

Zum Reaktionsmechanismus von Glutaraldehyd mit Proteinen**

Rainer Lubig¹, Peter Kusch, Karin Röper* und Helmut Zahn

Deutsches Wollforschungsinstitut, RWTH Aachen,
D-5100 Aachen, Bundesrepublik Deutschland

(Eingegangen 3. März 1981. Angenommen 17. März 1981)

On the Mechanism of Protein Crosslinking with Glutaraldehyde

The interaction of glutaraldehyde with model aliphatic amines was studied in order to understand the crosslinking reaction of glutaraldehyde with proteins. The reaction in organic solvents gave N-alkyl-1,4-dihydropyridines and N,N'-dialkyl-1,5-diiminopentanes. The isolated products are new or were previously described by us for the first time¹. Hydration of the reaction products led to stable N-alkylpiperidines and N,N'-dialkyl-1,5-diaminopentanes. In aqueous solution the reaction depends on the *pH*: at a *pH* above 7, N-alkyl-1,4-dihydropyridines and at a *pH* below 7, polymers were obtained. For the crosslinking reaction of proteins with glutaraldehyde the following mechanism is proposed: Monomeric glutaraldehyde reacts with the protein to give intermediate N-alkyl-2,6-dihydroxypiperidines. Intramolecular dehydration leads to the corresponding N-alkyl-1,4-dihydropyridines. Condensation of the cyclic monohydrate of glutaraldehyde and N-alkyl-2,6-dihydroxypiperidines gives linear polymeric crosslinks containing α -oxo-N-alkylpiperidine units.

(Keywords: Crosslinking mechanism; N-Alkyl-1,4-dihydropyridines; N,N'-Alkyl-1,5-diiminopentanes)

Einleitung

Glutaraldehyd ist ein hervorragendes Quervernetzungsmittel für Proteine^{2,3} und gewinnt zunehmend an wissenschaftlicher sowie wirtschaftlicher Bedeutung. Die wichtigsten Anwendungsgebiete sind die Ledergerbung, die Fixierung von Proteinen, Zellen und biologischen Geweben für Struktur- und Funktionsforschung in der Cyto-, Histo- und Immunochemie sowie die chemische Desinfektion und Sterilisa-

** Georg Manecke zum 65. Geburtstag gewidmet.

tion. Auf die Vielzahl der Anwendungsmöglichkeiten des Glutaraldehyds kann in diesem Zusammenhang nicht näher eingegangen werden. Es sei daher auf einige ausführliche Übersichtsartikel hingewiesen⁴⁻⁷.

In wäßrigen Lösungen steht der monomere lineare Glutaraldehyd im Gleichgewicht mit drei hydratisierten linearen bzw. cyclischen Formen⁸. Ferner werden unterschiedliche oligomere und polymere Formen beschrieben, die auf Aldolkondensationsreaktionen⁹⁻¹² bzw. auf wasserkatalysierte Polymerisationsreaktionen¹³ des Glutaraldehyds zurückzuführen sind. Die chemische Uneinheitlichkeit des Glutaraldehyds erklärt die komplexen Reaktionsmöglichkeiten mit Proteinen. Trotz einer Vielzahl von Beiträgen verschiedener Autoren konnte der Mechanismus der Quervernetzungsreaktion von Proteinen mit Glutaraldehyd bisher nicht endgültig aufgeklärt werden. Es gilt jedoch als sicher, daß die Reaktion an den *n*-Butylaminoseitengruppen der Lysinreste erfolgt^{14, 15}. *Richard* und *Knowles*⁹ schlagen als quervernetzende Spezies α, β -ungesättigte Aldehyde vor, die mit freien Aminogruppen von Proteinen *Michael*-Addukte bilden. *Monsan*¹¹ postuliert *Schiffsche* Basen als Reaktionsprodukte, die auf Grund konjugierter Doppelbindungen gegen Säureeinwirkung stabil sein sollen. Nach jüngsten Arbeiten von *Branner-Jorgensen*¹⁶ ist die Quervernetzung von Proteinen durch Glutaraldehyd lediglich auf die Ausbildung von *Schiffschen* Basen zurückzuführen. Die hohe Reaktivität des Glutaraldehyds erklärt sich durch Solvatationseffekte, günstige Kettenlänge zur Ausbildung intermolekularer Querbrücken und die mögliche Stabilisierung durch cyclische Monohydrate des Glutaraldehyds.

Hardy et al.¹⁷ führten Modellreaktionen durch Umsetzung von α -Acetyl-lysin und 6-Aminohexansäure mit Glutaraldehyd durch und erhielten tetra-substituierte Pyridiniumsalze analog der Struktur des Desmosins, das als natürliches Crosslink in Elastinhydrolysaten nachgewiesen wurde¹⁸. Mit der Isolierung von Anabilysin und 1-(5-Amino-5-carboxypentyl)-pyridiniumchlorid aus glutaraldehydvernetztem Ovalbumin^{19, 20} gelang ihnen zum erstenmal der direkte Nachweis von Glutaraldehyd-Crosslinks. Primär entstehen aus Lysinseitenketten und monomerem Glutaraldehyd *Schiffsche* Basen. Cyclisierung, Dehydratisierung und Isomerisierung führen zu N-alkylierten Pyridiniumverbindungen²¹. Die Quervernetzung von Proteinen durch Glutaraldehyd ist offensichtlich auf eine Vielzahl von verschiedenen Reaktionen zurückzuführen. Diese Annahme wird durch Arbeiten von *Heidemann* et al. bestätigt²².

Die von *Lubig*¹ beschriebenen Ergebnisse sollen zur weiteren Aufklärung des komplexen Quervernetzungsmechanismus bei der Umsetzung von Proteinen mit Glutaraldehyd beitragen.

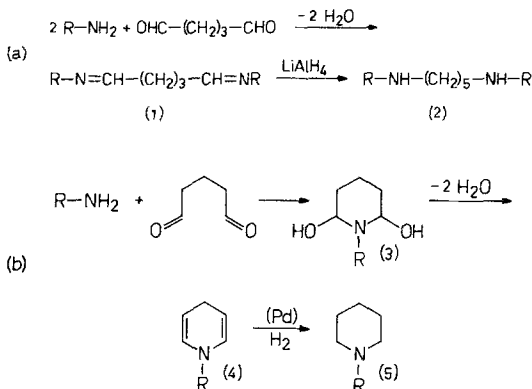
Spätere Arbeiten von *Ford*²³ führten zu ähnlichen Ergebnissen.

Ergebnisse und Diskussion

Bowes und *Cater*²⁴ sowie *Korn et al.*²⁵ hatten bereits gezeigt, daß es äußerst schwierig ist, einheitliche Reaktionsprodukte bei der Umsetzung von Peptidmodellen bzw. Aminosäuren mit Glutaraldehyd zu isolieren. Eigene Versuche mit N²-Acetyl-lysinmethyramid und N²-Carbobenzoxy-lysin waren ebenfalls erfolglos. Um die Reaktion mit der

n-Butylaminoseitenkette des Lysins zu untersuchen, wurden daher einfache aliphatische Amine für die Umsetzung herangezogen.

Wegen der einfacheren Reaktionsführung wurde zunächst in organischen Lösungsmitteln gearbeitet. Je nach den Reaktionsbedingungen konnten *N,N'*-Dialkyl-1,5-diiminopentane (**1**) und *N*-Alkyl-1,4-dihydropyridine (**4**) isoliert werden. Durch Hydrieren wurden die dargestellten Verbindungen in die *N,N'*-Dialkyl-1,5-diaminopentane (**2**) bzw. *N*-Alkylpiperidine (**5**) überführt (s. Reaktion a und b).



Die Identifizierung der Reaktionsprodukte erfolgte durch Elementaranalyse, Derivatisierung und durch spektroskopische sowie chemische Methoden. Im Falle der *N,N'*-Dialkyl-1,5-diiminopentane handelt es sich um neue, bei den *N*-Alkyl-1,4-dihydropyridinen um erstmals beschriebene Verbindungen, die später von anderen Autoren ebenfalls durch Umsetzung von Glutaraldehyd mit primären Aminen²³ bzw. auf anderem Wege erhalten wurden^{26, 27}. Die Umsetzung von Glutaraldehyd mit primären Aminen liefert in Gegenwart von reduzierenden Verbindungen *N*-Alkylpiperidine^{28, 29}.

Die isolierten *N,N'*-Dialkyl-1,5-diiminopentane sind in Tab. 1 aufgeführt. Die instabilen Produkte konnten lediglich mit Ausbeuten von 2—3% isoliert werden und wurden nach Reduktion und Überführung in die Dihydrochloride analysiert (s. experimenteller Teil).

Die dargestellten *N*-Alkyl-1,4-dihydropyridine sowie die dazugehörigen Werte der Elementaranalysen sind in Tab. 2 aufgeführt. Die Analysenwerte der Derivate sowie die spektroskopischen Daten sind im experimentellen Teil angegeben.

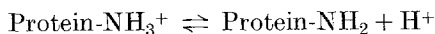
Die dargestellten Verbindungen dienen als Vergleichssubstanzen bei den Untersuchungen in wässrigen Lösungen. Durch dünnschichtchromatographische Methoden konnten in wässrigen Lösungen keine bifunktionellen *Schiffschen* Basen nachgewiesen werden. Für die Um-

setzung von Aminen mit Glutaraldehyd in wäßrigen Lösungen ergab sich eine Abhängigkeit des Reaktionsverlaufs vom pH -Wert. Unterhalb pH 7 wurde die Bildung von Polykondensaten beobachtet. Mit Hilfe von Elementaranalysen konnte gezeigt werden, daß die Polymere durch intermolekulare Wasserabspaltung der primär gebildeten Dihydroxypiperidine (**3**) entstehen und aus α -Oxo-N-alkylpiperidinstruktur-einheiten (**8**) bestehen. Oberhalb pH 7 erfolgt intramolekulare Wasserabspaltung. Die dabei entstehenden Dihydropyridinringsysteme (**4**) können auf Grund ihrer hohen Instabilität nicht als Endstufe der Reaktion von Glutaraldehyd mit NH_2 -Gruppen in Proteinen angesehen werden. Ihr chemisches Verhalten wurde in Anlehnung an Arbeiten von *Panouse*³⁰ sowie *Karrer et al.*³¹ untersucht. Sie wurden anhand ihrer reduzierenden Wirkung gegenüber Silbernitrat nachgewiesen. Dabei entstehen die entsprechenden Pyridiniumverbindungen, die als Eisen-(III)-chlorid-Doppelsalz identifiziert werden konnten.

In Gegenwart von Luftsauerstoff zersetzen sich die Verbindungen schnell zu braun-roten Produkten. Charakteristisch ist die Rotfärbung bei Einwirkung von HCl-Gas. Hierbei bilden sich wahrscheinlich Dipyridyl-derivate, die von *Karrer et al.*³² als Chinhydrone gedeutet werden.

Unterschiedlich ist das Verhalten der N-Alkyl-1,4-dihydropyridine gegenüber Säuren. Durch Einwirkung konzentrierter Säuren erfolgt sofortige Zersetzung, wobei nur ein Teil des zur Synthese eingesetzten Amins zurückgespalten wird. Schonende Behandlung mit Säuren bei pH 3 führt zu Pyridiniumverbindungen.

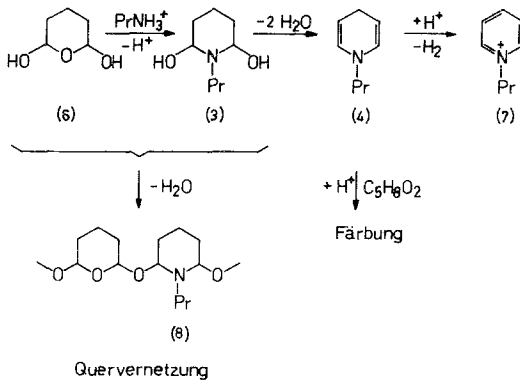
Nimmt man eine Analogie in den Reaktionsweisen der Aminogruppen aliphatischer Amine und den Aminogruppen im Protein an, so ist festzustellen, daß bei allen Proteinmodifizierungen mit Glutaraldehyd pH -statisch gearbeitet werden muß. Der Grund hierfür liegt darin, daß sich das folgende Gleichgewicht während der Umsetzung der Aminogruppen nach rechts verschiebt:



Durch die freiwerdenden Protonen werden die primär gebildeten Reaktionsprodukte so verändert, daß sich farbige Produkte bilden. Da diese farbigen Produkte vornehmlich auf die Zersetzung des Dihydropyridinringsystems zurückzuführen sind, sollte zur Vermeidung einer Anfärbung möglichst im schwach sauren pH -Bereich gearbeitet werden.

Auf Grund der Ergebnisse der durchgeführten Modellreaktionen schlagen wir für die Fixierung von Proteinen mit Glutaraldehyd folgenden Reaktionsmechanismus vor: Monomerer Glutaraldehyd, der im Gleichgewicht mit dem cyclischen Monohydrat (**6**) steht⁸, reagiert in

wäßrigen Lösungen mit den *n*-Butylaminoseitenketten des Proteins intermediär zu *N*-Alkyl-2,6-dihydroxypiperidinen (**3**), welche dann in Abhängigkeit vom *pH*-Wert durch intramolekulare Wasserabspaltung in die entsprechenden *N*-Alkyl-1,4-dihydropyridine (**4**) übergehen bzw. durch intermolekulare Wasserabspaltung Polykondensate mit α -Oxo-*N*-alkylpiperidineinheiten (**8**) bilden.



Es ist anzunehmen, daß der von uns vorgeschlagene Reaktionsmechanismus nur eine von vielen möglichen Umsetzungen zwischen Glutaraldehyd und Proteinen beschreibt. Die Isolierung von *N*-alkylierten Pyridiniumstrukturen durch *Hardy* et al.¹⁹⁻²¹ bestätigt unsere Ergebnisse. Stöchiometrische und reaktionskinetische Studien bei der Umsetzung von aliphatischen Aminen bzw. Modellproteinen lieferten andere Ergebnisse als die Umsetzung mit Proteinen. *Blauer* et al.³³ sowie *Ford*²³ bezweifeln daher den Modellcharakter solcher Reaktionen. Die reaktionskinetischen Abweichungen sind wahrscheinlich auf die komplexen Reaktionsweisen des Glutaraldehyds zurückzuführen. Für die Gesamtheit der Quervernetzungsreaktion gibt es offensichtlich kein Modell, sie kann nur durch die Umsetzung von natürlichen Proteinen mit Glutaraldehyd beschrieben werden.

Dank

Wir danken dem Minister für Wissenschaft und Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen für die Ermöglichung der vorliegenden Arbeit. Ferner danken wir dem Verband der Chemischen Industrie und speziell der Firma Naturin-Werk Becker & Co., Weinheim, für die Unterstützung unserer Forschung.

Experimenteller Teil

Darstellung von kristallinem Glutaraldehyd

Kommerzielle wäßrige Glutaraldehydlösungen wurden bis zur Sättigung mit Kochsalz versetzt. Die Isolierung des Glutaraldehyds erfolgte durch Perforation mit Diethylether. Nach Trocknung der etherischen Phase mit Calciumchlorid wurde das Lösungsmittel abgedampft. Die zurückbleibende sirupartige Flüssigkeit wurde unter Stickstoff im Hochvakuum fraktioniert. Beim Aufheizen wird der Glutaraldehyd thermisch depolymerisiert, daher muß zunächst auf 150 °C aufgeheizt werden. Zur Destillation reicht eine Temperatur von 100–120 °C aus. Die Hauptfraktion (Kp. 70 °C/6 mm Hg) wurde in einer

Tabelle 1. *N,N'*-Dialkyl-1,5-diiminopentane aus Glutaraldehyd und aliphatischen Aminen

Amin	Reaktionsprodukt	Kp. (°C/mm Hg)
Ethylamin	N,N'-Diethyl-1,5-diiminopentan	90/5
<i>n</i> -Propylamin	N,N'-Dipropyl-1,5-diiminopentan	64/2
<i>n</i> -Butylamin	N,N'-Dibutyl-1,5-diiminopentan	165/10
<i>n</i> -Hexylamin	N,N'-Dihexyl-1,5-diiminopentan	108/2

mit Aceton/Trockeneis gekühlten Vorlage aufgefangen. Bei der Destillation ist unter absolutem Ausschluß von Feuchtigkeit zu arbeiten. Bis zum Einsatz in die Synthese wurde der Aldehyd in der Kältemischung aufbewahrt.

Darstellung von N,N'-Dialkyl-1,5-diiminopentanen

Als Reaktionsapparatur diente ein Rundkolben mit Gaseinleitungsrohr, Rührer, Rückflußkühler und einem Verbindungsstück, auf das sich ein Kolben aufsetzen ließ. Im Kolben befanden sich 1,2 mol Amin. Unter Einleiten von Stickstoff wurde ein Kolben mit kristallinem Glutaraldehyd auf das Verbindungsstück gestülpt und beim Erwärmen an der Luft 0,6 mol Glutaraldehyd unter Rühren und Eiskühlung (Reaktionstemperatur 0 °C) zum Amin getropft. Nach erfolgter Zugabe wurde ca. 0,5 h gerührt und danach ebenfalls unter Kühlung KOH-Pulver zugegeben. Nach 1 h wurde die organische Phase abgetrennt, erneut mit KOH-Pulver versetzt und ca. 12 h unter Kühlung stehengelassen. Die Fraktionierung des getrockneten Materials erfolgte im Hochvakuum über KOH. Die erhaltenen Reaktionsprodukte sind in Tab. 1 aufgeführt. Die Identifizierung erfolgte durch Hydrierung und Überführung in die Hydrochloride.

Darstellung von N,N'-Dialkyl-1,5-diaminopentan-hydrochloriden

0,1 mol des N,N'-Dialkyl-1,5-diiminopentans wurden innerhalb von 15 min unter Rühren zu einer Lösung von 4 g LiAlH₄ in 200 ml wasserfreiem Diethylether unter Stickstoff hinzugesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 1 h wurde mit Wasser hydrolysiert. Danach wurde abzentrifugiert, der Niederschlag mit Diethylether gewaschen und die vereinigten etherischen Phasen über KOH

Tabelle 2. *N-Alkyl-1,4-dihydropyridine aus Glutaraldehyd und primären Aminen*

Reaktionsprodukt	MG (g)	Elementaranalyse (%)			Ausbeute (%)	Kp. (°C/mm Hg)	
		C	H	N			
N-Propyl-1,4-dihydropyridin	123,20	ber.	77,99	10,63	11,37	12,6	71—73/13
		gef.	77,12	10,72	10,96		
N-Butyl-1,4-dihydropyridin	137,22	ber.	78,77	11,01	10,20	39,5	74—76/8
		gef.	77,39	11,69	10,40		
N-Pentyl-1,4-dihydropyridin	151,25	ber.	79,40	11,33	9,27	44,6	77—80/7
		gef.	76,04	11,96	10,24		
N-Hexyl-1,4-dihydropyridin	165,28	ber.	79,93	11,58	8,49	61,4	77—82/6
		gef.	79,82	11,48	8,58		

 Tabelle 3. *N,N'-Dialkyl-1,5-diaminopentanhydrochloride*

Reaktionsprodukte		Elementaranalyse (%)				Fp. (°C)
		C	H	N	Cl	
N,N'-Diethyl-1,5-diamino- pentanhydrochlorid	gef.	46,89	10,18	12,14	30,70	259
	ber.	46,73	10,47	12,12	30,68	
N,N'-Dipropyl-1,5-diamino- pentanhydrochlorid	gef.	51,02	10,63	10,93	27,44	298
	ber.	50,96	10,89	10,89	27,35	
N,N'-Dibutyl-1,5-diamino- pentanhydrochlorid	gef.	54,40	11,02	9,86	24,76	297
	ber.	54,30	11,15	9,75	24,80	
N,N'-Dihexyl-1,5-diamino- pentanhydrochlorid	gef.	59,53	11,80	8,14	20,57	299
	ber.	59,50	11,70	8,15	20,70	

getrocknet. Durch Einleiten von HCl-Gas wurde das Hydrochlorid gefällt. Das Produkt wurde zunächst durch Lösen in Methanol und Eingießen der Lösung in Essigester umgefällt und anschließend in *n*-Propanol umkristallisiert. Die so erhaltenen Hydrochloride waren chromatographisch einheitlich (Dünnschichtchromatographie erfolgte an Kieselgel-G-Schichten mit *sec.* BuOH:HCOOH:H₂O < = 75:15:10). Die Identifizierung erfolgte durch Elementaranalyse und Schmelzpunktbestimmung. Die Versuchsergebnisse sind in Tab. 3 aufgeführt.

Darstellung von N-Alkyl-1,4-dihydropyridinen

In einem Dreihalskolben mit Rührer, Rückflußkühler, Wasserabscheider und zwei Tropftrichtern wurden 800 ml Cyclohexan zum Sieden erhitzt. Innerhalb 1 h wurden 0,15 mol Glutaraldehyd in 80 ml Cyclohexan sowie 0,15 mol Amin in 80 ml Cyclohexan gleichzeitig und mit gleicher Geschwindigkeit zugetropft. Die Lösung färbte sich gelblich und es wurden 3,5 ml Wasser abgeschieden. Um etwa vorhandene *Schiffsche* Basen zu hydrieren, wurde

LiAlH₄ zugesetzt. Die Lösung wurde unter Stickstoff abfiltriert und über NaOH getrocknet. Nach Abziehen des Lösungsmittels wurde im Vakuum unter Stickstoff fraktioniert. Die erhaltenen Reaktionsprodukte sowie die dazugehörigen Analysendaten finden sich in Tab. 2. Die spektroskopischen Daten sind im folgenden aufgeführt.

N-Hexyl-1,4-dihydropyridin:

IR: 3 050 m; 2950 s; 2900 s; 2800 s; 1680 s; 1610 s.

NMR (δ , ppm): 0,7—2,0 (m, 11 H); 2,75 (m, 2 H); 4,15 (m, 2 H); 5,6 (q, 2 H).

Tabelle 4. *N*-Alkyl-piperidiniumchloride

Reaktionsprodukt	Elementaranalyse (%)				Fp. (°C)	
	C	H	N	Cl		
N-Propyl-piperidiniumchlorid	gef.	57,43	10,99	8,92	22,48	—
	ber.	58,70	11,08	8,56	21,66	
N-Butyl-piperidiniumchlorid	gef.	60,91	11,02	7,98	20,14	267
	ber.	61,20	10,70	7,90	20,00	
N-Pentyl-piperidiniumchlorid	gef.	62,16	11,99	7,34	18,51	194
	ber.	62,64	11,57	7,30	18,50	
N-Hexyl-piperidiniumchlorid	gef.	63,72	12,14	6,88	17,26	196
	ber.	64,20	11,76	6,81	17,23	

Darstellung von N-Alkyl-piperidiniumchloriden

5 g N-Alkyl-1,4-dihydropyridin wurden in 300 ml Ethanol gelöst. Um das Reaktionsgemisch vor Oxidation zu schützen, wurden 0,5 g LiAlH₄ zugesetzt. Die Lösung wurde in einem Autoklaven unter Rühren bei 150 bar und Raumtemperatur hydriert. Als Katalysator diente feinverteilter Palladium. Nach der Hydrierung wurde vom Katalysator abfiltriert, das Filtrat nach dem Zersetzen des LiAlH₄ mit MgSO₄ getrocknet und nach Abziehen des Lösungsmittels aufgearbeitet. Das Reaktionsprodukt wurde durch Wasserdampfdestillation isoliert und durch Einleiten von HCl in das Hydrochlorid überführt. Weitere Reinigung erfolgte durch Umfällen in absolutem Diethylether, Sublimation im Hochvakuum und Umkristallisieren aus Essigsäureethylester. Die so erhaltenen Reaktionsprodukte waren chromatographisch einheitlich. Die dazugehörigen Analysenergebnisse sind in Tab. 4 aufgeführt.

Versuche zur Identifizierung von Schiffischen Basen in wäßriger Lösung

Glutaraldehyd und Hexylamin wurden in *pH*-Bereichen zwischen *pH* 2 und 10 in verschiedenen molaren Verhältnissen umgesetzt. Der Überschuß an Glutaraldehyd sowie die möglicherweise entstandenen Schiffischen Basen (N,N'-Dihexyl-1,5-diiminopentan) wurden mit NaBH₄ hydriert. Unter diesen Bedingungen lassen sich vorhandene Aminale nicht hydrieren. Durch Ansäuern der wäßrigen Reaktionslösung wurden die entstandenen N,N'-Dihexyl-1,5-diaminopentane in die Hydrochloride überführt und die Aminale in Aldehyd

und Amin zurückgespalten. Der freigesetzte Glutaraldehyd kann durch Wasserdampfdistillation isoliert werden. Der positive Nachweis von Glutaraldehyd im Wasserdampfdestillat war ein eindeutiger Beweis für die Bildung von Aminen aus Glutaraldehyd und Amin. Durch Zusatz von konzentrierter Natronlauge wurde alkalisch gemacht, die Amine wurden durch Wasserdampfdistillation isoliert und mit Diethylether extrahiert. In die etherische Phase wurde HCl-Gas eingeleitet. Der entstehende Niederschlag müßte sich theoretisch aus dem Hydrochlorid des (aus dem Amino zurückgespaltenen) Hexylamins und dem Hydrochlorid des N,N'-Dihexyl-1,5-diaminopentans zusammensetzen. Durch dünnschichtchromatographische Methoden konnte jedoch kein N,N'-Dihexyl-1,5-diaminopentan-hydrochlorid nachgewiesen werden. Die Bildung von α,ω -bifunktionellen Schiff'schen Basen aus Glutaraldehyd und Amin in wäßrigen Medien kann folglich ausgeschlossen werden, während der Nachweis von Aminen eindeutig verlief. Über die Bildung von monofunktionellen Schiff'schen Basen kann jedoch keine Aussage getroffen werden.

Versuche zur Identifizierung von N-Alkyl-1,4-dihydropyridinen in wäßrigen Lösungen

0,1 mol Hexylaminhydrochlorid wurden in 100 ml Wasser gelöst. Unter Einleiten von Stickstoff wurde kurz erhitzt, um aus der Reaktionslösung Spuren von Sauerstoff zu entfernen. Durch Zugabe von Natronlauge wurde der entsprechende *pH*-Wert eingestellt. Mit Hilfe eines Autotitrators wurden eine verdünnte Glutaraldehydlösung und 0,1 N Natronlauge so langsam zugetropft, daß der *pH*-Wert der Lösung immer konstant blieb. Das Ende der Reaktion war daran zu erkennen, daß keine Natronlauge mehr verbraucht wurde. Bei *pH*-Werten oberhalb von 8 schied sich ein leicht gelbliches Öl ab. Es wurde mit Diethylether extrahiert und die etherische Phase mehrmals mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen mit KOH wurde das Lösungsmittel abgedampft. Es blieb eine gelbliche Flüssigkeit zurück, die sich bei Zugabe von Säuren rot färbte und aus wäßrigen Silbernitratlösungen elementares Silber ausfällte. Nach Reaktion bei *pH*-Werten über 8 wurden die Produkte durch Eintropfen der Reaktionslösung in eine Mischung aus 10 g NaBH₄ und 400 ml Wasser hydriert. Es flockte ein gelber Niederschlag aus. Nach Stehenlassen über Nacht wurde das Polymere in Methylenchlorid aufgenommen, nach mehrfachem Waschen der organischen Lösung mit Wasser wurde durch Umfällen mit Diethylether gereinigt. Durch Einleiten von HCl-Gas in eine Methylenchloridlösung des Reaktionsproduktes wurden die Hydrochloride gefällt. Ein Teil des Reaktionsproduktes fiel als polymeres Harz an.

Die bei verschiedenen *pH*-Werten erhaltenen Reaktionsprodukte wurden durch Elementaranalyse untersucht. Die bei *pH*-Werten > 7 dargestellten Verbindungen hatten einen Sauerstoffgehalt von 2—3,2%, während die bei *pH*-Werten < 7 erhaltenen Produkte einen Sauerstoffgehalt von 7,5—8% aufwiesen.

Bei den Reaktionsprodukten, die oberhalb von *pH* 7 erhalten wurden und einen niedrigen Sauerstoffgehalt aufwiesen, hat vermutlich eine intramolekulare Wasserabspaltung zum Dihydropyridinring (4) stattgefunden, zumal auch eine Rotfärbung mit HCl-Gas und Fällung mit Silbernitrat eintrat. Die Reaktionsprodukte, die unterhalb von *pH* 7 erhalten wurden, hatten polymeren Charakter. Ferner lagen die Sauerstoffwerte in der Größenordnung, wie sie bei einer intermolekularen Wasserabspaltung zwischen N-Alkyl-2,6-dihydroxy-piperidinen (3) im Sinne einer Polykondensation erhalten werden.

Reaktionen und Eigenschaften der N-Alkyl-1,4-dihydropyridine

UV-Absorption: N-Alkyl-dihydropyridine sind stark reduzierend^{31, 32, 34} und gehen in wäßrigen Lösungen leicht in die Pyridiniumstufe über. Der Nachweis kann UV-spektroskopisch erfolgen. Dihydropyridine absorbieren bei 315 nm, Pyridiniumstrukturen bei 258 nm.

Reduktion von Silbernitrat: 1 g N-Alkyl-1,4-dihydropyridin wurde in Ethanol gelöst und zu einer wäßrigen Silbernitratlösung getropft. Es fiel elementares Silber aus. Danach wurde vom Niederschlag abfiltriert und im Filtrat auf einen Überschuß an Silbernitrat geprüft. Durch Zugabe von halbkonzentrierter Salzsäure wurde der Überschuß an Ag⁺ gefällt und erneut filtriert. Das UV-Spektrum des Filtrats war mit dem einer Pyridiniumverbindung identisch.

Reduktion von NaHSO₃: 1 g Hexyl-1,4-dihydropyridin wurde in wenig Alkohol gelöst und zu einer NaHSO₃-Lösung (*pH* 4) sehr langsam unter Rühren zugegeben. Die Lösung färbte sich im Augenblick des Zutropfens schwach rotviolett, wurde aber anschließend entfärbt. Das UV-Spektrum dieser Lösung war identisch mit dem einer N-Alkyl-pyridiniumverbindung.

Zersetzung durch Säureeinwirkung: Durch Zugabe von 6 N HCl zu einer alkoholischen N-Hexyl-1,4-dihydropyridinlösung schied sich ein braunroter Niederschlag ab. Der Stickstoffwert des Niederschlags deutete darauf hin, daß nicht das gesamte Hexylamin zurückgespalten wurde. Durch dünnschichtchromatographische Untersuchung des Filtrats konnte gezeigt werden, daß ein anderer Teil des Hexylamins aus dem Dihydropyridinring zurückgespalten wurde.

(Die DC-Untersuchungen erfolgten an Kieselgel-G-Schichten mit *sec.* BuOH : HCOOH : H₂O = 75 : 15 : 10.)

Überführung in die Pyridiniumverbindung durch schonende Säurebehandlung: 5 g N-Hexyl-1,4-dihydropyridin wurden in 50 ml Dioxan gelöst und zu einer Mischung aus 50 ml Dioxan und 50 ml Wasser getropft. Die Lösung wurde mit Hilfe eines Autotitrators konstant auf *pH* 3 gehalten, die Reaktionsmischung gut gerührt und bis kurz unter den Siedepunkt erhitzt. Die Reaktionszeit betrug 6 h. Die bräunliche Lösung wurde eingedampft, mit Wasser aufgenommen, mit Aktivkohle aufgeköcht und filtriert. Das hellgelbe Filtrat zeigte das UV-Spektrum einer N-Hexyl-pyridiniumverbindung (2 max = 258 nm).

Oxidation und Nachweis der N-Alkyl-pyridiniumsalze als Doppelsalz: Nach der Oxidation des N-Alkyl-1,4-dihydropyridins mit AgNO₃ wurde das Filtrat mehrmals eingedampft und mit konzentrierter Salzsäure immer wieder aufgenommen. Der Rückstand war eine klare hochviskose Substanz. Sie war chromatographisch einheitlich und wurde in wenig Alkohol gelöst und mit einer konzentrierten FeCl₃-Lösung (10 g FeCl₃/50 ml Wasser) versetzt. Der ausgefallene Niederschlag wurde abzentrifugiert und in siedendem Eisessig umkristallisiert. Das Produkt fiel in Form von braunroten Kristallen an, die zur Entfernung des Eisessigs mit Petrolether gewaschen und im Exsikkator getrocknet wurden.

Elementaranalyse des N-Hexyl-1,4-dihydropyridiniumchlorid-Doppelsalzes:

$C_{11}H_{18}NCl \cdot FeCl_3$. Ber. C 36,4, H 5,0, Cl 39,1.
Gef. C 35,7, H 4,8, Cl 40,2.

Literatur

- ¹ *Lubig R.*, Dissertation, RWTH Aachen, 1974.
- ² *Seligberger L., Sadlier C.*, J. Am. Leath. Chem. Assoc. **52**, 2 (1957).
- ³ *Sabatini D. D., Bensch K., Barnett R. J.*, J. Cell. Biol. **17**, 19 (1963).
- ⁴ *Hopwood D.*, Histochem. J. **1**, 323 (1969).
- ⁵ *Hopwood D.*, Histochem. J. **4**, 267 (1972).
- ⁶ *Russell A. D., Hopwood D.*, Prog. Med. Chem. **13**, 271 (1976).
- ⁷ *Gorman S. P., Scott E. M., Russell A. D.*, J. Appl. Bacteriol. **48**, 161 (1980).
- ⁸ *Hardy P. M., Nicholls A. C., Rydon H. N.*, Chem. Comm. **1969**, 565.
- ⁹ *Richards F. M., Knowles J. R.*, J. Mol. Biol. **37**, 231 (1968).
- ¹⁰ *Robertson E. A., Schultz R. L.*, J. Ultrastruct. Res. **30**, 275 (1970).
- ¹¹ *Monsan P., Puzo G., Mazarguil H.*, Biochemie **57**, 1281 (1975).
- ¹² *Margel S., Rembaum A.*, Macromolecules **13**, 19 (1980).
- ¹³ *Hardy P. M., Nicholls A. C., Rydon H. N.*, J. Chem. Soc. Perkin II **1972**, 2270.
- ¹⁴ *Bowes J. H., Cater C. W.*, J. Roy. Microscop. Soc. **85**, 193 (1966).
- ¹⁵ *Quiococho F. A., Richards F. M.*, Biochem. **5**, 4062 (1966).
- ¹⁶ *Branner-Jorgensen S.*, Enzyme Eng. **4**, 393 (1978).
- ¹⁷ *Hardy P. M., Nicholls A. C., Rydon H. N.*, J. Chem. Soc. Perkin I **1976**, 958.
- ¹⁸ *Thomas J., Elsdon D. F., Patridge S. M.*, Nature **200**, 651 (1963).
- ¹⁹ *Hardy P. M., Hughes G. J., Rydon H. N.*, J. Chem. Soc. Chem. Comm. **1976**, 158.
- ²⁰ *Hardy P. M., Hughes G. J., Rydon H. N.*, J. Chem. Soc. Chem. Comm. **1977**, 759.
- ²¹ *Hardy P. M., Hughes G. J., Rydon H. N.*, J. Chem. Soc. Perkin II **1979**, 2282.
- ²² *Keller C., Heidemann E., Rutkowski J. R., Milesan M.*, Das Leder **27**, 176 (1976).
- ²³ *Ford D. J.*, Dissertation, University of Cincinnati, 1978; C. A. **90**, 50038 x (1979).
- ²⁴ *Bowes J. H., Cater C. W.*, Biochem. Biophys. Acta **168**, 341 (1968).
- ²⁵ *Korn A. H., Fearheller S. H., Filachione E. M.*, J. Mol. Biol. **65**, 525 (1972).
- ²⁶ *Stout D. M.*, Dissertation, Colorado State University, 1974; C. A. **83**, 163958 v (1975).
- ²⁷ *Birch A. J., Karakhanov E. A.*, J. Chem. Soc., Chem. Comm. **1975**, 480.
- ²⁸ *Watanabe Y., Shim S. C., Mitsudo T., Yamashita M., Takegami Y.*, Chem. Lett. **1975**, 995.
- ²⁹ *Watanabe Y., Shim S. Ch., Mitsudo T., Yamashita M., Takegami Y.*, Bull. Chem. Soc. Jpn. **49**, 2302 (1976).
- ³⁰ *Panouse J. J.*, Bull. Soc. Chem. **1953**, D 53.
- ³¹ *Karrer P., Schwarzenbach G., Utzinger G. E.*, Helv. Chim. Acta **20**, 72 (1937).
- ³² *Karrer P., Schwarzenbach G., Benz F., Solmssen U.*, Helv. Chim. Acta **19**, 811 (1936).
- ³³ *Blauer G., Harmatz D., Meir E., Swenson M. K., Zvilichovsky B.*, Biopolymers **14**, 2585 (1975).
- ³⁴ *Beyer H., Schenk U.*, J. Chromatography **39**, 491 (1969).