung errechnet.

¹³⁾ K. WALLENFELS und H. SCHÜLY, *Angew. Chem.* **67**, 617 [1955]; **69**, 505 [1957].

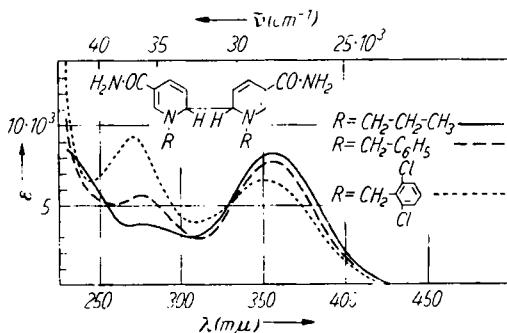
¹⁴⁾ K. WALLENFELS und H. SCHÜLY, IX. Mitteil. dieser Reihe, *Liebigs Ann. Chem.* **621**, 106 [1959].

2. DIMERE REDUKTIONSPRODUKTE QUARTÄRER PYRIDINIUMSALZE

Zu einem von den genannten drei Typen von Dihydropyridinen prinzipiell verschiedenen Reduktionsprodukt gelangt man durch Behandlung von Pyridiniumsalzen mit $\text{Cr}^{2\oplus}$, Magnesiumpulver oder verkupferstem Zinkstaub. Die Bedingungen sind im Versuchsteil im einzelnen beschrieben.

Am bequemsten ist das Verfahren der Zn/Cu-Reduktion, welches auch die besten Ausbeuten liefert. Aus der alkoholischen Lösung läßt sich das Reduktionsprodukt nach dem Erkalten in kristalliner Form gewinnen.

Diese neuen Reduktionsprodukte entsprechen zwar nach der Lage der Absorptionsbanden den Verbindungen der Struktur A, weisen jedoch eine wesentlich geringere Extinktion der beiden charakteristischen Maxima auf (Abbild. 2).



Abbild. 2. UV-Absorption der dimeren Reduktionsprodukte von DPN[⊖]-Modellen (Methanol)

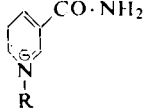

Beim Ansäuern mit verdünnter Salzsäure verschwinden die beiden Banden, und es erscheint ein neues Maximum bei 290–300 mμ. Die Lösungen der neuen Reduktionsprodukte zeigen keine Fluoreszenz. Darüberhinaus unterscheidet die quantitative Oxydation mit verschiedenen Oxydationsmitteln (J_2 , $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, Methyleneblau u. a.) diese Verbindungen, die bisher mit den Resten $\text{R} = -\text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_3$, $-\text{CH}_2 \cdot \text{C}_6\text{H}_5$ und $-\text{CH}_2 \cdot \text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_2$ erhalten wurden, klar von den Dihydropyridinen A, B und C, indem die neuen Reduktionsprodukte nur *ein* Oxydationsäquiv. pro Pyridinring verbrauchen. Als Oxydationsprodukt isolierte man in allen Fällen das monomere Pyridiniumsalz. Mol.-Gewichtsbestimmungen führten nicht zu eindeutigen Ergebnissen, da sich die sehr schwer löslichen Verbindungen unter allen bisher untersuchten Bedingungen zersetzten, doch lagen die gefundenen Werte in den meisten Fällen über denjenigen der Dihydropyridine.

Die dimere Struktur der neuen Reduktionsprodukte konnte aber auf folgendem Wege eindeutig festgestellt werden: Die katalytische Hydrierung mit Raney-Nickel als Katalysator führte im bisher am besten untersuchten Fall ($\text{R} = -\text{CH}_2 \cdot \text{C}_6\text{H}_5$) zu einer Verbindung der Hexahydrostufe, welche in farblosen Nadeln vom Schmp. 203 bis 205° kristallisiert. Nach Elementaranalyse und Molekulargewichtsbestimmung handelt es sich um das erwartete Bipiperidylderivat. Nach der gleichen Methode wurde durch Reduktion von 1-Benzyl-1.4-dihydro-nicotinsäureamid (Formel B, $\text{R} = -\text{CH}_2 \cdot \text{C}_6\text{H}_5$) ein Produkt vom Schmp. 126–127° erhalten, dem auf Grund der Molekulargewichts-

bestimmung die Struktur des monomeren 1-Benzyl-piperidin-carbonsäure-(3)-amides zukommt *).

Die Eigenschaften der neuen, durch Einwirkung von Elektronendonatoren erhaltenen Reduktionsprodukte sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Tab. 1. Dimere Reduktionsprodukte aus DPN[⊖]-Modellen

DPN [⊖] -Modell		Reduktionsprodukt			
	Zers.-P.	UV-Absorption in Methanol		J-Verbrauch pro Mol. Dimeres	
		λ_{\max} (m μ)	log ϵ		
R = CH ₂ ·CH ₂ ·CH ₃	188 - 196 ^{*)}	357 276	3.92 3.58	1.95	
R = CH ₂ ·C ₆ H ₅	191 - 193	355 275	3.58 3.45	2.04	
R = CH ₂ · 	179 - 182	350 272	3.51 3.66	2.04	

*) Bad auf 150° vorgeheizt

Die genannten Eigenschaften der Verbindungen sprechen dafür, daß es sich um neue Vertreter der von E. WEITZ¹⁵⁾ untersuchten Tetrahydro-bipyridyl-Verbindungen handelt, wobei wir auf Grund des zweibandigen Absorptionsspektrums eher eine 6,6'-Verknüpfung der beiden Pyridinringe für wahrscheinlich halten. Auf Grund der wenigen bisher veröffentlichten Daten bezüglich der Eigenschaften und Konstitution der Reduktionsprodukte, welche durch Bestrahlen von alkoholischen Lösungen von DPN[⊖]^{16,17)} und anderen Pyridiniumsalzen^{18,19)} mit energiereichen Strahlen gebildet werden, erscheint uns wahrscheinlich, daß auf diese Weise gleichartige Produkte entstehen, wie wir sie nun präparativ durch Reduktion mit Cr²⁺ oder mit dem Cu/Zn-Paar gewonnen haben. Von Y. PAISS und G. STEIN²⁰⁾ wurde kürzlich ein durch Elektrolyse erhaltenes dimeres Reduktionsprodukt des 1-Propyl-nicotinsäureamidjodids beschrieben, das mit unserer entsprechenden Verbindung große Ähnlichkeit aufweist. Es zeigt aber nur eine Absorptionsbande bei 355 m μ und wird von den Autoren als Bipyridyl-(4,4')-Derivat formuliert.

REDOXYDATION DER REDUZIERTEN PYRIDINVERBINDUNGEN

Das Reduktionsvermögen der dimeren Verbindungen ist von besonderem Interesse, wenn man es mit dem der Dihydropyridine vergleicht (Tab. 2). Die großen Unterschiede je nach Substrat, welches als Reaktionspartner dient, müssen u. E. auf prinzipiellen Verschiedenheiten im Mechanismus der Oxydo-Reduktion beruhen. Das

*) Dieser Absatz wurde b. d. Korr. (eingeg. S. 5. 59) eingefügt; ebenso der entspr. Abschnitt im Versuchsteil (S. 1415).

¹⁵⁾ Angew. Chem. **66**, 658 [1954]. ¹⁶⁾ A. J. SWALLOW, Biochem. J. **61**, 197 [1955].

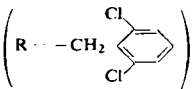
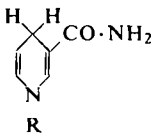
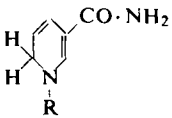
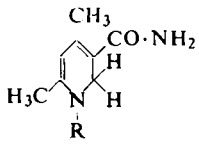
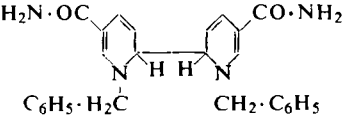
¹⁷⁾ G. STEIN und A. J. SWALLOW, J. chem. Soc. [London] **1958**, 306.

¹⁸⁾ G. STEIN und G. STIASSNY, Nature [London] **176**, 734 [1955].

¹⁹⁾ G. STEIN, J. Chim. physique **52**, 634 [1955]. ²⁰⁾ J. chem. Soc. [London] **1958**, 2905.

DPNH-Modell mit 1,4-Dihydro-pyridin-Struktur reduziert 2,6-Dichlorphenol-indophenol (Hydrid- oder Elektronenacceptor) mit mäßiger Geschwindigkeit. Nach der kürzlich beschriebenen Methode⁸⁾ konnten wir bei pH 7 und 25° eine Geschwindigkeitskonstante von $k_2 = 220$ ($l \cdot Mol^{-1} \cdot min^{-1}$) bestimmen. Unter den gleichen Bedingungen reduziert das dimere Reduktionsprodukt das gleiche Substrat mit $k_2 = 20000$. Viologen (Elektronenacceptor) in siedendem Äthanol wird vom 1,4-Dihydro-pyridin überhaupt nicht verändert, während es durch das dimere Reduktionsprodukt schnell reduziert wird. Gegenüber Malachitgrün (Hydridacceptor) verhalten sich die beiden Verbindungen aber gerade umgekehrt: Das 1,4-Dihydro-pyridin hydriert es rasch zur Leukoverbindung, während das Tetrahydro-bipyridyl-Derivat nicht verändert wird. Die beiden *ortho*-Dihydro-pyridine sind nicht so eindeutig klassifizierbar, sie nehmen in ihrem Reduktionsvermögen für die drei genannten Wasserstoff- bzw. Elektronenacceptoren eine Mittelstellung ein.

Tab. 2. Reoxydation von reduzierten Pyridinverbindungen

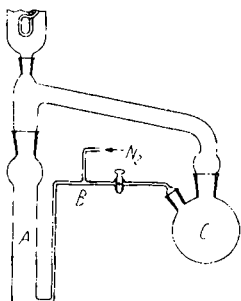
Substanz 	2,6-Dichlorphenol-indophenol k_2 ($l \cdot Mol^{-1} \cdot min^{-1}$) (pH 7, 25°)	Oxydationsmittel Malachitgrün (Äthanol, 25°)	Viologen (Äthanol, 78°)
	220	schnell	keine Einwirkung
	190	sehr langsam	sehr langsam
	„rasch“	sehr langsam	langsam
	20000	keine Einwirkung	schnell

Für die präparativen Reoxydationsversuche wurde Methylenblau benutzt, das gleichzeitig ein geeignetes Anion für das gebildete Pyridiniumsalz liefert. Dadurch erübrigt sich die Anwesenheit von Puffersalzen, und die Aufarbeitung wird erleichtert. Bei den Dihydropyridinen verwendeten wir das Farbstoffchlorid, das nach $PyH + MB^{\oplus}Cl^{\ominus} \longrightarrow Py^{\oplus}Cl^{\ominus} + MBH$ reagiert; im Falle der dimeren Verbindungen benutzen wir das Zinkchlorid-Doppelsalz:



Wir bedienen uns der in Abbild. 3 dargestellten Apparatur.

Als Lösungsmittel der monomeren oder dimeren Dihydropyridine verwendeten wir Methylchlorid, welches im Rohr A unter eine wäßr. Lösung von Methylenblau geschichtet wurde. Durchleiten von reinstem Stickstoff bei geschlossenem Hahn und Rühren mit einem Magnetrührer sorgten für die Durchmischung mit der wäßr. Phase. An der Grenzschicht findet der Redoxvorgang statt, wobei der wasserlösliche Farbstoff in die methylenchloridlösliche Leukoverbindung und das Dihydropyridinderivat in das wasserlösliche Oxydationsprodukt übergeführt wurden. Nach beendeter Reaktion wurde das im Kolben C vorgelegte Methylchlorid zum Sieden erhitzt und über den Kühler in das Extraktionsrohr A gebracht. Das mit dem Leukomethylenblau beladene Methylchlorid floß über B nach C zurück. Ein ständiger Stickstoffstrom verhinderte die Reoxydation des gebildeten Leukofarbstoffs. Nach voll-



Abbild. 3. Apparatur zur Oxydation mit Methylenblau

ständiger Extraktion wurde durch Verdampfen des Wassers als Oxydationsprodukt monomeres Pyridiniumsalz in nahezu quantitativer Ausbeute gewonnen.

Die quantitative Reoxydation durch Methylenblau benötigt bei den verschiedenen untersuchten Produkten sehr unterschiedliche Zeiten. Während sie bei den Tetrahydro-bipyridylen trotz ihrer Schwerlöslichkeit in einigen Stunden beendet war, mußte im gleichen Ansatz die Behandlung der monomeren Dihydropyridine mehrere Tage fortgeführt werden.

ZUR CHEMISCHEN NATUR DES „AKTIVIERTEN WASSERSTOFFS“ DER LEBENDEN ZELLEN

Die vielfältigen Untersuchungen über den Mechanismus der biologischen Oxydation haben gezeigt, daß der aktivierte Wasserstoff in seiner Reaktivität bei echten H-Übertragungs-Reaktionen mit den 1.4-Dihydro-pyridinen, die uns als Modelle dienen, völlig übereinstimmt. Demgegenüber zeigt die Untersuchung der dimeren Reduktionsprodukte, daß hier eine grundsätzlich andersartige Aktivierung vorliegt, die derjenigen entspricht, wie man sie für ein Zwischenprodukt erwarten kann, welches ein Verbindungsglied zum Elektronentransportsystem der lebenden Zellen bildet. Man hat bisher angenommen, daß dieses in Form der reduzierten Flavinnucleotide vorliege, die durch Wasserstoffübertragung entstehen und durch Elektronenübertragung reoxydiert werden können²¹⁾. Unsere Modellversuche sollen die Aufmerksamkeit auf die Möglichkeit lenken, daß Pyridinnucleotide selbst bereits die duale Reaktivität aufweisen können.

Es ist auffallend, daß die meisten der bisher isolierten und untersuchten DPN-abhängigen Enzyme zwei oder mehr Bindungsstellen für Pyridinnucleotide aufweisen²²⁾. Die

²¹⁾ S. J. LEACH, *Advances in Enzymol.* **15**, 1 [1954].

²²⁾ S. F. VELICK, *The Mechanism of Enzyme Action*, John Hopkins Press, Baltimore 1954, S. 491; Y. TAKENAKA und G. W. SCHWERT, *J. biol. Chemistry* **223**, 157 [1956]; H. THEORELL und R. BONNICHSEN, *Acta chem. scand.* **5**, 1105 [1951]; H. THEORELL, *Proc. IVth Intern. Cong. Biochemistry Vienna 1958*, im Druck; G. PFLEIDERER, D. JERCHEL und T. WIELAND, *Biochem. Z.* **328**, 187 [1956]; J. B. FOX und W. B. DANDLIKEP, *J. biol. Chemistry* **221**, 1005 [1956]; J. B. NEILANDS, *J. biol. Chemistry* **208**, 225 [1954].

Dimerisation der monomeren Pyridinverbindungen zu Bipyridylderivaten kann daher bei entsprechender Anordnung der Coenzymmolekeln an der Proteinoberfläche besonders begünstigt sein. Die Bildung der Dimeren könnte entweder durch Metalle niedriger Wertigkeitsstufe (z. B. $\text{Mo}^{3\oplus}$ oder $\text{Mo}^{4\oplus}$), wie sie als Bestandteile von gelben Fermenten vorkommen, entsprechend unserer Modellreaktion mit $\text{Cr}^{2\oplus}$ reduktiv erfolgen oder durch eine radikalische Oxydation von DPNH oder TPNH oder auch durch Konproportionierung von Dihydropyridin mit Pyridiniumsalz. Das Tetrahydro-bipyridyl-Derivat geht dann lediglich durch Abgabe von zwei Elektronen an einen geeigneten Acceptor wieder in zwei Moll. Pyridiniumsalz über.

Wir danken der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT für eine Sachbeihilfe im Rahmen des Schwerpunktprogramms Biochemie, der RESEARCH CORPORATION NEW YORK und dem DEUTSCHEN WISSENSCHAFTLICHEN KOMITEE (Prof. Dr. C. SCHÖPF) sowie dem FONDS DER CHEMISCHEN INDUSTRIE für finanzielle Unterstützung. Den Firmen FARBERWERKE HOECHST AG und DEUTSCHE HOFFMANN-LA ROCHE AG danken wir für die kostenlose Lieferung von Chemikalien.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Die jodometrische Titration wurde bereits früher beschrieben²³⁾.

Dimerisierende Reduktion von DPN[⊕]-Modellen

Reduktion von 1-Benzyl-3-aminofornyl-pyridiniumchlorid

a) *Mit Cr^{2⊕}-Ionen*: In einem 1-l-Dreihalskolben, der mit Rührer und Gaseinleitungsrohr versehen ist, werden 5 g (0.02 Mol) Pyridiniumsalz in 200 ccm Wasser gelöst und durch Einleiten von Stickstoff sauerstofffrei gemacht. Gleichzeitig werden in einer Spritzflasche²⁴⁾, auf die ein Tropftrichter aufgesetzt ist, 12 g (0.045 Mol) Chromtrichlorid-hexahydrat mit Zink und 24 ccm halbkonz. Salzsäure reduziert und anschließend mit 100 ccm konz. Ammoniak versetzt, das in dem Tropftrichter mit Stickstoff durchgespült worden ist. Die nahezu klare Reduktionslösung drückt man mit Stickstoff in den Dreihalskolben, dessen Inhalt kräftig gerührt wird. Es scheidet sich sofort ein grünlicher Niederschlag ab, der nach 30 Min. abgesaugt, mit Wasser gewaschen und noch feucht mit heißem Methanol extrahiert wird. Aus dem unter vermindertem Druck stark eingeengten Extrakt scheiden sich gelbliche Nadeln ab, die aus Äthanol umkristallisiert werden. Ausb. 2.25 g (5.8 % d. Th.). Die Verbindung ist in den gebräuchlichen Lösungsmitteln schwer löslich. Die Mutterlauge des methanol. Extraktes hinterläßt nach Verdampfen des Lösungsmittels einen gelben, glasigen Rückstand, der in Methanol äußerst leicht, in Benzol, Äther und Wasser schwer löslich ist. Die nicht-kristallisierende Substanz wirkt ebenfalls stark reduzierend und zeigt ein zweibandiges Absorptionsspektrum mit Maxima bei 270 m μ und 355 m μ . Die Extinktion der kürzerwelligen Bande ist relativ größer als bei der krist. Verbindung. Die Reduktion läßt sich mit geringerer und wechselnder Ausbeute auch mit festem Chrom(II)-acetat oder mit Dihydrazin-chrom(II)-chlorid²⁵⁾ durchführen.

b) *Mit Magnesiumpulver*²⁶⁾: 40 g (0.16 Mol) Pyridiniumsalz werden, in 800 ccm Wasser gelöst, mit 70 g Ammoniumchlorid und 20–30 ccm konz. Ammoniak versetzt. Unter

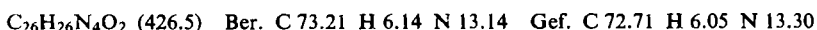
²³⁾ K. WALLENFELS und M. GELLRICH, X. Mitteil. dieser Reihe, Liebigs Ann. Chem. **621**, 137 [1959].

²⁴⁾ G. BRAUER, Handbuch der präparat. anorg. Chemie, F. Enke, Stuttgart 1954, S. 1022.

²⁵⁾ W. TRAUBE und W. PASSARGE, Ber. dtsh. chem. Ges. **46**, 1505 [1913].

Rühren wird das Magnesium in Portionen von 6–8 g hinzugefügt. Die Lösung erwärmt sich dabei auf 40–50°, und ein gelbbraunes Öl scheidet sich ab, das beim Abkühlen erstarrt. Innerhalb von 5 Stdn. werden 40 g Magnesium eingetragen, wobei die Lösung stark ammoniakalisch gehalten wird. Das feste Reaktionsprodukt wird zerkleinert, mit Methanol gewaschen und aus Äthanol umkristallisiert. Etwas Magnesiumoxyd bleibt ungelöst. Ausb. 7 g (20% d. Th.).

c) *Mit verkupfertem Zinkstaub*: 12 g Zinkstaub in 20 ccm Wasser werden langsam unter Rühren (Magnetrührer) mit einer Lösung von 4 g Kupfersulfat in 40 ccm Wasser versetzt, wobei die helle Farbe des Zinkstaubs völlig verschwindet. Man fügt 20 ccm konz. Ammoniak und 100 ccm Methanol hinzu und gießt dann unter lebhaftem Rühren eine Lösung von 10 g (0.04 Mol) Pyridiniumsalz in 40 ccm Wasser ein. Die Mischung färbt sich sofort gelb, es scheidet sich ein gelbes Kristallpulver ab. Nach 20 Min. langem Rühren wird abgesaugt und der Niederschlag viermal mit je 40 ccm heißem Äthanol unter Stickstoff extrahiert. Der Extrakt wird unter vermindertem Druck bei 40–50° zur beginnenden Kristallabscheidung eingengt, dann auf –15° gekühlt. Nach einigen Stunden haben sich 1.5 g gelbe Nadeln abgeschieden. Aus dem Filtrat vom Zinkstaub wird das Methanol i. Vak. abgesaugt, das Wasser von dem harzigen Niederschlag abgegossen und der Rückstand in wenig heißem Methanol aufgenommen. Dabei bleibt neben Zinkoxyd ein hellgelbes Kristallpulver ungelöst, das aus Äthanol wie oben umkristallisiert wird (0.7 g). Gesamtausb. 26% d. Th.



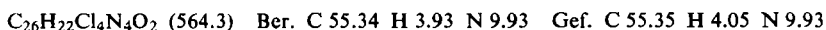
Jodometrische Titration: 2.1 mg verbrauchen 0.50 ccm 0.02 *n* J-Lösung, entspr. 2.04 Äquivv. J für Mol.-Gew. 426 (ber. 0.49 ccm).

Mol.-Gew.: Kryoskop. in Campher 307, 277, 307; in Tetrahydro- α -dicyclopentadienon-(3) 285; ebullioskop.²⁶⁾ in Pyridin 390; in Äthanol 380.

Bei allen diesen Bestimmungen sank der Wert bei längerer Versuchsdauer infolge thermischer Zersetzung auf 220 bis 230 ab, wobei sich die Lösung braun färbte. Die Messwerte wurden daher zu niedrig gefunden.

Kryoskop. in Phenol 200, 204.

1-[2,6-Dichlor-benzyl]-3-aminoformyl-pyridiniumbromid: Nach vorstehender Methode a) wurden aus 3.6 g (0.01 Mol) Pyridiniumsalz 0.23 g (8.2% d. Th.) gelbliche Nadeln erhalten, die schwerer löslich sind als die Benzylverbindung. Umkristallisation aus Nitromethan. Methode b) lieferte aus 10 g Pyridiniumsalz 0.7 g (9% d. Th.).



Jodometrische Titration: 6.9 mg verbrauchen 1.24 ccm 0.02 *n* J-Lösung, entspr. 2.04 Äquivv. J für Mol.-Gew. 564 (ber. 1.22 ccm).

1-Propyl-3-aminoformyl-pyridiniumbromid: Nach Methode c) mit 9 g Zinkstaub in 20 ccm Wasser, 3 g Kupfersulfat in 30 ccm Wasser, 20 ccm konz. Ammoniak, 7.5 g (0.03 Mol) Pyridiniumsalz in 100 ccm Wasser. Es wird 15 Min. gerührt und der Niederschlag viermal mit 25-ccm-Portionen heißem Äthanol extrahiert. Der Extrakt wird bis zur beginnenden Kristallisation eingengt und mit drei Vol.-Tln. Wasser versetzt. Ausb. 0.7 g (14% d. Th.) gelbe Nadeln, die aus 70-proz. Methanol umkristallisiert werden.



Jodometrische Titration: 10.9 mg verbrauchen 3.21 ccm 0.02 *n* J-Lösung, entspr. 1.95 Äquivv. J für Mol.-Gew. 330 (ber. 3.30 ccm).

²⁶⁾ Diese Untersuchungen wurden von Herrn Dipl. Chem. W. KUMMER durchgeführt.

*Katalytische Hydrierung der Monomeren und Dimeren**

Dimeres Reduktionsprodukt aus 1-Benzyl-3-aminoformyl-pyridiniumchlorid: 1.5 g (3.5 mMol) Dimeres werden in 100 ccm Äthanol suspendiert, mit 2.5 g Raney-Nickel versetzt und bei Raumtemperatur unter Normaldruck hydriert. Innerhalb von 12 Stdn. wird die berechnete Menge Wasserstoff (350 ccm) aufgenommen. Die Kristalle gehen dabei vollständig in Lösung. Man filtriert den Katalysator ab, engt das farblose Filtrat stark ein und versetzt den zurückbleibenden Sirup mit der doppelten Menge Aceton. Die abgeschiedenen Kristalle werden aus 200 ccm 30-proz. Methanol umkristallisiert. Das Bipiperidylderivat bildet farblose Nadeln mit dem Schmp. 203–205°. Ausb. 0.5 g (33% d. Th.).

$C_{26}H_{34}N_4O_2$ (434.6) Ber. C 71.86 H 7.89 N 12.89 Gef. C 71.55 H 7.63 N 12.85

Mol.-Gew. 449 (kryoskop. in Campher)

1-Benzyl-1.4-dihydro-nicotinsäureamid: 1.07 g (5 mMol) Dihydroverbindung in 150 ccm Äthanol werden mit 75 mg PtO_2 nach ADAMS versetzt und wie oben hydriert. Die Aufnahme der berechneten Wasserstoffmenge (240 ccm) ist nach $\frac{1}{2}$ Stde. beendet. Das *1-Benzyl-3-aminoformyl-piperidin* wird aus 100 ccm Wasser umkristallisiert. Man erhält 0.8 g (80% d. Th.) farblose Nadeln vom Schmp. 122–123°.

$C_{13}H_{18}N_2O$ (218.3) Ber. C 71.53 H 8.31 N 12.83 Gef. C 71.30 H 8.55 N 12.54

Mol.-Gew. 216 (kryoskop. in Campher)

Reoxydation mit Methylenblau

Dimeres Reduktionsprodukt aus 1-Benzyl-3-aminoformyl-pyridiniumchlorid: In dem Extraktionsrohr A (Abbild. 3) wurden 160 mg (0.41 mMol) Methylenblau ($ZnCl_2$ -Doppelsalz) in 50 ccm Wasser, im Kolben C 75 ccm Methylenchlorid vorgelegt. Die Apparatur wurde gründlich mit Stickstoff durchgespült und dann eine Suspension von 213 mg (0.5 mMol) des Dimeren in 25 ccm Methylenchlorid und 15 ccm Äthanol in A eingebracht. Nach 3 stdg. Rühren und Durchleiten von Stickstoff war die wäbr. Phase fast entfärbt. Die Mischung wurde 2–3 Stdn. extrahiert, bis das Methylenchlorid farblos abließ. Die wäbr. Phase wurde mit Kohle aufgeköcht, i. Vak. eingedampft und der krist. Rückstand aus 20 ccm Äthanol umkristallisiert. Wir erhielten 180 mg (89% d. Th.) *1-Benzyl-3-aminoformyl-pyridiniumchlorid* als farblose Prismen vom Zers.-P. 230–233° (Lit.¹¹⁾: 235–239°. Reduktion mit $Na_2S_2O_4$ lieferte *1-Benzyl-1.4-dihydro-nicotinsäureamid*, das durch Schmp. 121–122° (Lit.¹¹⁾: 120–122°, Misch-Schmp. und UV-spektroskopisch identifiziert wurde.

*1-[2.6-Dichlor-benzyl]-1.4-dihydro-nicotinsäureamid*¹⁴⁾: 155 mg (0.55 mMol) Dihydroverbindung wurden mit 160 mg (0.5 mMol) Methylenblau (Chlorid) umgesetzt. Nach 3 Tagen war die wäbr. Phase entfärbt. Das Pyridiniumsalz wurde durch Reduktion mit $Na_2S_2O_4$ wieder in das 1.4-Dihydro-pyridin-Derivat übergeführt, von dem 42 mg (30% d. Th.) erhalten wurden.

Das *1-[2.6-Dichlor-benzyl]-1.6-dihydro-nicotinsäureamid*¹⁴⁾ wurde in gleicher Weise umgesetzt und aufgearbeitet. Wir erhielten 68 mg (48% d. Th.) 1.4-Dihydro-pyridin-Derivat.

) Vgl. Fußnote) S. 1410.