

chauffée au bain de vapeur pour en chasser l'éther, et le résidu, distillé sous un vide de 6 mm., a fourni les fractions suivantes:

1	de 113° à 120°	8,9 gr.
2	de 120° à 197°	4,7 gr.
3	de 197° à 214°	29,5 gr.
	résidu	3,3 gr.

La fraction N° 3, qui a passé entre 197° et 214° possédait, à l'état brut, un point de congélation de 27°, supérieur à celui de l'alcool anisique pur, et, par cristallisation dans l'éther de pétrole puis dans l'alcool, elle a fourni 17,5 gr. d'éther dianisique, paillettes blanches fusibles à 39°¹⁾ et donnant par pyrolyse les produits décrits par *Quelet*.

3,940 mg. ont donné 10,775 mg. CO₂ et 2,500 mg. H₂O

C₁₆H₁₈O₃ Calculé C 74,4 H 7,0%
 Trouvé „ 74,6 „ 7,1%

Il nous paraît donc bien établi que l'éther dianisique obtenu par *Quelet* n'a pas été produit par la saponification potassique en solution aqueuse, mais par une déshydratation accidentelle post-opératoire.

Genève-Vernier, Laboratoires scientifiques des Usines
L. Givaudan & Cie.

5. Modellversuche betreffend die wasserstoffübertragenden Wirkungsgruppen der Cofermente

von P. Karrer, B. H. Ringier, J. Büchi, H. Fritzsche und U. Solmssen²⁾.

(18. XII. 36)

I. 3-Carbonsäure-amid des N-d-Glucosido-pyridiniumbromids und N-d-Glucosido-o-dihydro-nicotinsäure-amid.

Durch die Modellversuche mit Nicotinsäure-amid-jodmethylat konnte gezeigt werden³⁾, dass Nicotinsäure-amid, welches von *O. Warburg* im wasserstoffübertragenden Coferment (Codehydrase II, Triphospho-pyridin-nucleotid) und von *H. v. Euler* in der Cozymase

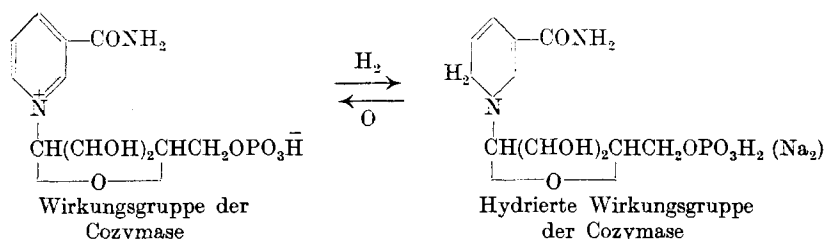
¹⁾ *R. Quelet* et *J. Allard* indiquent pour l'éther dianisique d'une part un p. de f. de 39° (Bl. [5] 3, 1798 (1936)) et d'autre part un p. de f. de 49° (Bl. [5] 3, 1799 (1936)). L'erreur qu'implique la deuxième indication (le p. de f. de l'oxyde d'anisyle est bien de 39°) est vraisemblablement due à une faute d'impression.

²⁾ Die Glucosederivate des Pyridins von *J. Büchi*, die Xyloseverbindung des Nicotinsäure-amids von *H. Fritzsche* und das Nicotinsäure-amid-arabinsederivat von *U. Solmssen* experimentell bearbeitet. Die Absorptionsspektren hat *H. Fritzsche* aufgenommen.

³⁾ *P. Karrer*, *G. Schwarzenbach*, *F. Benz*, *U. Solmssen*, *Helv.* 19, 811 (1936); *P. Karrer*, *O. Warburg*, *Bioch. Z.* 285, 297 (1936).

(Codehydrase I, Diphospho-pyridin-nucleotid) aufgefunden worden war, als quartäres Pyridiniumsalz darin vorkommt und dass seine Fähigkeit, den Wasserstoff zu übertragen (*O. Warburg*), mit diesem besonderen Bindungszustand zusammenhängt.

Der eine von uns (*P. K.*) hat zugleich die Vermutung ausgesprochen¹⁾, dass der mit dem Pyridinstickstoff im Nicotinsäure-amid verbundene organische Rest eine Zuckergruppe (Pentose) ist. Weiterhin wurde gemeinsam mit *H. v. Euler* gezeigt, dass in der Cozymase der veresternde Phosphorsäurerest in Stellung 5 des Zuckers stehen muss²⁾, weil Perjodsäure keinen Formaldehyd entstehen lässt. So konnte man sich also über die wasserstoffübertragende Wirkungsgruppe der Cozymase und ihre reversible Reduzierbarkeit folgendes Bild machen



Hierbei ist noch zu bemerken, dass die hydrierte Form der Wirkungsgruppe nur in alkalischer Lösung existiert und der Phosphorsäurerest daher in neutralisierter Form (z. B. als Natriumsalz) vorliegt.

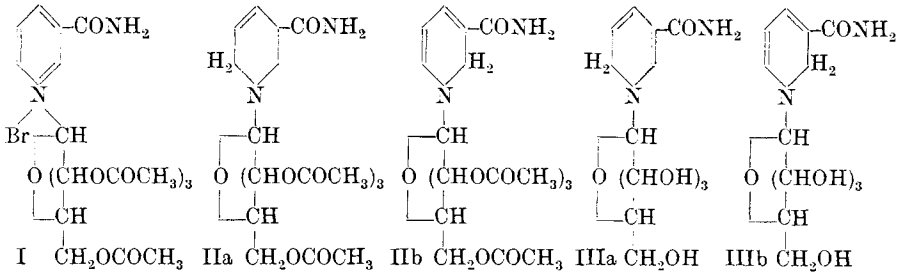
Unsere weiteren Arbeiten erstrebten daher die Synthese von Nicotinsäure-amidderivaten, in denen der Pyridinstickstoff Zuckerreste trägt; diese sollten mit den wasserstoffübertragenden Wirkungsgruppen der Cofermente verglichen werden. Im folgenden berichten wir über einen Teil dieser Versuche.

Nicotinsäure-amid lässt sich infolge seines hohen Schmelzpunktes mit Acetobromglucose nicht ohne Lösungsmittel (wie dies z. B. bei Pyridin und Nicotinsäure-nitril der Fall ist) kondensieren. Die Schwerlöslichkeit des Nicotinsäure-amids in den meisten indifferenten Lösungsmitteln verbietet auch die Anwendung vieler solcher Solventien. Doch fanden wir im Dioxan einen für diesen Zweck geeigneten Stoff. Unter Innehaltung bestimmter Bedingungen erhält man aus Nicotinsäure-amid und Acetobromglucose in Dioxan in mässiger Ausbeute das Additionsprodukt I, 3-Carbonsäure-amid des N-Tetracetyl-glucosido-pyridiniumbromids. Die Verbindung krystallisiert in Nadeln, zersetzt sich zwischen 192—200° und reduziert, wie Cozymase und wasserstoffübertragendes Cofer-

¹⁾ *P. Karrer, G. Schwarzenbach, F. Benz, U. Solmssen, Helv. 19, 811 (1936); P. Karrer, O. Warburg, Bioch. Z. 285, 1060 (1936).*

²⁾ *H. v. Euler, P. Karrer, B. Becker, Helv. 19, 1060 (1936).*

ment, *Fehling'sche* Lösung, da sie durch Alkalien wie die beiden Cofermente unter Abspaltung des Zuckerrestes zersetzt wird. (Über die Alkaliunbeständigkeit solcher Pyridiniumverbindungen vgl. *Helv.* **19**, 811 (1936).)



Bei der Reduktion mit Natriumhyposulfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) in Bicarbonat nimmt die Verbindung 2 Atome Wasserstoff auf, wobei sich die Lösung, wie in allen analogen Fällen, zunächst tief gelb färbt¹⁾. Wir haben die Reduktion nach dem Vorbild der Reduktion des wasserstoffübertragenden Coferments durch *O. Warburg* und *Christian*²⁾ manometrisch verfolgt; bekanntlich wird dabei die Kohlendioxydmenge gemessen, die aus Natriumbicarbonat durch das bei der Reduktion gebildete Natriumbisulfit in Freiheit gesetzt wird. Es gelingt aber auch unschwer, das Reduktionsprodukt, das *N-d*-Tetracetyl-glucosido-*o*-dihydro-nicotinsäure-amid zu isolieren. Dieses krystallisiert in langen, farblosen Nadeln, schmilzt bei 157—158° und besitzt entweder Formel IIa oder IIb. Durch Verseifung mit alkoholischem Ammoniak erhält man daraus das schön krystallisierte *N-d*-Glucosido-*o*-dihydro-nicotinsäure-amid (Formel IIIa oder IIIb); Zersetzungspunkt 203—205°.

Dass in diesem *N-d*-Glucosido-dihydro-nicotinsäure-amid die ortho-Dihydroverbindung vorliegt, wird durch Vergleich ihrer Eigenschaften mit denjenigen des *N*-Methyl-*o*-dihydro-nicotinsäure-amids³⁾ und des reduzierten Coferments bewiesen. Für *N*-Methyl-*o*-dihydro-nicotinsäure-amid ist die Absorptionsbande von 360 $\text{m}\mu$ charakteristisch, die beim Ansäuern verschwindet und durch eine solche mit Maximum bei 295 $\text{m}\mu$ ersetzt wird³⁾. Reduziertes Coferment weist ein analoges Absorptionsmaximum bei 340 $\text{m}\mu$ auf⁴⁾, das nach dem Ansäuern einem solchen von 295 $\text{m}\mu$ Platz macht. *N*-Methyl-*para*-dihydro-nicotinsäure-amid absorbiert dagegen nicht in diesem Wellenbereich³⁾.

N-d-Glucosido-*o*-dihydro-nicotinsäure-amid und sein Tetracetat stimmen mit der reduzierten Form des Coferments in bezug auf das

¹⁾ Über die gelben Zwischenstufen vgl. *P. Karrer* und *F. Benz*, *Helv.* **19**, 1028 (1936).

²⁾ *Bioch. Z.* **282**, 157 (1935).

³⁾ *P. Karrer*, *Schwarzenbach*, *Benz*, *Solmssen*, *Helv.* **19**, 811 (1936).

⁴⁾ *O. Warburg* und *W. Christian*, *Bioch. Z.* **282**, 157 (1935); **287**, 291 (1936).

spektrale Verhalten vollkommen überein. In alkalischer Lösung liegt das Maximum der Absorptionsbande bei $340\text{ m}\mu$; durch Ansäuern wird die Verbindung irreversibel zerstört, die Bande $340\text{ m}\mu$ verschwindet und eine neue mit Maximum $275\text{--}280\text{ m}\mu$ erscheint; die letztere bleibt auch erhalten, wenn die angesäuerte Lösung wieder alkalisiert wird. (Vgl. die Absorptionsspektren Figg. 1 bis 3.)

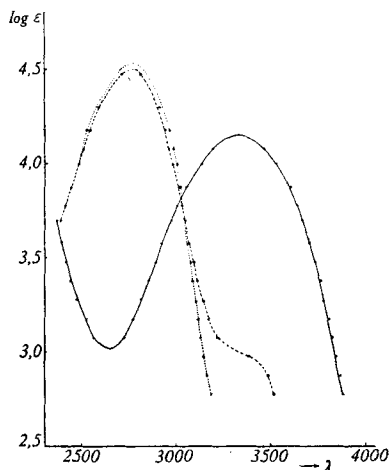


Fig. 1.

3-Carbonsäure-amid des N-Tetracetyl-*d*-glucosido-o-dihydro-pyridins.

- in 0,001-n. wässriger Natronlauge
- schwach kongosauer
- nach dem Ansäuern wieder alkalisch gemacht (0,001-n. NaOH)
c = g/cm³.

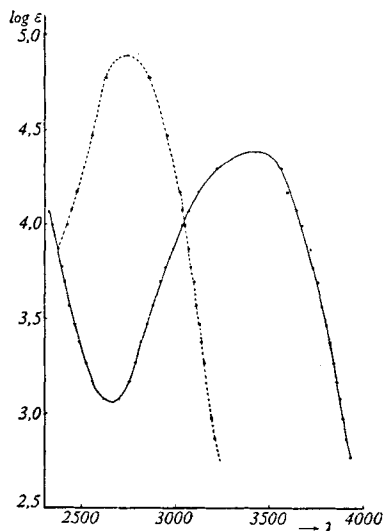


Fig. 2.

3-Carbonsäure-amid des N-*d*-Glucosido-o-dihydro-pyridins.

- in 0,001-n. wässriger NaOH
- kongosauer
c = g/cm³

N-d-Glucosido-o-dihydro-nicotinsäure-amid wirkt reduzierend; das Reduktionsvermögen ist aber viel geringer als dasjenige des *N*-Methyl-o-dihydro-nicotinsäure-amids. Wie wir dies schon in unserer ersten Mitteilung¹⁾ vorausgesehen haben, übt die Natur des am Stickstoff haftenden organischen Restes einen wesentlichen Einfluss auf die Reduktionskraft solcher ortho-Dihydro-pyridinderivate aus. Aus Silbernitratlösung (ohne Ammoniak-Zusatz) scheidet *N-d*-Glucosido-o-dihydro-nicotinsäure-amid Silber in der Kälte erst nach längerem Stehen aus, schnell dagegen beim Erwärmen. Kaliumferricyanid dehydriert bei alkalischer Reaktion nicht. Gegen Luftsauerstoff ist die Dihydroverbindung anscheinend

¹⁾ P. Karrer, Schwarzenbach, Benz, Solmssen, Helv. 19, 811 (1936).

beständig, dagegen wird sie, wie die reduzierten Formen der Cozymase¹⁾ und des wasserstoffübertragenden Coferments²⁾ bei Gegenwart von Flavin durch den Luftsauerstoff schnell dehydriert. Nachstehende Absorptionskurve zeigt den Verlauf der Sauerstoffabsorption von 29,97 mg N-d-Glucosido-o-dihydro-nicotinsäure-amid bei Gegenwart von 1 mg Lactoflavin bei 25,3° C (Fig. 4).

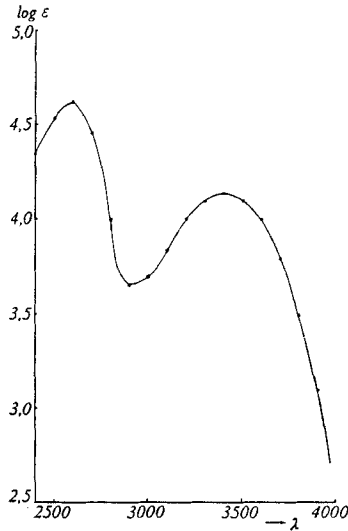


Fig. 3.

Hydriertes Triphospho-pyridin-nucleotid (Absorptionskurve nach O. Warburg und W. Christian).

Absorptionsspektrum bei $p_H = 7,4$. Das Absorptionsmaximum 260 $m\mu$ entspricht der Adeninbande, das Maximum 340 $m\mu$ ist die Bande des hydrierten Triphosphopyridin-nucleotids.

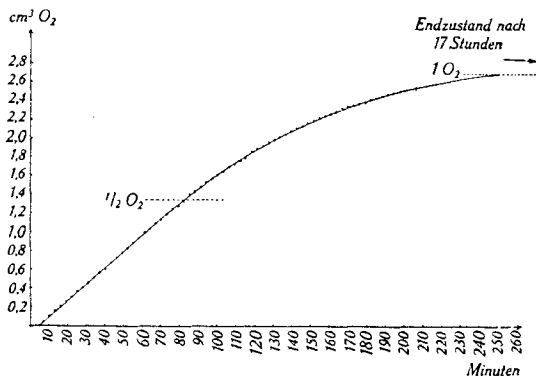
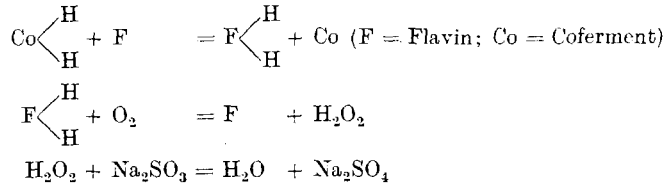


Fig. 4.

¹⁾ Euler, Adler und Hellström, Sv. Kemisk Tidskr. **47**, 290 (1935); Z. physiol. Ch. **241**, 239 (1936); **242**, 225 (1936).

²⁾ O. Warburg und W. Christian, Bioch. Z. **279**, 143 (1935); **282**, 157 (1935); **287**, 291 (1936).

1 Mol Dihydroverbindung verbraucht somit bei der Dehydrierung 1 Mol O₂. In gleicher Weise erfordert die Dehydrierung des mit Natriumhyposulfit reduzierten Coferments nach *O. Warburg, W. Christian* und *A. Griese*¹⁾ ebenfalls 1 Molekel pro Mol hydriertem Coferment, weil sich primär Wasserstoffperoxyd bildet, welches nach der Ansicht der genannten Autoren daraufhin zur Oxydation des anwesenden Natriumsulfits verbraucht wird:



Bei unserer Versuchsanordnung, in welcher reines N-Glucosido-o-dihydro-nicotinsäure-amid unter Mitwirkung von Flavin durch Sauerstoff dehydriert wird, ist Sulfit nicht vorhanden, und man müsste daher erwarten, dass sich nach beendigter Sauerstoffabsorption Wasserstoffperoxyd vorfindet. Indessen konnten wir dieses bisher nicht nachweisen. Es ist daher wahrscheinlich, dass es zu einem sekundären Oxydationsprozess weiter verbraucht wird; die präparative Darstellung des Dehydrierungsproduktes wird darüber Auskunft geben. Man muss mit der Möglichkeit rechnen, dass auch bei Gegenwart von Sulfit derselbe sekundäre Oxydationsvorgang in grösserem oder geringerem Ausmass vor sich geht.

Wie aus dem wasserstoffübertragenden Coferment und der Cozymase, wird auch aus dem 3-Carbonsäure-amid des N-Tetracetylglucosido-pyridiniumbromids bei längerem Erhitzen mit stark verdünnter Schwefelsäure Nicotinsäure-amid abgespalten. So wurden aus 0,1 g des Bromids nach 6stündigem Erhitzen mit 0,2-n. H₂SO₄ 22 mg Pikrolonat gewonnen; (Theorie 0,72 g). Ausbeute somit 30%. Smp. 216,5°; Mischschmelzpunkt 215,5°.

3-Carbonsäure-amid des N-Tetracetylglucosido-pyridiniumbromids ist demnach etwas schwerer hydrolysierbar als Cozymase und Triphospho-pyridin-nucleotid, die unter den gewählten Reaktionsbedingungen der Spaltung vollständig unterliegen. Es ist wahrscheinlich, dass dieser Unterschied auf die verschiedene Form zurückzuführen ist, in der die Zuckerreste in den Cofermenten einerseits, in der Modells substanz andererseits vorliegen (in einem Fall als Monophosphorsäure-ester, im anderen als Tetracetylderivat).

Das 3-Carbonsäure-amid des N-Glucosido-pyridiniumbromids fluoresciert in wässriger Lösung im Ultraviolettlicht grünlichblau, in Methanol violett; in beiden Fällen ist die Fluorescenz nicht sehr stark. Nach *O. Warburg* fluoresciert hydriertes Coferment weisslich, ebenso das reversible Reduktionsprodukt des Nicotinsäure-amidjodmethylats. Wir selber haben indessen letztere Verbindung bisher

¹⁾ Bioch. Z. **282**, 157, und zwar S. 192 (1935).

nie ohne blaue Fluorescenz in Händen gehabt und gut krystallisierte N-Alkyl-o-dihydro-nicotinsäure-amide mit höheren Alkylresten, die inzwischen Herr *F. Stare* in diesem Laboratorium in reinem Zustand gewann, fluorescieren ebenfalls bläulich. Da schon analytisch nicht nachweisbare Mengen von p-Dihydroderivaten Veranlassungen der Fluorescenzerscheinungen sein können, so besteht die Möglichkeit, dass die genannten o-Dihydro-pyridinverbindungen ihre Fluorescenz von Spuren beigemengter p-Dihydroverbindungen erhalten.

Die vorliegende Untersuchung macht es in hohem Grade wahrscheinlich, dass N-*d*-Glucosido-o-dihydro-nicotinsäure-amid das Analogon der reduzierten Formen der wasserstoffübertragenden Wirkungsgruppen der Cofermente ist, von denen es sich durch die andere Natur der Zuckergruppe und das Fehlen des Phosphorsäurerestes unterscheidet.

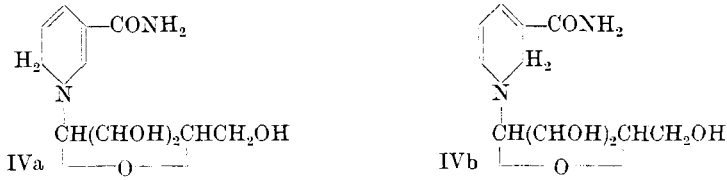
In weiteren Versuchen bemühten wir uns, den Glucoserest in den vorerwähnten Nicotinsäure-amidderivaten durch Pentosegruppen zu ersetzen, da die Cofermente als Zucker Pentose enthalten. Dabei stellten sich unerwartete Schwierigkeiten ein. Schon bei der Anlagerung von Acetobromglucose an Pyridin beobachteten *E. Fischer* und *K. Raske* vor längerer Zeit¹⁾, dass nur eine verhältnismässig geringe Menge von krystallisiertem Tetracetyl-glucosido-pyridiniumbromid erhalten und dass daneben ein zweites, öliges Anlagerungsprodukt gebildet wird. Dies erklärt sich vielleicht daraus, dass bei der Anlagerung 2 sterische Isomere entstehen können, die sich von der α - und der β -Glucose ableiten; krystallisierte und ölige Anlagerungsverbindungen können diesen beiden Isomeren entsprechen.

Während, wie wir gezeigt haben, Acetobromglucose mit Nicotinsäure-amid ein krystallisiertes Pyridinium-Anlagerungsprodukt liefert, haben wir aus Nicotinsäure-amid und Acetobromarabiose bzw. Acetobromxylose bisher nur amorphe, zur Bildung dicker Öle neigende Additionsverbindungen erhalten (3-Carbonsäure-amid des N-Triacetyl-arabinosido-pyridiniumbromids, 3-Carbonsäure-amid des N-Triacetyl-xylosido-pyridiniumbromids). Wir setzen selbstverständlich die Versuche fort, durch Abänderung der Reaktionsbedingungen auch hier krystallisierte Derivate zu gewinnen.

Als Vorversuche haben wir inzwischen die genannten, nicht krystallisierten und daher nicht reinen Bromide mit Natriumhyposulfit in Bicarbonat reduziert. Sie liefern dabei ebenfalls Dihydroderivate, nämlich N-Triacetyl-arabinosido-o-dihydro-nicotinsäure-amid und N-Triacetyl-xylosido-o-dihydro-nicotinsäure-amid, die aber ebensowenig Neigung zur Krystallisation besaßen. Durch Abspaltung

¹⁾ B. 43, 1750 (1910).

der Acetylgruppen mit alkoholischem Ammoniak bilden sich daraus N-Arabinosido-o-dihydro-nicotinsäure-amid und N-Xylosido-o-dihydro-nicotinsäure-amid (IVa oder IVb).



Diese Verbindungen zeigten etwas günstigere Eigenschaften als ihre Ausgangsstoffe. Sie lassen sich aus hochprozentigem Äthylalkohol mikrokristallin abscheiden; wenn sie auch noch nicht rein vorliegen, so lieferten sie doch z. T. richtige Analysenwerte und sind daher zu einer ersten Untersuchung geeignet. Im Reduktionsvermögen und in ihren spektralen Eigenschaften gleichen sie dem N-Glucosido-o-dihydro-nicotinsäure-amid weitgehend. In alkalischer Lösung (0,001-n. NaOH) liegt das Absorptionsmaximum sowohl beim N-l-Arabinosido-o-dihydro-nicotinsäure-amid wie beim N-d-Xylo-

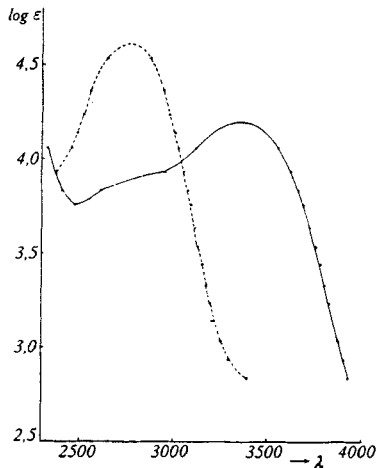


Fig. 5.
 3-Carbonsäure-amid des N-d-Xylosido-o-dihydro-pyridins.
 o—o—o alkalisch (0,001-n. NaOH)
 --o--o-- kongosauer
 c = g/cm³

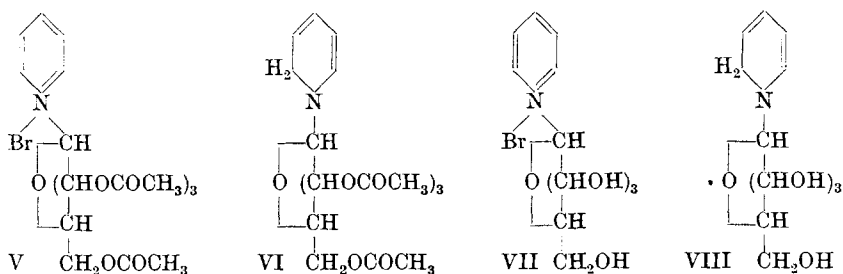
sido-o-dihydro-nicotinsäure-amid bei 340 mμ. Die Bande verschwindet beim Ansäuern; an ihre Stelle tritt eine solche mit Maximum 275 mμ. Durch Sauerstoff werden sie bei Gegenwart von Flavin (sowie Methylenblau) oxydiert. Kaliumferricyanid kann dagegen in alkalischer Lösung ihre Dehydrierung ebensowenig wie diejenige des N-Glucosido-o-dihydro-nicotinsäure-amids bewirken.

II. Andere *N*-Glucosido-pyridiniumverbindungen.

Die erste *N*-Glucosido-pyridiniumverbindung, die bekannt wurde, ist das *N*-Tetracetyl-glucosido-pyridiniumbromid (V), das *E. Fischer* und *K. Raske*¹⁾ aus den Komponenten darstellen konnten und welches *P. Karrer*, *A. Widmer* und *Joh. Staub*²⁾ zum *N*-Glucosido-pyridiniumbromid (VII) verseiften.

Bei der manometrischen Verfolgung der Reduktion von Pyridiniumsalzen mit Natriumhyposulfit haben *O. Warburg* und der eine von uns auch das *N-d*-Glucosido-1-pyridiniumjodid dem Reduktionsversuch unterworfen³⁾. Dabei trat eine langsame Reduktion ein; aber es schien, dass „die Verbindung zu einer Substanz hydriert wird, die mit der hydrierten Wirkungsgruppe der Cofermente nicht vergleichbar ist“. Wir haben diesen Reduktionsvorgang jetzt präparativ verfolgt. Dabei zeigte es sich, dass jene Auffassung von einer prinzipiell verschiedenen Natur der Reduktionsprodukte des Glucosido-pyridiniumsalzes einerseits und der Cofermente andererseits nicht zutreffend ist. Wohl bestehen in den Absorptionsspektren bemerkenswerte Verschiedenheiten; diese müssen aber auf den Einfluss der Carbonsäure-amid-gruppe in den Nicotinsäure-amidderivaten (Cofermente etc.) zurückgeführt werden und beruhen nicht auf einem verschiedenen Konstitutionstypus.

N-d-Tetracetyl-glucosido-pyridiniumbromid (V) lässt sich nämlich wie das *N*-Tetracetyl-glucosederivat des Nicotinsäure-amids mit Hyposulfit in bicarbonatalkalischer Lösung zum *o*-Dihydroderivat, dem *N-d*-Tetracetyl-glucosido-*o*-dihydro-pyridin (VI) reduzieren. Die Verbindung krystallisiert aus heissem Wasser und aus Alkohol in



Nadeln, schmilzt bei 154—155° und lässt sich mit alkoholischem Ammoniak zum *N-d*-Glucosido-*o*-dihydro-pyridin (VIII) verseifen. Die beiden Dihydroverbindungen besitzen wie *N-d*-Glucosido-*o*-dihydro-nicotinsäure-amid und dessen Tetracetylderivat Reduktionsvermögen für Silbernitratlösung, und zwar tritt die Silberausscheidung in allen Fällen erst beim Erwärmen der Lösung rasch und vollständig

¹⁾ B. 43, 1750 (1910).

²⁾ Helv. 7, 519 (1924).

³⁾ Bioch. Z. 285, 297 (1936).

ein. Kaliumferricyanid oxydiert in alkalischer Lösung nicht. Ein nennenswerter Unterschied besteht indessen, wie schon bemerkt, in den Absorptionsspektren des N-Glucosido-o-dihydro-nicotinsäure-amids und der hydrierten Cofermente einerseits, und des N-Glucosido-o-di-hydro-pyridins andererseits. Die Absorption ist bei letzterem stark nach dem kurzwelligen Teil des Spektrums verschoben (siehe Abbildung 6) und die Absorptionskurve hat eine andere Gestalt als diejenigen der o-Dihydro-nicotinsäure-amid-derivate.

Wir glauben, dass diese Verschiebung verständlich wird, wenn man sich vergegenwärtigt, dass in den o-Dihydro-nicotinsäure-amid-derivaten drei Doppelbindungen in Konjugation stehen (zwei Äthylenbindungen im Ring sowie das Carbonyl der Säureamid-gruppe), während N-Glucosido-o-dihydro-pyridin nur 2 konjugierte Doppelbindungen enthält.

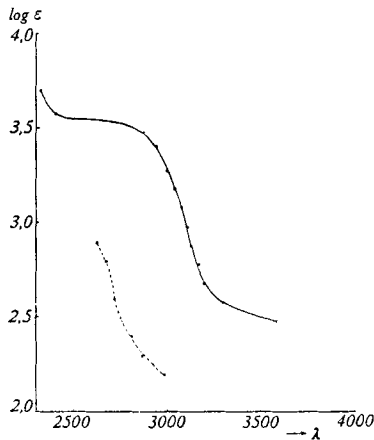


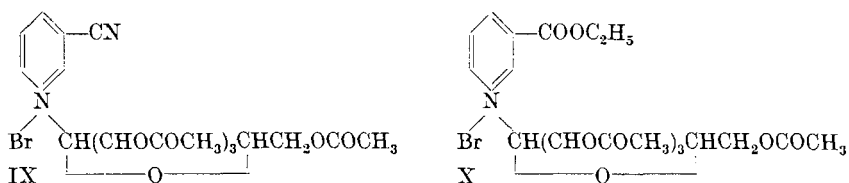
Fig. 6.

N-Tetracetyl-glucosido-o-dihydro-pyridin.

- alkalisch, Substanz gelöst in 20 cm³ absolutem Alkohol und mit 0,001-n. wässriger NaOH verdünnt auf 100 cm³.
- kongosauer, Substanz in 100 cm³ Wasser + 0,06 cm³ konz. H₂SO₄
c = g/cm³

Im weiteren haben wir aus Nicotinsäure-nitril und Acetobrom-glucose N-d-Tetracetyl-glucosido-3-cyan-pyridiniumbromid (IX) dargestellt. Diese gut krystallisierte Verbindung schmilzt bei 156°. Bei der Reduktion mit Natriumhyposulfit in Bicarbonatlösung nimmt sie 2 Atome Wasserstoff auf (manometrische Messung), geht also in normaler Weise in ein Dihydroderivat über. Es scheint indessen, dass dabei die vorhandene Nitrilgruppe die Ursache von Sekundärreaktionen ist (vielleicht Anlagerung von Natriumhyposulfit oder Zersetzungsprodukten desselben), da bei der Isolierung

der Reduktionsprodukte bisher nur stark aschehaltige Substanzen gefasst werden konnten.



Aus Nicotinsäure-äthylester und Acetobromglucose erhält man die Anlagerungsverbindung X, *N-d*-Tetracetyl-glucosido-pyridinium-3-carbonsäure-äthylester-bromid. Sie zeigte bisher keine Neigung zur Krystallisation, wurde aber analysenrein gewonnen und lässt sich mit Natriumhyposulfit unter Aufnahme von 2 Atomen Wasserstoff in normaler Weise zu einer gut krystallisierten *o*-Dihydroverbindung reduzieren (Smp. 146,5⁰) die in einer späteren Mitteilung eingehender beschrieben werden soll. (Manometrische Messung, vgl. experimenteller Teil.)

N-d-Glucosido-*o*-dihydro-nicotinsäure-amid, das 3-Carbonsäureamid des *N-d*-Glucosido-pyridiniumbromids, *N-l*-Arabosido-*o*-dihydro-nicotinsäure-amid und *N-d*-Xylosido-*o*-dihydro-nicotinsäure-amid können im Gärversuch Cozymase nicht ersetzen.

Unsere weiteren Bemühungen sind nun darauf gerichtet, in die neuen Zuckerderivate des Nicotinsäure-amids Phosphorsäurereste einzuführen; diese Ester sollen dann mit den Cofermenten eingehend verglichen werden.

Experimenteller Teil.

Nicotinsäure-amid.

Zur Darstellung von Nicotinsäure-amid aus Nicotinsäure-ester hat sich die folgende Methode am besten bewährt:

Man gibt zu 76 g destilliertem Nicotinsäure-äthylester 40 g einer bei — 20⁰ gesättigten wässrigen Ammoniaklösung¹⁾. Das Gemisch lässt man unter wiederholtem Umschütteln bei — 5⁰ stehen. Nach 4 bis 5 Tagen ist die Flüssigkeit homogen geworden, und es beginnt Krystallabscheidung, welche die Flüssigkeit fortschreitend durchsetzt. Man saugt in der Kälte ab und erhält eine erste Fraktion von 10 g, durch Eindampfen der Mutterlauge im Vakuum eine zweite von 20 g Nicotinsäure-amid. Durch Auskochen der krystallisierten Substanz mit Petroläther werden 30 g unveränderter Ester zurückgewonnen. Nach erneutem Umsatz mit Ammoniak können hieraus noch 18 g Nicotinsäure-amid erhalten werden. Ausbeute 48 g (78 %

¹⁾ Vgl. Camps, Arch. Pharm. **240**, 354 (1902).

d. Th.). Zur weiteren Reinigung krystallisieren wir aus Aceton um und erhalten farblose Nadeln vom Smp. 131—132°. (Frühere Angaben der Literatur 121—125°.)

3-Carbonsäure-amid des N-Tetracetyl-glucosido-pyridiniumbromids (I).

6 g Nicotinsäure-amid werden unter Erwärmen in 70 cm³ Dioxan gelöst. In die abgekühlte Flüssigkeit trägt man 20,5 g Acetobromglucose ein und lässt hierauf die Reaktionsmischung im Brutschrank bei 35° 48 Stunden stehen. Nach dieser Zeit hat sich ein Krystallkuchen gebildet. Dieser wird abgenutscht und mit etwas Dioxan nachgewaschen. Aus der Mutterlauge scheidet sich beim weiteren Stehen im Brutschrank noch etwas mehr Substanz aus.

Zwecks Entfernung von Nebenprodukten wird die Krystallmasse zuerst einmal mit Dioxan, hierauf zweimal mit Benzol ausgekocht. Sie enthält dann immer noch etwas Nicotinsäure-amid-bromhydrat, welches infolge eines Zersetzungsprozesses entstanden ist. Dieses lässt sich indessen durch zweimaliges Umkrystallisieren der Verbindung aus absolutem Alkohol entfernen.

Das zweimal aus Alkohol umkrystallisierte 3-Carbonsäure-amid des N-Tetracetyl-glucosido-pyridiniumbromids bildet farblose Nadeln, die sich beim Erhitzen zwischen 192—200° zersetzen und in Wasser sehr leicht löslich sind.

$C_{20}H_{25}O_{10}N_2Br$	Ber. C 45,01	H 4,72	N 5,25%
	Gef. „ 45,00	„ 4,60	„ 5,38%

Spaltung durch heissé Säure¹⁾. 0,1 g 3-Carbonsäure-amid des N-Tetracetyl-glucosido-pyridiniumbromids wurden in 5 cm³ 0,2-n. Schwefelsäure 6 Stunden auf dem Wasserbad erhitzt. Hierauf machten wir mit Soda alkalisch, zogen dreimal mit je 10 cm³ Amylalkohol aus, konzentrierten die Amylalkohollösung und fällten mit Pikrolonsäure das darin vorhandene Nicotinsäure-amid als Pikrolonat aus. Smp. des Pikrolonats 216,5°.

Reduktion des 3-Carbonsäure-amids des N-Tetracetyl-glucosido-pyridiniumbromids (manometrische Messung): In einer Schüttelapparatur wurden 5 cm³ einer 5-proz. Natriumbicarbonatlösung, die mit Kohlendioxyd gesättigt worden war, gebracht, darin 104 mg Natriumhyposulfit aufgelöst und die Flüssigkeit bis zur Volumenkonstanz in Kohlendioxyd-Atmosphäre geschüttelt. Hierauf wurde eine Lösung von 30,02 mg 3-Carbonsäure-amid des N-Tetracetyl-glucosido-pyridiniumbromids sowie von 25 mg Natriumbicarbonat in 0,5 cm³ Wasser eingekippt.

Temperatur während der ganzen Messung 18,5°. Druck 724,8 mm.

Nach dem Eintragen der Substanz wird diese anfangs sehr rasch, nachher mit abnehmender Geschwindigkeit reduziert.

¹⁾ Die Hydrolyse wurde analog derjenigen des Coferments ausgeführt: *Warburg, Christian, Griese. Bioch. Z.* **282**, 182 (1935).

Zeit in Minuten	cm ³ CO ₂	% Umsatz	Zeit in Minuten	cm ³ CO ₂	% Umsatz
0	0,00	0	56	1,62	57,2
0,5	28	9,9	61	60	56,6
1	64	22,6	66	64	57,9
2	86	30,5	71	70	60,0
3	96	34,0	81	85	65,4
5	98	34,5	130	2,03	71,9
8	1,01	35,7	140	07	73,0
12	03	36,4	165	20	77,8
16	07	37,8	180	23	79,0
21	14	40,4	210	34	82,7
26	23	43,5	240	46	86,9
31	33	47,0	270	54	89,8
36	35	47,8	305	64	93,1
41	40	49,5	345	70	95,5
46	50	53,0	425	90	102,2
51	54	54,4			

Die freigesetzte Menge Kohlendioxyd entspricht schliesslich der Aufnahme von 2 Atomen Wasserstoff pro Mol Substanz.

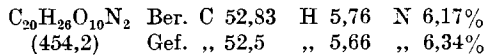
$$\text{Ber. Menge von freigesetztem CO}_2: \frac{30,02 \times 44,8 \times 760 \times 291,5}{533 \times 724,8 \times 273} = 2,83 \text{ cm}^3$$

Gef. Menge = 2,90 cm³.

N-Tetracetyl-glucosido-o-dihydro-nicotinsäure-amid.

0,92 g des 3-Carbonsäure-amids des N-Tetracetyl-glucosido-pyridiniumbromids werden in 100 cm³ Wasser, das mit Kohlendioxyd gesättigt ist, gelöst, 9,0 g Natriumcarbonat und 3,5 g Natriumhyposulfit eingetragen und die klare Lösung über Nacht bei Zimmertemperatur stehengelassen. Nach einigen Stunden ist das N-Tetracetyl-glucosido-dihydro-nicotinsäure-amid in langen Nadeln auskrystallisiert. Ausbeute 0,53 g = 67,5 % d. Th.

Die Verbindung lässt sich aus heissem Wasser gut umkrystallisieren, aus welchem sie in feinen Nadeln erhalten wird. Sie schmilzt bei 157—158°, reduziert Silbernitratlösung schnell in der Wärme und langsam bei gewöhnlicher Temperatur. Methylenblau und Lactoflavin werden von ihr im Vakuum entfärbt.

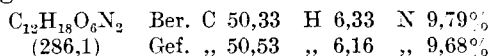


Absorptionsspektrum und andere Eigenschaften vergleiche Einleitung.

N-d-Glucosido-o-dihydro-nicotinsäure-amid.

0,173 g N-Tetracetyl-glucosido-o-dihydro-nicotinsäure-amid werden in 20 cm³ absolutem Alkohol bei 25° gelöst und die Flüssigkeit bei

0° mit trockenem Ammoniakgas gesättigt (20 Minuten durchleiten). Andern Tags dampft man das Lösungsmittel im Vakuum ab, kocht den Rückstand zwecks Extraktion des gebildeten Acetamids 1 Mal mit Essigäther aus und krystallisiert den Rückstand aus Alkohol unter Zusatz einiger Tropfen Wasser um. *N-d-Glucosido-o-dihydro-nicotinsäure-amid* wird so in kompakten Kryställchen erhalten, die bei 203—205° unter Aufschäumen und Gelbfärbung schmelzen. Die Verbindung ist in Wasser sehr leicht löslich.



Oxydation des *N-d-Glucosido-o-dihydro-nicotinsäure-amids* mit Sauerstoff bei Gegenwart von Lactoflavin (manometrische Messung). 29,97 mg *N-d-Glucosido-o-dihydro-nicotinsäure-amid* wurden in Wasser gelöst und im *Warburg-Apparat* bei 25,3° und 727 mm in Sauerstoff-Atmosphäre geschüttelt. Nach eingetretener Volumenkonstanz, was nach wenigen Minuten der Fall war, kippten wir 1,0 mg Lactoflavin ein. Die Sauerstoffabsorption begann nach wenigen Augenblicken und schritt regelmässig fort; nach 80 Minuten war ein halbes Mol O₂, nach 240 Minuten 1 Mol O₂ verbraucht.

Die bei der Absorption von 1 Mol O₂ eintretende Volumenabnahme berechnet sich nach der Formel

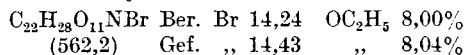
$$V = \frac{29,97 \times 22,4 \times 760 \times 298,3}{286 \times 727 \times 273} = 2,68 \text{ cm}^3 \text{ O}_2$$

Der Verlauf der Sauerstoffabsorption wird durch die in der Einleitung zu dieser Abhandlung reproduzierte Absorptionskurve ausgedrückt.

N-d-Tetracetyl-glucosido-pyridinium-3-carbonsäure-äthylester-bromid
(Formel X).

30,6 g Acetobromglucose, 12,0 g Nicotinsäure-äthylester und 4,5 g Phenol wurden gut verrührt und einen Tag in den Brutschrank bei 35° gestellt. Dann war die Masse steinhart geworden. Wir haben sie zerkleinert, 3 Mal mit Äther und 3 Mal mit Petroläther ausgekocht.

Das so erhaltene Anlagerungsprodukt ist sehr hygroskopisch, leichtlöslich in Wasser, Alkohol, Aceton und Essigester; unlöslich in Äther und Petroläther. Eine Krystallisation ist bisher nicht gelungen. Wir haben daher das Rohprodukt nach zweimaligem Umfällen aus Essigesterlösung mit Äther im Hochvakuum getrocknet und in dieser Form analysiert.



Dieses Anlagerungsprodukt der Acetobromglucose an Nicotinsäure-äthylester lässt sich in bicarbonatalkalischer Lösung mit Natriumhyposulfit in ähnlicher Weise wie die anderen Pyridinium-

verbindungen reduzieren. Auch hier nimmt zu Beginn der Reduktion die Flüssigkeit eine intensiv gelbe Farbe an. Wir haben die Reduktion manometrisch verfolgt und sind dabei wie folgt verfahren:

In einer Schüttelapparatur wurden 5 cm³ einer 5-proz. Natriumbicarbonatlösung, die mit Kohlendioxyd gesättigt worden war und 104 mg Natriumhyposulfit aufgelöst enthielt, in Kohlendioxyd-Atmosphäre bis zur Volumenkonstanz geschüttelt. Hierauf liessen wir eine Lösung von 26,9 mg des Bromids und 25 mg Natriumbicarbonat in 0,5 cm³ Wasser hinzufliessen.

Temperatur	22,2° C.	Druck	733,9 mm.
Entwickelte Menge CO ₂	1,72 cm ³	
Retention	0,48 cm ³	
Gesamtes in Freiheit gesetztes CO ₂	2,20 cm ³	(22,2°, 733,9 mm)

Die bei einer Wasserstoffaufnahme von 1 Mol berechnete Menge freigesetztes CO₂ beträgt 2,40 cm³.

$$\left(v = \frac{26,9 \times 44,8 \times 760 \times 295,2}{562 \times 733,9 \times 273} = 2,40 \text{ cm}^3 \right)$$

N-Tetracetyl-glucosido-o-dihydro-pyridin (Formel VI).

2 g N-Tetracetyl-glucosido-pyridiniumbromid¹⁾ wurden in 30 cm³ Wasser gelöst und dazu eine Lösung von 6 Mol Natriumbicarbonat und 3 Mol Natriumhyposulfit in 20 cm³ Wasser gegeben. Nach kurzer Zeit begann sich das Reduktionsprodukt als schwach gelber, flockiger Niederschlag abzuscheiden. Nach 5 Stunden haben wir diesen abfiltriert und aus 90-proz. Alkohol umkrystallisiert, wobei das N-Tetracetyl-glucosido-o-dihydro-pyridin in Form feiner, farbloser Nadeln erhalten wurde. Diese lösen sich auch in siedendem Wasser sehr schwer. Nach zweimaligem Umkrystallisieren und Trocknen im Vakuum bei 70° besass die Substanz den Smp. 154—155°.

C ₁₉ H ₂₅ O ₉ N	Ber. C 55,45	H 6,13%
(411,2)	Gef. „ 55,33	„ 5,95%

Die Abspaltung der Acetylreste kann durch alkoholisches Ammoniak erfolgen. Zu diesem Zwecke löst man das N-Tetracetyl-glucosido-o-dihydro-pyridin in einer gesättigten alkoholischen Ammoniaklösung und lässt 14 Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels im Vakuum bei 30° hinterbleibt ein Rückstand, der sich in kochendem Alkohol, dem einige Tropfen Wasser zugesetzt sind, löst und beim starken Kühlen als nicht krystalliner Niederschlag ausscheidet. Das so gewonnene N-Glucosido-o-dihydro-pyridin löst sich spielend in Wasser, ist hygroskopisch und reduziert Silbernitratlösung in der Wärme.

N-d-Tetracetyl-glucosido-3-cyan-pyridiniumbromid (Formel IX).

2 g Nicotinsäure-nitril werden mit 8 g reinsten Acetobromglucose im Mörser innig gemischt. Dazu gibt man 1,2 g Phenol und

¹⁾ B. 43, 1750 (1910).

lässt die Mischung 2 Tage bei 35° stehen. Sie wird zuerst dünnflüssig, später hornartig und zuletzt fest. Man zerkleinert den harten Kuchen im Mörser und zieht zur Entfernung nicht umgesetzter Produkte 4 Mal mit je 30 cm³ Petroläther und 4 Mal mit gleich viel Äther aus. Der farblose, pulverige Rückstand wird in ca. 150 cm³ absolutem Alkohol heiss gelöst und filtriert. Beim Erkalten krystallisiert *N-d*-Tetracetyl-glucosido-3-cyan-pyridiniumbromid aus. Smp. 156°. Bei wiederholter Umkrystallisation fällt der Schmelzpunkt infolge beginnender Zersetzung um 2 bis 3°. Ausbeute 1,9 g.

C₂₀H₂₃O₉N₂Br Ber. C 46,59 H 4,50 N 5,42 Br 15,52%
 Gef. „ 45,80¹⁾ „ 4,37 „ 5,26 „ 15,48%

Volumetrische Messung der Reduktion mit Na₂S₂O₄:

1) Lösung I: 108 mg Na₂S₂O₄ Lösung II: 22,0 mg Substanz
 330 mg NaHCO₃ 20 mg NaHCO₃
 5 cm³ Wasser 0,5 cm³ Wasser

Temperatur 22,7°, Druck 726 mm. Reaktionsgefäß gefüllt mit CO₂.

Entwickelte Menge von CO₂ nach 10 Minuten 1,61 cm³
 nach Vol.-Konstanz (80 Min.) . 1,66 „
 Retention 0,48 „

22,0 mg Substanz setzten somit 2,14 cm³ CO₂ frei (22,7°, 726 mm). Bei einer Wasserstoffaufnahme von 1 Mol H₂ pro Mol Tetracetyl-glucosido-3-cyan-pyridiniumbromid

berechnen sich 2,16 Mol $\left(\frac{22,0 \times 44,8 \times 760 \times 295,9}{515 \times 726 \times 273,2} = 2,16 \right)$.

Somit beträgt die H₂-Aufnahme 99% d. Th.

2) Lösung I: 108 mg Na₂S₂O₄ Lösung II: 21,6 mg Substanz
 330 mg NaHCO₃ 20 mg NaHCO₃
 5 cm³ Wasser 0,6 cm³ Wasser

Temperatur 22,1°, Druck 736 mm. Reaktionsgefäß gefüllt mit CO₂.

Entwickelte Menge CO₂ 1,52 cm³
 Retention 0,48 cm³
 Gesamtes in Freiheit gesetztes CO₂ . . . 2,00 cm³ (22,1°, 736 mm)

Berechnet bei einer Wasserstoffaufnahme von 1 Mol 2,09 cm³ CO₂

$\left(\frac{21,6 \times 44,8 \times 760 \times 295,3}{515 \times 734 \times 273,2} = 2,09 \right)$.

Die H₂-Aufnahme betrug 96% d. Th.

N-l-Arabinosido-o-dihydro-nicotinsäure-amid.

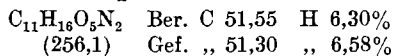
10 g Nicotinsäure-amid wurden in 100 cm³ Dioxan heiss gelöst, die Flüssigkeit auf 35° abgekühlt und sodann bei dieser Temperatur 28,5 g Acetobrom-*l*-arabinose fest eingetragen. Diese löste sich leicht auf. Das Reaktionsgemisch blieb hierauf über Nacht bei 30° stehen. Am nächsten Morgen hatte sich ein Krystallbrei abgeschieden, der abgenutscht und mit Dioxan ausgewaschen wurde. Er erwies sich als nahezu reines Nicotinsäure-amid-bromhydrat.

¹⁾ Der etwas tiefe C-Gehalt rührt wahrscheinlich von einer kleinen Beimengung Nicotinsäure-nitril-bromhydrat her, das sich als Zersetzungsprodukt bildet.

Das Dioxan-Filtrat haben wir im Vakuum eingedampft, den Rückstand im Mörser mit Äther zerrieben, hierauf je 2 Mal mit Äther und Benzol ausgekocht und schliesslich in wenig absolutem Alkohol gelöst. Beim Stehen dieser Lösung in Kältemischung schied sich ein Öl ab (N), von dem man die Flüssigkeit abgoss; letztere wurde im Vakuum völlig verdampft, wobei ein öliger Rückstand (R) zurückblieb.

Die beiden Fraktionen N und R enthalten das 3-Carbonsäureamid des N-Triacetyl-arabinosido-pyridiniumbromids; wenn man Proben der Fraktionen in wässriger Natriumbicarbonatlösung aufnimmt und Hyposulfit hinzusetzt, so tritt die für solche Pyridiniumsalz-Reduktionen charakteristische gelbe, unbeständige Färbung auf.

Zum Zweck der Reduktion wurden daher die beiden Rückstände N und R in je 75 cm³ Wasser getrennt gelöst und je 3 g Natriumbicarbonat und 3 g Natriumhyposulfit eingetragen. Die filtrierte Lösung blieb über Nacht stehen. Es hatte sich dann eine kleinere Menge eines viscosen Öls abgeschieden, in welchem das rohe N-Triacetyl-arabinosido-o-dihydro-nicotinsäure-amid vorlag; eine weitere Menge liess sich der wässrigen Flüssigkeit mittels Chloroform entziehen. Da wir das Produkt noch nicht krystallisieren konnten, haben wir es mit alkoholischem Ammoniak bei Zimmertemperatur verseift (ca. 8stündige Einwirkung), das Lösungsmittel hierauf im Vakuum verdampft und den Rückstand in wenig siedendem 95-proz. Alkohol gelöst. Beim Erkalten schied sich das N-l-Arabinosido-o-dihydro-nicotinsäure-amid mikrokrySTALLIN aus; zur weiteren Reinigung haben wir es aus 90-proz. kochendem Alkohol umgelöst.



N-d-Xylosido-o-dihydro-nicotinsäure-amid.

Diese Verbindung erhielten wir wie das vorbeschriebene analoge l-Arabinosederivat. Da die Darstellungsbedingungen noch verbessert werden müssen und die Substanz auch noch nicht ganz rein vorliegt, möchten wir eine ausführlichere Beschreibung auf später verschieben. Die Verbindung wirkt gegenüber Silbernitrat in der Hitze reduzierend. In alkalischer, wässriger Lösung zeigt sie das Absorptionsmaximum 340 m μ ; Säurezusatz bringt auch hier diese Bande zum Verschwinden, während eine neue bei 280 m μ erscheint.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.