

CHROM. 4851

Galenik der Vitamine

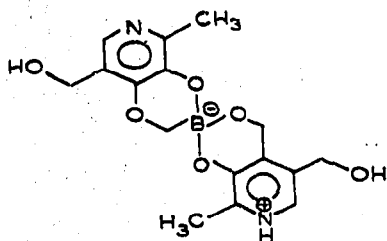
21. Mitt. Dünnschichtchromatographische Strukturaufklärung des Pyridoxol-Borsäure-Komplexes*

Pyridoxol bildet mit Borsäure einen Komplex¹, der für die Gewinnung, Analyse und Verarbeitung des Vitamins Bedeutung besitzt. Der Wirkstoff kann in Form dieses Komplexes aus Rohmaterial isoliert und rein dargestellt werden².

Am häufigsten wird die Komplexbildung zur Bestimmung des Pyridoxols herangezogen³. In Gegenwart von Borsäure verläuft die Farbreaktion des Pyridoxols mit 2,6-Dichlorchinonchlorimid⁴ negativ. Pyridoxal und Pyridoxamin (sowie weitere störende Phenole) reagieren unter diesen Bedingungen dagegen unverändert positiv. Dadurch kann Pyridoxol quantitativ neben anderen Komponenten des Vitamins B₆ erfasst werden. Da der positive Verlauf der Farbreaktion voraussetzt, dass am aromatischen bzw. quasiaromatischen Ringsystem eine phenolische Hydroxylgruppe und ein in *p*-Stellung dazu unsubstituiertes C-Atom vorliegen, wird die analytische Reaktivität des Pyridoxols im Borsäure-Komplex wahrscheinlich durch Blockierung dieser Phenolfunktion aufgehoben.

Daneben ist das Verhalten des Pyridoxols in Gegenwart der Borsäure auch für die Arzneimitteltechnologie von Interesse. Unter bestimmten Bedingungen bilden sich in Pyridoxollösungen bekanntlich schwerlösliche dimere oder trimere Derivate⁵. Nach Zugabe von Borsäure erfolgt jedoch selbst beim Erhitzen unter ungünstigen pH-Verhältnissen keine Polymerisation. Borsäure erweist sich als ein Stabilisator dieser Zersetzungsreaktion¹. Da die Polymerisation unter Beteiligung der 4-Hydroxymethylgruppe des Pyridoxols verläuft⁵⁻⁹, kann man auf Grund der Beobachtung weiterhin annehmen, dass auch diese Funktion bei der Komplexbildung beansprucht wird.

Die beiden Reaktivitätsänderungen am Pyridoxolmolekül verweisen somit darauf, dass sich der Borsäure-Komplex unter Beteiligung der phenolischen und der benachbarten primären Hydroxylgruppe bildet. Nach den ersten Untersuchungen werden dabei zwei Moleküle Pyridoxol an ein Molekül Borsäure gebunden¹.



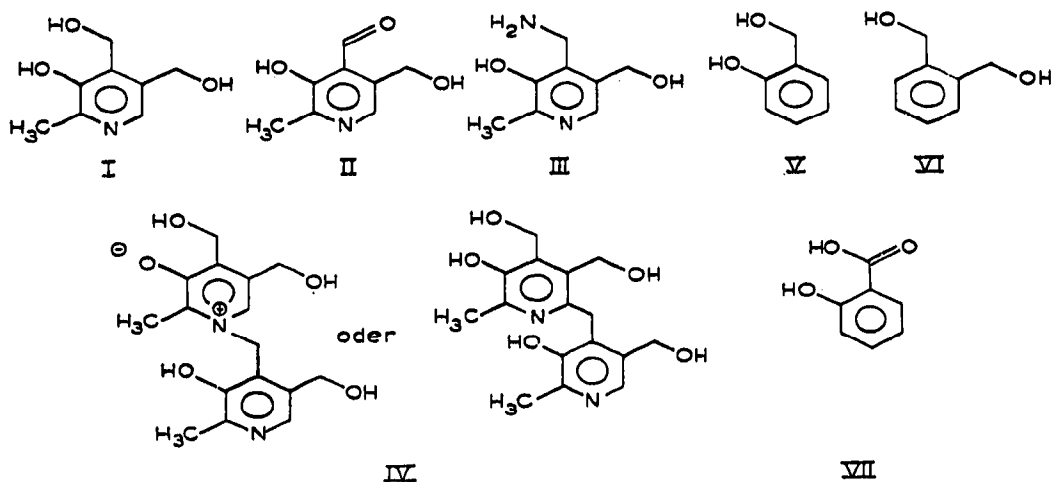
Diese Struktur wurde später auch bei der Darstellung analoger Komplexe vorausgesetzt¹⁰⁻¹². Einige Unklarheiten in der Literatur führten dazu, die Problematik erneut zu bearbeiten¹³. Obgleich aus den Ergebnissen eine Bestätigung der angenommenen Konstitution hervorgegangen ist, haben wir unsere gleichzeitig begonnenen Arbeiten fortgeführt. Wir versuchten, bei der Klärung der Frage eine Methodik an-

* 20. Mitt.: *Pharmazie*, 24 (1969) 761.

zuwenden, die auch für die Strukturaufklärung anderer phenolischer Verbindungen^{14,15} als Modell dienen kann.

Aus papierchromatographischen Untersuchungen war bekannt, dass Borsäure-Komplexe geringere Polarität und höhere R_F -Werte als die Ausgangsverbindungen besitzen. Die Änderung des R_F -Werts stellt einen Masstab für die Anzahl der zur Komplexbildung fähigen Funktionen dar¹⁶. Es war zu erwarten, dass sich auch in der Dünnschichtchromatographie eine Komplexbildung durch eine signifikante Verschiebung der Laufstrecke nachweisen lässt. In Gegenwart von Borsäure mussten sich die reagierenden von den nichtreagierenden Verbindungen unterscheiden lassen. Wir versuchten, den Effekt nicht nur an Kieselgel G Schichten zu beobachten, sondern auch Polyamid als Sorbent einzusetzen und dadurch die selektive Adsorption bzw. Trennfunktion des Polyamids gegenüber Phenolen auszunutzen¹⁷⁻¹⁹. Wir nahmen an, dass bei Verwendung von Polyamid die Maskierung der für die Sorption massgebenden (phenolischen) Funktion besonders deutlich hervortritt.

Bei der Komplexbildung zwischen Pyridoxol und Borsäure war zu entscheiden, ob die Borsäure an den beiden alkoholischen Gruppen oder an einer alkoholischen und einer phenolischen Funktion angreift. Wir ermittelten daher den Einfluss der Borsäure auf den R_F -Wert folgender Verbindungen:



Die Chromatographie wurde jeweils an normalen Kieselgel-G- bzw. Polyamid-schichten und vergleichsweise an Schichten mit einem Zusatz von 5% bzw. 2% Borsäure durchgeführt. Die Entwicklung der zu vergleichenden Chromatogramme erfolgte in demselben Gefäss, so dass übereinstimmende Bedingungen vorlagen^{19,20}. Zur Detektion dienten der Zusatz eines Fluoreszenzindikators und die Betrachtung im UV-Licht oder das Besprühen mit einer 1% wässrigen 2,6-Dichlorchinonchlorimid-Lösung.

An Kieselgel G wurden die in Tabelle I zusammengestellten Ergebnisse erlitten. Die Werte stellen Mittelwerte aus mindestens drei, im allgemeinen fünf Bestimmungen dar.

Die Gegenüberstellung zeigt, dass von den Komponenten des Vitamin-B₆-Komplexes erwartungsgemäss nur Pyridoxol durch Borsäure eindeutig beeinflusst wird. Eine wesentliche Änderung des chromatographischen Verhaltens bewirkt Borsäure ausserdem bei Salicylalkohol, Phthalylalkohol und Salicylsäure. Folglich verhalten sich Pyridoxal und Pyridoxamin gegenüber Borsäure indifferent, die übrigen Verbindungen reagieren evtl. unter Komplexbildung. Ein Hinweis auf die Struktur

TABELLE I

CHROMATOGRAPHIE AN KIESELGEL-G-SCHICHTEN

Fließmittel A = Wasser; Fließmittel B = Aceton-Dioxan-25% Ammoniaklösung (45 : 45 : 10).

	<i>hR_F-Werte</i>			
	<i>Fließmittel A</i>		<i>Fließmittel B</i>	
	—	<i>Borsäure</i>	—	<i>Borsäure</i>
Pyridoxol (I)	49	0	41	0
Pyridoxal (II)	42	42	54	45
Pyridoxamin (III)	21	20	56	45
Salicylalkohol (V)	87	54	82	13
Phthalylalkohol (VI)	—	—	81	48
Salicylsäure (VII)	100	68	45	30

des Pyridoxol-Borsäure-Komplexes kann aus diesen Ergebnissen nicht abgeleitet werden.

Wir führten daher gleiche Untersuchungen am Polyamidschichten durch. Nach einer allgemeinen Regel kommen Unterschiede in der Sorption eines Phenols an Polyamid nur dann voll zur Geltung, wenn zwischen stationärer und mobiler Phase ein möglichst grosser Polaritätsunterschied besteht, die Substanzen im Fließmittel nicht zu gut löslich sind und die Verdrängungswirkung des Fließmittels in bezug auf die zu untersuchenden Substanzen mittlere Stärke besitzt¹⁸. Hydrophobe Lösungsmittelkomponenten erhöhen die Affinität eines Phenols zum Polyamid. Die gleichen Substanzen wurden deshalb erneut in weniger polaren Systemen untersucht. Die mit dem Fließmittel Cyclohexan-Äthanol (50 : 50) erzielten Ergebnisse gehen aus Tabelle II hervor.

Da in der Papierchromatographie ein stärkerer Einfluss des pH-Wertes auf das Verhalten der Vitamin-B₆-Komponenten nachgewiesen worden ist²¹, berücksichtigten wir ausserdem die Einstellung der Wasserstoffionenkonzentration. Die Polyamid-Suspensionen mit 2% Borsäure besaßen pH 3.6. Die borsäurefreien Ver-

TABELLE II

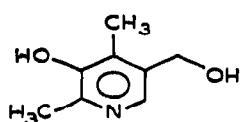
CHROMATOGRAPHIE AN POLYAMID-SCHICHTEN

Fließmittel: Cyclohexan-Äthanol (5 : 5).

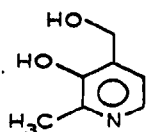
	<i>hR_F-Werte</i>		
	<i>Ohne Imprägnierung</i>	<i>Mit Puffer</i>	<i>Mit Borsäure</i>
Pyridoxol (I)	83	88	54
Pyridoxal (II)	90	86	83
	64	66	62
Pyridoxamin (III)	42	49	34
Dimeres Pyridoxol (IV)	77	79	25
Salicylalkohol (V)	77	77	57
Phthalylalkohol (VI)	88	87	84
Salicylsäure (VII)	24	22	20

gleichsplatten wurden deshalb durch Anwendung eines Natriumacetat-Natriumhydroxid-Puffers auf den gleichen pH-Wert eingestellt.

Tabelle II lässt erkennen, dass in Gegenwart von Borsäure der hR_F -Wert der Verbindungen Pyridoxol, dimeres Pyridoxol und Salicylalkohol (*o*-Methylol) deutlich herabgesetzt wird. Für die Beeinflussung ist folglich neben einer primären Hydroxylgruppe eine β -ständige phenolische Hydroxylgruppe erforderlich. An die gleichen strukturellen Voraussetzungen ist die Komplexbildung mit Borsäure gebunden. Damit wird die bisher angenommene Struktur des Pyridoxol-Borsäure-Komplexes erneut bestätigt. Einen analogen Komplex bildet dimeres Pyridoxol. Von den beiden Wirkungsantagonisten des Pyridoxols (Antivitaminen), Desoxypyridoxol (VIII) und 5-Desoxymethyl-pyridoxol (IX)²², besitzt Verbindung IX die für die Komplexbildung erforderlichen Funktionen. Die Wechselwirkung zwischen Phthalylalkohol bzw. Salicylsäure²³ und Borsäure tritt an Polyamidschichten mit nur 2% Borsäure nicht hervor.



VIII



IX

Die Borsäure-Komplexe erreichen in beiden Systemen niedrigere hR_F -Werte als die freien Verbindungen. Für diesen Effekt kommt die Änderung der Molekülgröße in Betracht. Durch Komplexbildung mit Borsäure wird das Molekulargewicht der organischen Komponenten etwa verdoppelt. An Polyamidschichten ist ausserdem die Maskierung der Phenolfunktion von Bedeutung.

Durch das Ergebnis wird erneut deutlich, dass sich die drei elektronenspendenden Substituenten des π -Mangel-Heteroaromaten Pyridoxol nicht gleichwertig verhalten. Die Sauerstofffunktionen in 3- und 4-Stellung sind durch erhöhte Reaktivität ausgezeichnet. So wie im Falle der Komplexbildung werden bekanntlich auch bei der Acetalisierung²⁴⁻²⁶ und Acylierung²⁷⁻²⁹ bevorzugt die Hydroxylgruppen in Position 3 und 4 umgesetzt, obgleich die Bildung von 4,5-Derivaten oder 3,4,5-Derivaten (Triacylaten) durchaus möglich ist.

Für die Untersuchung fanden Verwendung: Kieselgel-G- und Polyamid-Pulver Merck, Polyamid Woelm DC und Leuchtstoff Grün Woelm (Detektion im UV-Licht). Phthalylalkohol wurde über Xylylendibromid nach STEPHENSON³⁰ dargestellt.

Herrn U. OLTHOFF danke ich für die Herstellung dieser Vergleichsverbindung. Herrn H. THIEME, Universität Leipzig, schulde ich Dank für die Überlassung einer Probe Saligenin (Salicylalkohol). Frau M. DINGLER bin ich für die Hilfe bei der Durchführung der chromatographischen Arbeiten zu Dank verpflichtet.

Wissenschaftliche Laboratorien des
VEB Jenapharm, Jena (D.D.R.)

R. HÜTTENRAUCH

1 J. V. SCUDI, W. A. BASTEDO UND T. J. WEBB, *J. Biol. Chem.*, 136 (1940) 399.

2 M. L. BROWN, *U.S. Pat.*, 2,442,677 (1947).

3 M. HOCHBERG, D. MELNICK UND B. L. OSER, *J. Biol. Chem.*, 155 (1944) 109.

4 J. V. SCUDI, H. F. KOONES UND J. C. KERESZTESY, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 43 (1940) 118.

- 5 S. A. HARRIS, *J. Am. Chem. Soc.*, 63 (1941) 3363.
- 6 R. HÜTTENRAUCH, *Pharmazie*, 21 (1966) 493.
- 7 R. HÜTTENRAUCH UND R. TÜMLER, *Pharmazie*, 22 (1967) 561.
- 8 R. HÜTTENRAUCH UND U. ZAHN, *Arch. Pharm.*, 300 (1967) 385.
- 9 E. E. HARRIS, J. L. ZABRISKIE, E. M. CHAMBERLIN, J. P. CRANE, E. P. PETERSON UND W. REUTER, *J. Org. Chem.*, 34 (1969) 1993.
- 10 F. J. WECK, *U.S. Pat.*, 3,111,383 (1963).
- 11 D. R. STERN UND F. J. WECK, *U.S. Pat.*, 3,266,981 (1966).
- 12 F. J. WECK, *U.S. Pat.*, 3,297,737 (1967).
- 13 H. J. ROTH UND K.-H. SURBORG, *Arch. Pharm.*, 301 (1968) 646.
- 14 O. DIMROTH, *Ann. Chem.*, 446 (1926) 97.
- 15 H. J. ROTH, *Deut. Apotheker-Ztg.*, 103 (1963) 520.
- 16 L. HÖRHAMMER, H. WAGNER UND K. MACEK, *Chromatog. Rev.*, 9 (1967) 103.
- 17 H. WAGNER, L. HÖRHAMMER UND K. MACEK, *J. Chromatog.*, 31 (1967) 455.
- 18 B. ZAWTA UND W. HÖLZEL, *Pharmazie*, 23 (1968) 174, 236, 296.
- 19 E. STAHL (Herausgeber), *Dünnschicht-Chromatographie*, 2. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, 1967.
- 20 K. MACEK UND Z. J. VEJDELEK, *Nature*, 176 (1955) 1173.
- 21 W. R. GUSTAVSON, G. LEDIN, JR. UND A. FURST, *J. Chromatog.*, 24 (1966) 288.
- 22 W. A. SEXTON, *Chemische Konstitution und Biologische Wirkung*, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., 1958.
- 23 F. HEIN, *Chemische Koordinationslehre*, H. Hirzel Verlag, Leipzig, 1950.
- 24 J. BADDILEY UND A. P. MATHIAS, *J. Chem. Soc.*, (1952) 2583.
- 25 A. COHEN, *J. Chem. Soc.*, (1952) 4384.
- 26 W. KORYTNYK, *J. Org. Chem.*, 27 (1962) 3724.
- 27 F. A. KUMMEROW UND T. SAKURAGI, *J. Am. Chem. Soc.*, 78 (1956) 839.
- 28 K. KOBAYASHI UND H. OHTA, *DAS I* 296 140 (1962).
- 29 W. KORYTNYK UND B. PAUL, *J. Org. Chem.*, 32 (1967) 3791.
- 30 E. F. M. STEPHENSON, *Org. Synth.*, 34 (1954) 100.

Eingegangen am 8. Dezember 1969; geänderte Fassung am 3. Juni 1970

J. Chromatog., 51 (1970) 330-334

CHROM. 4847

Argentation thin-layer chromatography with silver oxide

I. Separation of pyridine homologues*

During the last few years argentation TLC, initially developed for lipid separation, has found extensive use in the separation of fatty acids, neutral lipids, phenylhydrazones of aldehydes and ketones, and several classes of unsaturated compounds, capable of complexing the silver ion (for a good review see ref. 1). Argentation chromatography has also been used for column and GLC separations. AgNO_3 is the main compound, but not the only one¹, used and the principle of true argentation chromatography is the complexation of the olefinic bond with silver ions².

We have tried to extend argentation TLC to pyridine and other nitrogen heterocyclics that are known to complex silver ions giving crystalline complexes³⁻⁵ with both AgNO_3 and AgClO_4 . Some nitrates^{4,6} are soluble in CHCl_3 and other organic solvents, and some of the heterocyclic bases give complexes with a 3:1 proportion of

* This work was supported by a grant from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

J. Chromatog., 51 (1970) 334-338