

GERHARD PFLEIDERER, EBERHARD SANN\*) und ARTHUR STOCK

Zum Wirkungsmechanismus von Dehydrogenasen<sup>1)</sup>

## Das Reaktionsverhalten von Pyridinnucleotiden (PN) und PN-Modellen mit Sulfit als nucleophilem Agens<sup>2)</sup>

Aus der Biochemischen Abteilung des Instituts  
für Organische Chemie an der Universität Frankfurt a. M.

(Eingegangen am 1. August 1960)

*Herrn Prof. Dr. Richard Kuhn zum 60. Geburtstag in Verehrung gewidmet*

Die Dissoziationskonstante des DPN-Sulfit-Adduktes\*\*) wird spezifisch durch LDH und andere Dehydrogenasen um einige Zehnerpotenzen herabgesetzt. Zur Klärung dieses Effektes wurde die zwischen- und innermolekulare Beeinflußbarkeit der  $K_{\text{Diss}}$  von Addukten von Sulfit an Pyridiniumderivate untersucht. Die Abhängigkeit der Adduktbildung von  $p_{\text{H}}$ , Temperatur, einigen Fremdionen und Lösungsmittel-Dielektrizitätskonstanten wurde gemessen. Substituenten in 1- und 3-Stellung erniedrigen oder erhöhen entsprechend ihren mesomeren und induktiven Effekten auf den Pyridinkern die  $K_{\text{Diss}}$ . Diese Wirkung wird im Hinblick auf DH-Wirkungsmechanismen diskutiert. Die Pyridinium-Sulfit-Addukte sind entsprechend ihren  $K_{\text{Diss}}$  in ihre ionoiden Gleichgewichtskomponenten dissoziiert. Sie sind im undissoziierten Anteil im allgemeinen homöopolar, polarisiert gebundene 1.4-Dihydro-pyridin-4-sulfonate. Oberhalb von  $p_{\text{H}}$  7 können sie mit Hydrogensulfit zu einem „Säureprodukt“ weiterreagieren.

Bekanntlich wurde der Nicotinamidteil der beiden Pyridin-nucleotide, DPN und TPN, 1936 durch WARBURG und KARRER als der Wasserstoff-Überträger erkannt. Seit dieser Zeit hat es nicht an Untersuchungen und Hypothesen gefehlt, die Beiträge zu den heute erst z. T. aufgeklärten Wirkungsmechanismen der PN-benötigenden Dehydrogenasen liefern konnten. Die „optische Methode“ von O. WARBURG erlaubt, durch Verfolgung der Absorptionszunahme bei 340 m $\mu$  und Abnahme bei 260 m $\mu$  die reversible Hydrierung des PN (II) zum PNH (I) zu beobachten. O. MEYERHOF, P. OHLMEYER und W. MÖHLE<sup>3)</sup> entdeckten 1938, daß Sulfit- und Cyanidionen am DPN ähnliche Spektraländerungen verursachen, also an den Pyridinring addiert werden. Für die Formulierung des DPN-Sulfit-Additionsprodukts schlug R. KUHN<sup>3a)</sup> die Struktur einer „Aldehyd-Bisulfit-Verbindung“ vor.

\*) Teil der Dissertat. E. SANN, Univ. Frankfurt a. M. 1961.

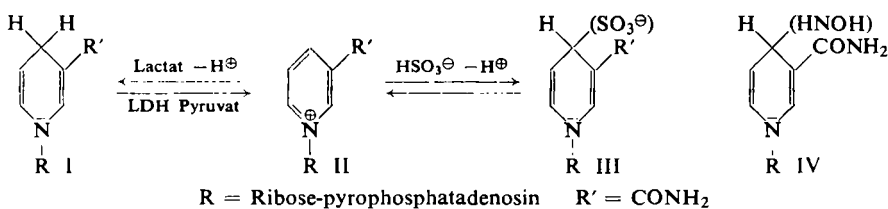
\*\*) Abkürzungen:  $K_{\text{Diss}}$  = Dissoziationskonstante;  $pK_{\text{Diss}}$  =  $-\log K_{\text{Diss}}$ ;  $DK$  = Dielektrizitätskonstante; PN = Pyridin-nucleotid; PNH = 1.4-Dihydro-PN; DPN(H) = Diphospho-PN(H); TPN(H) = Triphospho-PN(H); Py<sup>⊕</sup> = Pyridin(ium)-Derivat; NMN = Nicotinamid-mononucleotid; DH = Dehydrogenase; LDH = Lactat(Milchsäure)-DH; ADH = Alkohol-DH; MDH = Malat(Äpfelsäure)-DH; Tris =  $\alpha,\alpha$ -Bis-hydroxymethyl- $\beta$ -hydroxy-äthylamin.

<sup>1)</sup> Vorige Mittell.: G. PFLEIDERER und E. HOHNHOLZ, Biochem. Z. **331**, 245 [1959].

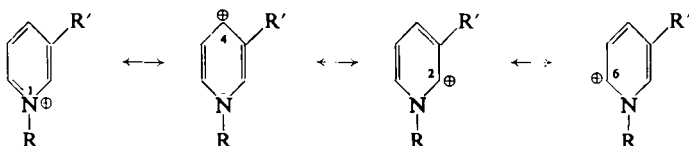
<sup>2)</sup> Ein Teil der Ergebnisse wurde auf dem 11. Mosbacher Colloquium der Ges. f. Physiol. Chemie am 30. April 1960 vorgetragen.

<sup>3)</sup> Biochem. Z. **297**, 113 [1938]. <sup>3a)</sup> Zitiert in l. c.<sup>3)</sup>, S. 121.

G. PFLEIDERER, D. JECKEL und TH. WIELAND<sup>4)</sup> konnten feststellen, daß das relativ stark dissoziierende DPN-Sulfit-Additionsprodukt (III) spezifisch mit einer stöchiometrischen Menge LDH momentan zu einem fast undissoziierten Addukt zusammentritt. Dieses ternäre LDH-Addukt zeigt das Absorptionsmaximum ebenso wie das enzymfreie binäre Addukt bei 319–320 m $\mu$ . Durch das DPN-Sulfit-Addukt wird die LDH-katalysierte H-Übertragung von DPNH auf Pyruvat competitiv gehemmt, und LDH kann vor Denaturierung (durch Hitze, Harnstoff, Proteolyse oder SH-Reagenzien) z. T. geschützt werden<sup>5)</sup>, wahrscheinlich weil die DPN(H)- und substratbindenden Gruppen der „aktiven LDH-Bezirke“ nun besetzt sind. Durch viel L(+)-Lactat läßt sich die Sulfithemmung competitiv wieder aufheben. Sulfit kann also als ein Pseudosubstrat mit entsprechender Ladung und Größe des L(+)-Lactats aufgefaßt werden, bei dem aber infolge Fehlens des zu übertragenden Hydridwasserstoffes die normale Enzymreaktion nicht abläuft und blockiert bleibt.



Eine entsprechende Bindung des DPN-Hydroxylamin-Addukts (IV) zum ternären Addukt an Leber-ADH und dessen competitive ADH-Hemmung hatten N. O. KAPLAN und Mitarbb.<sup>6,7)</sup> beobachtet und untersucht. Da die Hemmung durch Hydroxylamin spezifisch für ADH und die durch Sulfit spezifisch für LDH und auch für andere  $\alpha$ -Hydroxysäure-DH ist<sup>4)</sup>, müssen unterschiedliche Bindungsarten angenommen werden. Diese könnten darin bestehen, daß bei der ADH das Zink eine bindende Rolle spielt, das in dieser, aber nicht in den  $\alpha$ -Hydroxysäure-DH gefunden wurde<sup>8)</sup>,



oder u. U. darin, daß die Bindung an verschiedene Atome des Pyridiniumrings erfolgt. Hier ist die positive Ladung bekanntlich mesomer auf die Pyridinatome 1, 2, 4 und 6 verteilt. Nach verschiedenen Untersuchungen<sup>9–15)</sup> hängt es beim Angriff nucleophiler

<sup>4)</sup> Biochem. Z. **328**, 187 [1956].

<sup>5)</sup> G. PFLEIDERER, D. JECKEL und TH. WIELAND, Biochem. Z. **329**, 104 [1957].

<sup>6)</sup> R. M. BURTON und N. O. KAPLAN, J. biol. Chemistry **211**, 447 [1954].

<sup>7)</sup> N. O. KAPLAN und M. M. CIOTTI, J. biol. Chemistry **211**, 431 [1954].

<sup>8)</sup> G. PFLEIDERER, D. JECKEL und TH. WIELAND, Biochem. Z. **330**, 296 [1958].

<sup>9)</sup> S. P. COLOWICK, N. O. KAPLAN und M. M. CIOTTI, J. biol. Chemistry **191**, 447 [1951].

<sup>10)</sup> M. R. LAMBORG, R. M. BURTON und N. O. KAPLAN, J. Amer. chem. Soc. **79**, 6173 [1957].

<sup>11)</sup> F. KRÖHNKE, K. ELLEGAST und E. BERTRAM, Liebigs Ann. Chem. **600**, 176 [1956].

<sup>12)</sup> E. M. KOSOWER und P. E. KLINEDINST, J. Amer. chem. Soc. **78**, 3493, 3497 [1956].

<sup>13)</sup> K. WALLENFELS und H. SCHÜLY, Liebigs Ann. Chem. **621**, 86 [1959].

<sup>14)</sup> K. WALLENFELS und H. DIEKMANN, Liebigs Ann. Chem. **621**, 166 [1959].

<sup>15)</sup> K. WALLENFELS und M. GELLRICH, Chem. Ber. **92**, 1406 [1959].

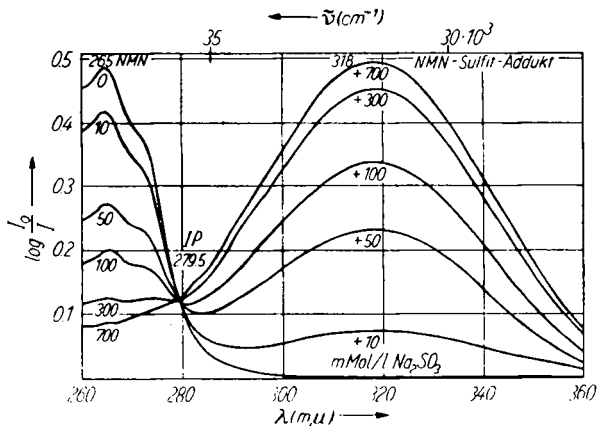
Agenzien von deren Natur und den Reaktionsbedingungen ab, welcher Gleichgewichtsanteil als heteropolares Pyridiniumsalz und welcher als 2-, 4- oder 6-isomeres Carboniumaddukt vorliegt. Letzteres wurde auch als Pseudosalz, Kryptosalz<sup>13)</sup>, „charge transfer“- bzw. Elektronen-Donator-Acceptor-Komplex<sup>12)</sup> bezeichnet.

Über Sulfit-Addukte liegen bisher nur vereinzelte Meßergebnisse von N. O. KAPLAN und Mitarbb.<sup>9)</sup> sowie von K. WALLENFELS und H. SCHÜLY<sup>13)</sup> vor. Wegen der oben erklärten Bedeutung des Sulfits als Pseudosubstrat wurde von uns das Reaktionsverhalten von Sulfit mit Pyridiniumsalzen näher untersucht.

#### MESSERGEBNISSE UND DISKUSSION

##### 1. Die Dissoziationskonstanten der PN-Modell-Sulfit-Addukte

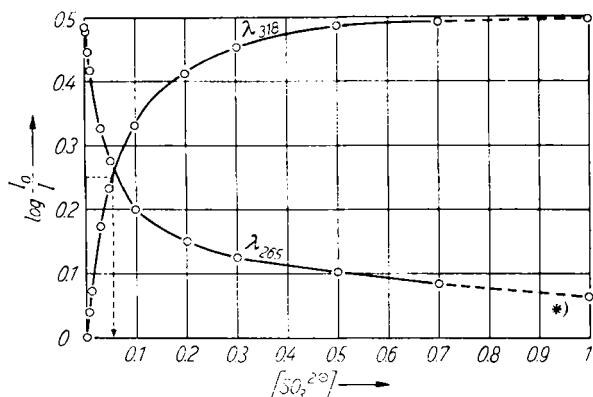
**PN-Modell-Sulfit-Addukte:** Substituierte Pyridiniumsalze sind am einfachsten durch ihre UV-Absorption zu erkennen. Das Maximum der längstwelligen UV-Absorptionsbande in Wasser liegt beim Pyridin, bei *m*-substituierten Pyridinderivaten und bei deren *N*-Alkyl-pyridiniumsalzen im Bereich zwischen 255 m $\mu$  und 270 m $\mu$  (Abbild. 1 und Tab. 2). Sowohl bei ihren 1,4-Dihydroderivaten als auch ihren Verbindungen mit den meisten nucleophilen Agenzien, tritt an Stelle dieser eine um 50–150 m $\mu$  längerwellige Bande auf (vgl. Abbild. 1 und Tab. 2 und 3). Als Farbumschlag von Farblos nach Gelb ist diese Verschiebung in bestimmten Fällen sogar visuell zu verfolgen, z. B. beim Zusammengeben von [1-Alkyl-nicotinsäure-amid]-chlorid mit konz. Sulfit-Lösung auf einer Tüpfelplatte.



Abbild. 1. UV-Spektren von NMN und NMN-Sulfit-Addukt im Gleichgewicht.  $10^{-4}$  *m* NMN in  $m/10$  Tris-acetat-Puffer  $pH$  8.0 mit steigenden Mengen Sulfit versetzt; in der Vergleichsküvette die entsprechende Sulfit-Konzentration

Abbild. 1 zeigt am NMN, wie bei konstanter Pyridiniumsalz-Konzentration durch Zugabe steigender Mengen Sulfit das Gleichgewicht in die Richtung der Adduktbildung verschoben wird. Hierbei läßt sich die spektrale Verschiebung klarer erkennen als am DPN und TPN, da in diesen die 260-m $\mu$ -Absorption durch die Adeninabsorption bei 260 m $\mu$  überlagert wird. Die Bildungs- bzw. Zerfallsgeschwindigkeiten der Addukte beim Zusammengeben bzw. Verdünnen der Lösungen

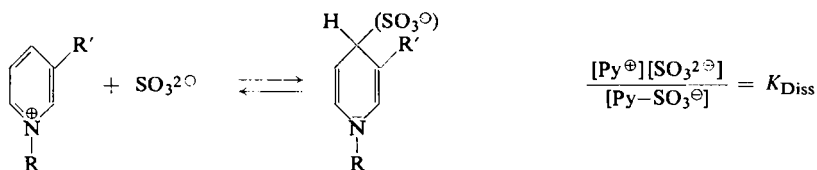
sind im allgemeinen so groß, daß selbst bei geringer Konzentration der Reaktions-  
teilnehmer die jeweilige Gleichgewichtslage vor dem Registrieren der Spektren einge-  
stellt ist. Ihr Verlauf durch einen isosbestischen Punkt (IP) (Abbild. 1) weist darauf  
hin, daß keine langlebigen Zwischenprodukte entstehen. Auf ein langsames Absinken  
der Adduktbande infolge einer Sekundärreaktion wird später eingegangen.



Abbild. 2. Extinktionswerte von NMN (265 mμ) und seinem Sulfite-Addukt (318 mμ) in  
Abhängigkeit von der Sulfite-Konzentration (Mol/l)

\*) Überlagert durch den Ausläufer der breiten Adduktbande

Die Abhängigkeit der Extinktion von der Konzentration zeigt das Bild einer Hyperbel  
(Abbild. 2). Wird bei konstanter Sulfite-Konzentration die Pyridiniumsalz-Konzentration  
über die Sulfite-Konzentration hinaus erhöht, so sollte bei der Addition eines  
zweiten Pyridinium-Kations an das Sulfite zu einem Doppel-Addukt, wie es für das  
Dichlorbenzylnicotinsäureamid von K. WALLENFELS und H. SCHÜLY<sup>13)</sup> beschrieben  
wurde, über die normale Extinktionszunahme des Sulfite-Addukts hinaus ein zusätz-  
licher Anstieg erfolgen. Dies ist jedoch nicht der Fall, d. h. es liegt in wäßriger  
Lösung das Pyridiniumsalz des anioniden einfachen Addukts vor. Abgesehen von  
letzterer Komplikationsmöglichkeit, die durch Messen bei Sulfite-Überschuß entfällt,  
besteht für die Sulfite-Addukte also folgende einfache Gleichgewichtsbeziehung:

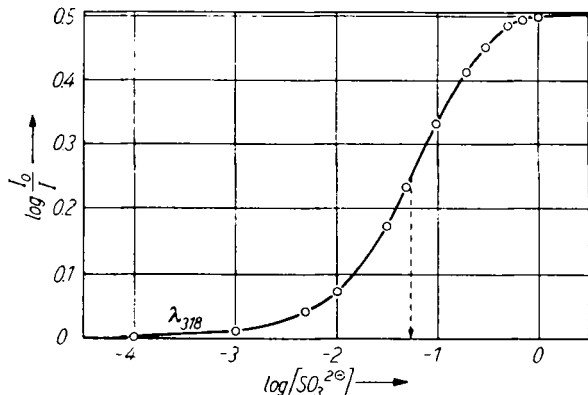


Diese läßt sich durch die Bildungskonstante oder deren reziproke, stöchiometrische  
Dissoziationskonstante ( $K_{\text{Diss}}$ ) angeben. Die Aktivitätskoeffizienten sollen als nahezu  
1 hier allgemein vernachlässigt werden.

#### Die Ermittlung der Dissoziationskonstanten ( $K_{\text{Diss}}$ )

a) Ist in obiger Gleichung  $[\text{Py}^+] = [\text{Py}-\text{SO}_3^-]$ , d. h. liegt gerade die Hälfte der  
Pyridiniumionen als Addukt vor, so ist  $K_{\text{Diss}} = [\text{SO}_3^{2-}]$ . Es braucht also für die

Halbwertshöhen im Pyridiniumsalz- (abzüglich Adduktbanden-Überlagerung) oder Addukt-Maximum nur die erforderliche molare Sulfite-Konzentration durch Interpolation ermittelt zu werden (Abbild. 2, 3). Bei logarithmischer Sulfite-Skala (Abbild. 3) ist  $\log K_{\text{Diss}}$  außerdem der Wendepunkt. Man kann diese Ermittlung des  $\log K_{\text{Diss}}$ -Wertes (als  $-pK_{\text{Diss}}$  bezeichnet) aus der logarithmischen Sulfite-Skala mit der Ermittlung eines  $pK$ -Wertes aus der  $pH$ -Skala vergleichen. Obige Methode ist aber nur für mittlere  $pK_{\text{Diss}}$  von 0–4 anwendbar.



Abbild. 3. Extinktion bei 318 m $\mu$  von Abbild. 2 in Abhängigkeit von der logarithmisch aufgetragenen Sulfite-Konzentration (Mol/l)

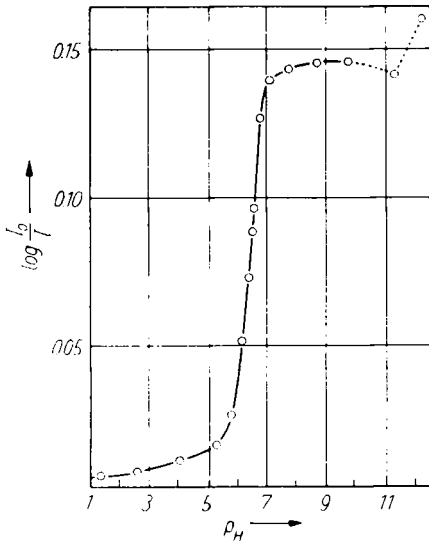
b) Ist die Dissoziation so groß, daß selbst mit 1  $m$  Sulfite nicht mehr die Halbwertshöhe erreicht wird ( $pK_{\text{Diss}} < 0$ ), bestimmt man  $K_{\text{Diss}}$  auf eine andere Weise. Man ermittelt im 260-m $\mu$ -Bereich die Extinktion  $E_1$  der Pyridinium-Konzentration vor Sulfitezugabe, sowie die Extinktion  $E_2$  der noch vorhandenen Pyridinium-Konzentration nach Zugabe von 1  $m$  Sulfite. Für  $[\text{SO}_3^{2-}] = 1$  ist  $K_{\text{Diss}} = [\text{Py}^{\oplus}]/[\text{Py}-\text{SO}_3^{\ominus}]$ , also ist  $K_{\text{Diss}} = E_2/(E_1 - E_2) = (E_1/(E_1 - E_2)) - 1$ . Weil im 260-m $\mu$ -Bereich hohe Sulfite-Konzentrationen die Messung von  $E_2$  stören, kann man die Extinktionsabnahme ( $E_1 - E_2$ ) auch indirekt ermitteln, da sie proportional der Zunahme  $E_3$  im 320–420-m $\mu$ -Bereich ist:  $E_1 - E_2 = E_3(\epsilon_1/\epsilon_3)$ . Das Verhältnis der Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_1/\epsilon_3$  läßt sich ermitteln. Es ist für Pyridinderivate ohne zusätzlichen Chromophor etwa 5/6.

c) Ist die Dissoziation so gering, daß bereits bei einer  $10^{-4}$  molaren Sulfite-Konzentration die Halbwertshöhe überschritten wird ( $pK_{\text{Diss}} > 4$ ), so läßt sich nicht gut bei geringeren Konzentrationen arbeiten, da dann die Extinktion zu klein ist. Man bestimmt hier die Addukt-Extinktion  $E_3$  bei äquimolarer  $\text{Py}^{\oplus}$ - und Sulfite-Konzentration  $S$  (z. B.  $10^{-4}m$ ), sowie die Extinktion  $E_4$  nach Zugabe eines hohen Sulfite-Überschusses. Die Extinktionszunahme  $\Delta E = E_4 - E_3$  entspricht dem freien  $\text{Py}^{\oplus}$  und äquimolaren  $\text{SO}_3^{2-}$ . Durch Einsetzen der entsprechenden Extinktion und Umwandlung in die Konzentrationen folgt für  $K_{\text{Diss}}$ :

$$K_{\text{Diss}} = \frac{[\text{Py}^{\oplus}][\text{SO}_3^{2-}]}{[\text{Py}-\text{SO}_3^{\ominus}]} = \frac{(\Delta E)^2}{E_3} \cdot \frac{E_4}{S} = \frac{(E_4 - E_3)^2}{E_4 \cdot E_3} \cdot S$$

*Die Abhängigkeit vom  $pH$ :* Wie Abbild. 4 zeigt, ist die Wasserstoffionen-Konzentration für die Existenz der Addukte von wesentlicher Bedeutung. Bei dem abgebil-

deten Beispiel entsteht unterhalb von  $p_H$  5.5 praktisch kein Pyridinium-Addukt (1). Zwischen  $p_H$  5.5 und 7.5 ist die Addukt-Konzentration  $p_H$ -abhängig (2). Von  $p_H$  7.5 bis 10 liegt das Sulfite-Addukt ohne nennenswerte  $p_H$ -Abhängigkeit vor (3). Oberhalb



Abbild. 4  
 $p_H$ -Abhängigkeit der Bildung eines Sulfite-Addukts, gemessen durch die Extinktion bei 340 m $\mu$ ,  $10^{-3}$  m [1-Methyl-nicotinsäureamid]-chlorid in 0.2 m Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, mit HCl oder NaOH auf den Meß- $p_H$ -Wert eingestellt und sofort gemessen

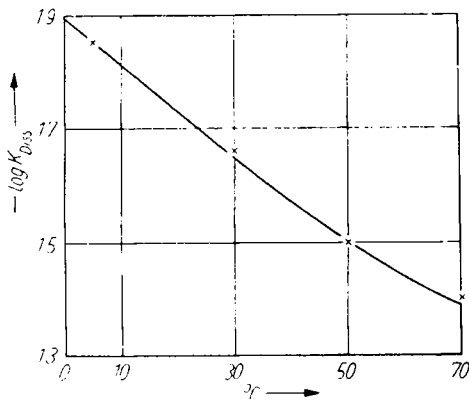
von  $p_H$  10 geht seine Konzentration wieder zurück, da sich OH<sup>-</sup>-Ionen kompetitiv anzulagern beginnen (4). Demnach herrschen je nach  $p_H$  folgende Gleichgewichte vor:

- (1) Bildung von Hydrogensulfite: 
$$\text{SO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{SO}_3 \xrightleftharpoons{p_K 1.8} \text{H}^+ + \text{HSO}_3^- \text{ 16)}$$
- (2) Bildung von Sulfite: 
$$\text{HSO}_3^- \xrightleftharpoons{p_K 7.0} \text{H}^+ + \text{SO}_3^{2-} \text{ 16)}$$
- (3) Bildung von Sulfite-Addukt: 
$$\text{Py}^+ + \text{SO}_3^{2-} \rightleftharpoons \text{Py-SO}_3^-$$
- (4) Bildung von Pseudobase: 
$$\text{Py}^+ + \text{OH}^- \rightleftharpoons \text{Py-OH}$$

Aus der  $p_H$ -Abhängigkeit im Dissoziationsbereich von Hydrogensulfite zu Sulfite geht hervor, daß es sich bei den Pyridiniumionen um eine Anlagerung des Sulfitions handelt. Im Gegensatz dazu lagert sich bekanntlich an die Carbonylgruppe der elektroneutralen Aldehyde und Ketone das Hydrogensulfite an. Auch die anderen Nicotinamidderivate wie *N*-Benzyl-nicotinamid und DPN zeigen  $p_H$ -Kurven wie in Abbild. 4. Deshalb wurden die  $K_{\text{Diss}}$  im allgemeinen bei  $p_H$  8.0, also im  $p_H$ -unabhängigen Bereich bestimmt. Der  $p_H$ -abhängige Bereich kann u. U. verschoben sein, z. B. bei kleiner  $K_{\text{Diss}}$  und hoher Sulfite-Konzentration ins Saure. Umgekehrt addieren 1-Methyl-3-formyl- (II, R = CH<sub>3</sub>, R' = CHO), 1-Methyl-3-acetyl- (II, R = CH<sub>3</sub>, R' = COCH<sub>3</sub>) und 1-Methyl-3-cyan-pyridiniumsalze (II, R = CH<sub>3</sub>, R' = CN) bei  $p_H$  8.0 noch  $p_H$ -abhängig. Letztere wurden deshalb bei  $p_H$  10 gemessen. Vermutlich liegt hier eine Störung durch Hydrogensulfite-Addition an den  $\alpha$ -Kohlenstoff der Seitenkette in 3-Stellung vor.

<sup>16)</sup> M. RAUEN, Biochem. Taschenbuch, S. 639, Springer-Verlag, Berlin 1956.

Die Abhängigkeit von  $K_{\text{Diss}}$  von der Temperatur: Abbild. 5 zeigt für das DPN-Sulfit-Addukt in wäßriger Lösung von  $p_{\text{H}}$  8, wie bei ansteigender Temperatur das Addukt zunehmend dissoziiert. Es resultiert hier für  $\pm 5^\circ$  im  $pK_{\text{Diss}}$ -Wert eine Fehlerbreite von  $\pm 0.05$ , die noch unter der in den Tabellen angegebenen von  $\pm 0.1$  liegt.



Abbild. 5  
Temperaturabhängigkeit von  $pK_{\text{Diss}}$   
beim DPN-Sulfit-Addukt.  
 $10^{-4} m$  DPN in  $m/10$  Tris-  
acetat-Puffer  $p_{\text{H}}$  8.0; ermittelt durch  
Messung der Extinktion bei  $320 m\mu$

Diese Messungen erfolgten meist bei  $28 \pm 5^\circ$ . Gleichzeitig läßt sich aus der Temperaturabhängigkeit von  $K_{\text{Diss}}$  die Wärmetönung der DPN-Sulfit-Addukt-Bildung für etwa  $28^\circ$  errechnen.

$$\Delta H = RT^2 \frac{d(2.3 \cdot pK_{\text{Diss}})}{dT} = -3.3 \text{ kcal/Mol}$$

Entsprechend ergibt  $K_{\text{Diss}}$  eine freie Enthalpie der Adduktbildung von:

$$\Delta G = -RT \cdot 2.3 pK_{\text{Diss}} = -2.3 \text{ kcal/Mol.}$$

Obige Temperaturabhängigkeit und Werte gelten nicht allgemein, stellen jedoch für die untersuchten Fälle entsprechend einer mittleren  $K_{\text{Diss}}$  für das DPN-Sulfit-Addukt (vgl. Tab. 2 und 3) etwa einen Mittelwert dar. Zum Beispiel liegt für diese Addukte  $\Delta G$  im Bereich von  $-3$  bis  $+7$  kcal/Mol.

## 2. Intermolekulare Beeinflussung der Dissoziationskonstanten

**Beeinflussung durch Anionen:** Beim Vergleich von  $K_{\text{Diss}}$ -Bestimmungen in Borat-, Phosphat- und Tris-acetat-Puffer, fielen geringe, aber reproduzierbare Unterschiede auf. Deshalb wurde die Beeinflussung der DPN-Sulfit-Addukt-Bildung durch verschiedene, wenig nucleophile Anionen in 1 molarer Lösung getestet. Die Ergebnisse gibt Tab. 1 wieder.

Im allgemeinen scheint entsprechend der Konzentration, Ladung, Polarisierbarkeit und Größe der Anionen ein Verdrängungseffekt der Sulfit-Anionen vorzuliegen. Speziell beim Borat dürfte sich bei glykosidischen Resten R, wie auch beim DPN ein Boratkomplex mit negativer Ladung ausbilden, die zusätzlich auf die Addition hemmend wirkt. Da das Acetation sich als verhältnismäßig indifferent erwies, wurde für die weiteren Untersuchungen im allgemeinen  $m/10$  Tris-acetat-Puffer gewählt.

Tab. 1. Fremdionen-Beeinflussung der Dissoziationskonstanten des DPN-Sulfit-Addukts \*)

Konz. mol.	Anion bzw. Kation	$pK_{\text{Diss}}$ ( $\pm 0.1$ )	$\Delta pK_{\text{Diss}}$ (vgl. mit $m/100$ Tris-acetat)
0.01	Acetat	1.66	—
0.1	Acetat	1.65	—
1	Acetat	1.55	-0.1
1	Lactat	1.4	-0.25
1	Citrat	1.2	-0.45
1	$\text{Cl}^\ominus$	1.25	-0.4
1	$\text{Br}^\ominus$	1.15	-0.5
1	$\text{ClO}_4^\ominus$	1.0	-0.65
1	$\text{HCO}_3^\ominus$	1.2	-0.45
1	$\text{SO}_4^{2\ominus}$	1.25	-0.4
1	$\text{HPO}_4^{2\ominus}$	1.25	-0.4
1	Borat	0.85	-0.8
1	Äthylendiguani- diniumacetat	1.75	+0.2

\*)  $10^{-4}m$  DPN in  $1m$  Säure des jeweiligen Anions, mit Tris auf  $p_H$  8.0 eingestellt;  $K_{\text{Diss}}$  nach Methode a (S. 3086) bei  $320 m\mu$  ermittelt.

*Beeinflussung durch das Lösungsmittel:* Für Pyridinium-Cyanid-Addukte zeigten bereits KAPLAN und Mitarbb.<sup>10)</sup>, daß die Konzentration des Cyanid-Addukts zunimmt, wenn die Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels Wasser, z. B. durch Methanolzugabe verkleinert wird. Man kann auch für Sulfit-Addukte durch Zusatz von Alkohol, Dioxan, Pyridin oder Dimethylformamid die  $K_{\text{Diss}}$  herabsetzen. In Lösungsmitteln kleiner  $DK$  wie Dioxan/Wasser (1:1) ( $DK = 40$ ) kann man spektroskopisch beobachten, daß über einen Komplex (Verbreiterung der Pyridiniumbande) eine Anlagerung an C-2 erfolgt ( $\lambda_{\text{max}}$  für DPN bei  $373 m\mu$ ). Dieses Addukt lagert sich in ein solches an C-4 um oder bildet ein Säureprodukt. Da bei höherer  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ -Konzentration meist das Sulfit ausfällt, muß man mit einem geeigneten organischen Salz, wie Triäthylammonium-sulfit arbeiten. Ein aus organischem Lösungsmittel isoliertes Sulfit-Addukt zerfällt in Wasser entsprechend seiner  $K_{\text{Diss}}$  und den Partnerkonzentrationen in seine Komponenten. Erhitzen von Sulfit-Addukten in organischen Lösungsmitteln führt meist zu einer Reihe unbekannter, elektrophoretisch trennbarer Produkte. Erwähnt sei hier noch, daß Sulfit-Addukte in Puffern mit organischem Lösungsmittel wie Pyridin/Eisessig elektrophoretisch eine gewisse Zeit ungetrennt wandern können.


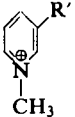
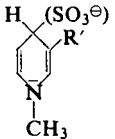
### 3. Intramolekulare Beeinflussung der Dissoziationskonstanten

*Der Einfluß des Substituenten in 3-Stellung:* Substituenteneinflüsse an Pyridiniumsalzen waren bereits von KRÖHNKE, ELLEGAST und BERTRAM<sup>11)</sup> für die Anlagerung verschiedener Methylketone und von LAMBORG, BURTON und KAPLAN<sup>10)</sup> für die Cyanid-Addition untersucht worden. Demnach begünstigen elektronenanziehende bzw. mesomerievergrößernde Substituenten in 3-Stellung derartige nucleophile Additionen, während Substituenten in 2-, 4- oder 6-Stellung stören können. Mit einer Reihe von Pyridiniumsalzen, die in 1- und 3-Stellung unterschiedlich substituiert waren, haben WALLENFELS und Mitarbb.<sup>13,14)</sup> in letzter Zeit Einflüsse auf die Cyanid-Addition geprüft.



Wir haben für unsere gleichzeitig ausgeführten Studien über die Sulfit-Addition die 1-Methyl-pyridiniumsalze herangezogen, deren 3-Stellung durch die in Tab. 2 aufgeführten Reste substituiert war.

Tab. 2. UV-Absorptionsspektren und Dissoziationskonstanten der Sulfit-Addukte von 3-substituierten 1-Methyl-pyridiniumsalzen

Nr.	R'	$\lambda_{\max}$ in m $\mu$ ( $\pm 2$ )			Best.- Meth. *)	$pK_{\text{Diss}}$ ( $\pm 0.1$ )
						
1	CONH <sub>2</sub>	261	263.5	339	b	-1.2
2	CONHCH <sub>3</sub>	260.5	264.5	332 $\pm$ 10	b	-1.6
3	CONHC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	260.5	264.5	334 $\pm$ 10	b	-1.6
4	CONHC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	262.5	259.5	354	b	-1.1
5	CON(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	260	265	320 $\pm$ 20	b	-1.9
6	CON(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>	260	266	320 $\pm$ 20	b	-1.9
7	CON(CH <sub>3</sub> )C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	263.	260	350 $\pm$ 10	b	-1.2
8	CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	262	263	340	b	-0.3
9	CO <sub>2</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	262	263	340	b	-0.3
10	CO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	262.5	263.5	350 $\pm$ 10	b	0 $\pm$ 0.2
11	COO <sup>-</sup>	260.5	263.5	—	b**)	< -2
12	CHO	266	260.5	350	b**)	-0.5 $\pm$ 0.5
13	COCH <sub>3</sub>	266	265.5	356	a**)	+2.0
14	CN	264	267	334	a**)	+3.2
15	NO <sub>2</sub>	268 ***)	266	428	c	+4.8
16	CH <sub>3</sub>	261.5	264	—	b**)	< -2
17	CH <sub>2</sub> N <sup>+</sup> H <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	258	260	—	b**)	< -2

\*) 1 bis 2  $\cdot 10^{-4}m$  Pyridiniumsalz in  $m/10$  Tris-acetat-Puffer  $p_H$  8.0;  $K_{\text{Diss}}$  wurde durch Methode a) bzw. c) mit steigendem Zusatz von Sulfit-Lösung von  $p_H$  8.0 oder b) durch Vergleich mit der Messung in 1  $m$  Sulfit-Lösung von  $p_H$  8.0 ermittelt; in der Vergleichsküvette ist die entsprechende Sulfit-Konzentration vorhanden.

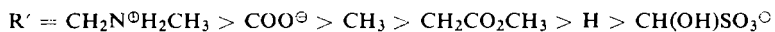
\*\*) in  $m/10$  Triäthylamin-acetat-Puffer,  $p_H$  10.0 gemessen.

\*\*\*) Wendepunkt der Spektrenschulter.

Die 1-Methylderivate zeigen bei *elektronenanziehenden* 3-Substituenten in wäßriger Lösung noch fast alle die Adduktbande. Allerdings ist diese bei den Alkylamid-derivaten (Tab. 2, Nr. 2, 3, 5 und 6) selbst in 1  $m$  Sulfit-Lösung sehr flach und ohne ausgeprägtes Maximum, wodurch die Bestimmung von  $\lambda_{\max}$  mit einem größeren Fehler behaftet ist. Beim Phenylester (10) entsteht der größere Fehler durch seine auffallende Unbeständigkeit ( $\tau_{1/2}$  etwa 20 Sek.), wahrscheinlich infolge Verseifung. Die  $\lambda_{\max}$ -Werte der Sulfit-Addukte liegen etwa um 20  $m\mu$  kürzerwellig als die  $\lambda_{\max}$ -Werte der entsprechenden 1,4-Dihydro-Verbindungen und etwa um 5  $m\mu$  kürzerwellig als die der Cyanid-Addukte<sup>10</sup>). Ihre millimolaren Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon$ ), die sich aus der Abnahme des jeweiligen Pyridinium- $\lambda_{\max}$  errechnen lassen, bewegen sich meistens zwischen 4500 und 6000  $\text{cm}^2/\text{mMol}$ . Sie liegen damit im allgemeinen etwas höher als die der zugehörigen Pyridiniumsalze (falls in diesen keine zusätzliche Anilin-, Phenol- oder Adenin-Absorption vorliegt), aber etwas tiefer als die

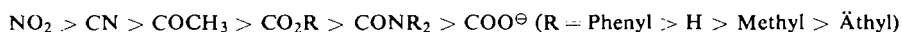
der entsprechenden Cyanid-Addukte. Aus der Analogie der Absorptionsspektren der Sulfit-Addukte zu denen der 1.4-Dihydro-Derivate muß für jene die Sulfit-Addition in 4-Stellung angenommen werden. Ein Addukt in 2-Stellung müßte ein wesentlich längerwelliges  $\lambda_{\max}$  und ein solches in 6-Stellung ein zweites Maximum bei 260 m $\mu$  <sup>15)</sup> (Abbild. 1) aufweisen. Diesen Schluß hatten WALLENFELS und Mitarb. <sup>13)</sup> auch für die Cyanid-Addukte gezogen.

Hat der Substituent in 3-Stellung keine positivierende Wirkung, so kommt es auch bei großer Sulfit-Konzentration nicht mehr zur Ausbildung einer längerwelligeren Bande, sondern nur noch zu einer Aufweitung der Pyridiniumbande, wie sie die schwächer addierenden Alkylamiderivate zusätzlich zeigen, und wie wir sie z. T. als Vorstufe der OH<sup>-</sup>-Addition beobachteten. KOSOWER <sup>12)</sup> hat diese Aufweitung bei der Einwirkung von Jodid auf 1-Methyl-nicotinamid beschrieben und als „charge-transfer-Komplex“ gedeutet. Die Aufweitung durch Sulfit ist vom Pyridiniumderivat abhängig und nimmt etwa in der Reihenfolge für



ab. Die induktive Wirkung der Ladungen und der Hyperkonjugationseffekt der Methylgruppe dürften hier noch wirksam sein.

Die in der letzten Spalte der Tab. 2 angegebenen Werte für  $pK_{\text{Diss}}$  stellen gleichfalls ein Maß für die Affinität der Reaktionspartner dar. Ordnet man sie nach ihrer Größe, so erhält man folgende Reihenfolge des abnehmenden Einflusses:



Für die Anlagerung von Sulfit ist also Elektronenmangel in 4-Stellung erforderlich, der mehr oder weniger stark durch die Beanspruchung der Elektronen in der Mesomerie mit den 3-Substituenten erzeugt wird. Hier soll noch erwähnt werden, daß 3-Nitro-pyridin, dessen 1-Methylderivat Sulfit sehr gut addiert, sich im Vergleich mit anderen Pyridinderivaten infolge der Elektronenverarmung am Ring-N etwas schlechter methylieren und sich durch DPNase nicht in ein DPN-Analoges umwandeln läßt.

*Der Einfluß des Substituenten in 1-Stellung:* Es wurden Nicotinsäureamide miteinander verglichen, die am Pyridinstickstoff mit verschiedenen Substituenten quaterniert sind (Tab. 3). Von KARRER und Mitarbb. sind bereits seit 1936/37 die 1-Methyl-<sup>17)</sup>, 1-Benzyl-<sup>18)</sup> und 1-Tetraacetyl-glucosid-Derivate<sup>19)</sup> des Nicotinsäureamids als „DPN-Modelle“ hergestellt und in ihren spektralen und Redox-Eigenschaften untersucht worden. Der von KRÖHNKE und Mitarbb. <sup>11)</sup> eingeführte, relativ unlöslich machende *o,o'*-Dichlorbenzylrest ist speziell zur Isolierung kristalliner PN-Modelle geeignet. Von diesen und anderen Nicotinsäureamidderivaten<sup>20)</sup> wurden von WALLENFELS und Mitarb. <sup>13)</sup> die Cyanid-Addukte hergestellt und untersucht. Vorher hatten KAPLAN und Mitarbb. mit Hydroxylamin<sup>6)</sup> und Cyanid<sup>10)</sup> lediglich durch Einzelextinktions-

<sup>17)</sup> P. KARRER, G. SCHWARZENBACH, F. BENZ und U. SOLMSEN, *Helv. chim. Acta* **19**, 811 [1936].


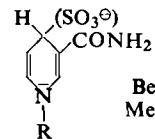
<sup>18)</sup> P. KARRER und F. J. STARE, *Helv. chim. Acta* **20**, 418 [1937].

<sup>19)</sup> P. KARRER, B. H. RINGIER, J. BÜCHI, H. FRITZSCHE und U. SOLMSEN, *Helv. chim. Acta* **20**, 55 [1937].

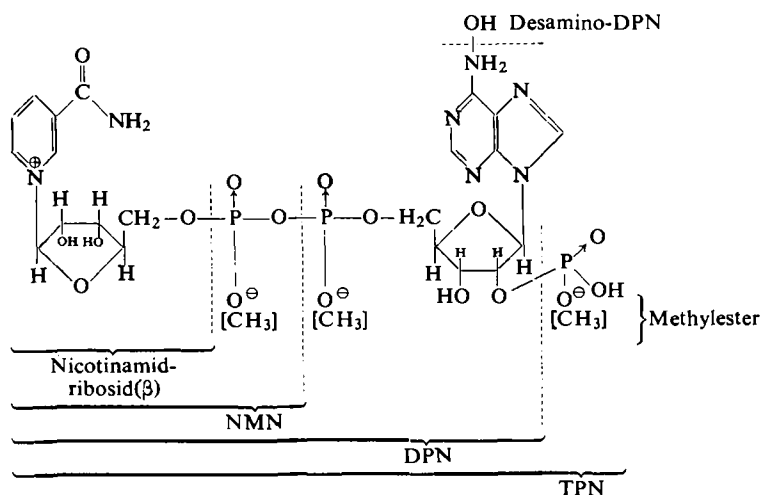
<sup>20)</sup> K. WALLENFELS, H. SCHÜLY und D. HOFMANN, *Liebigs Ann. Chem.* **621**, 106 [1959].

messungen Vergleiche für die Additionsfähigkeit an DPN, NMN, Nicotinsäureamid-ribosid und *N*-Methyl-nicotinsäureamid angestellt.

Tab. 3. UV-Absorptionsspektren und Dissoziationskonstanten der Sulfite-Addukte von 1-substituierten Nicotinsäureamiden

Nr.	R	$\lambda_{\max}$ in $m\mu$ ( $\pm 2$ )		Best.- Meth. *)	$pK_{\text{Diss}}$ ( $\pm 0.1$ )
					
1	CH <sub>3</sub>	263.5	339	b	-1.2
2	CH <sub>2</sub> ·C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	263.5	338	b	-0.4
3	CH <sub>2</sub> ·C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> (2.6)	265	337	a	+0.1
4	Glucose( $\beta$ )	264	316	a	+3.4
5	Tetraacetylglucose( $\beta$ )	264	313	a	+4.0
6	Ribose( $\beta$ )	265	318	a	+2.6
7	Triacetylribose( $\beta$ )	265	317	a	+2.7 $\pm$ 0.3
8	5'-Phosphoribose( $\beta$ ) (NMN)	265	318	a	+1.3
9	Monomethylester von 8	265	318	a	+2.0
10	Dimethylester von 8	265	318	a	+2.6
11	Ribosepyrophosphatadenosin (DPN)	259	320	a	+1.7
12	Monomethylester von 11	259	319	a	+2.0
13	Dimethylester von 11	260	318	a	+2.3 $\pm$ 0.2
14	11 + LDH	259	319	c	> +5
15	Ribosepyrophosphatadenosin-2'-phosphat (TPN)	259	320	a	+1.2
16	Methylester von 15	259	318	a	+1.5 $\pm$ 0.2
17	wie 11, aber OH statt NH <sub>2</sub> im Adeninteil (Desamino-DPN)	249	318	a	+1.3 $\pm$ 0.2

\*) vgl. Tab. 2.



Das NMN (Tab. 3, Nr. 8) war aus DPN durch enzymatische Spaltung mit Kartoffel-Pyrophosphatase und das Ribosid (6) aus dem NMN durch enzymatische Phosphat-  
abspaltung mit Schlangengift-Phosphatase erhalten worden. Das Ribosid wurde auch  
synthetisch dargestellt, wobei das Triacetylribosid (7) mitanfiel, wie bei der Glucosid-  
Synthese (4) das Tetraacetylglucosid (5).

Wie die in Tab. 3 angegebenen  $pK_{\text{Diss}}$ -Werte zeigen, ist die Sulfit-Addition im  
Vergleich zum DPN beim Ribosid (6) und Glucosid (4) des Nicotinsäureamids  
erhöht, beim NMN und TPN aber abgeschwächt. Vom DPN unterscheiden sich die  
beiden einfachen Glykoside durch das Fehlen einer Phosphatgruppe und das NMN und  
TPN dadurch, daß eine nähere bzw. 2 zusätzliche Ladungen einer Phosphatgruppe  
vorliegen. Es können daher für die Herabsetzung der Sulfit-Adduktbildung die  
ionisierten Phosphatgruppen verantwortlich gemacht werden.

Um dieses zu beweisen, veresterten wir die Phosphatgruppen im NMN, DPN und  
TPN successiv mit Diazomethan. Die Auftrennung der anfallenden Produkte erfolgte  
durch Hochspannungspapierelektrophorese<sup>21)</sup>. Während sich beim NMN definierte  
Mono- und Di-ester bildeten, mußte beim DPN ein Gemisch von den Monoestern  
beider Phosphatgruppen anfallen. Hier entstanden außerdem Nebenprodukte durch  
Angriff auf den Adeninteil. Noch ungünstiger war es beim TPN, wo hauptsächlich die  
acideste, dem DPN gegenüber zusätzliche Phosphatgruppe hätte angegriffen werden  
sollen. Hier ließ sich aber nur noch der Monoester, vermutlich ein Isomere-  
gemisch, zur Messung benutzen. Die Meßergebnisse sind hier mit einer gewissen  
Unsicherheit infolge Verunreinigung der Substanzen behaftet. Dennoch bestätigte  
sich, wie aus Tab. 3 hervorgeht, die hemmende Wirkung der ionisierten Phosphat-  
gruppen auf die Addition von Sulfit.

Wie man sieht, steigt die Affinität zum Sulfit vom Ribosid (8) über den Monomethyl-  
ester (9) zum Dimethylester (10) auf den Wert für die phosphatfreie Verbindung (6)  
an. Demnach beruht die additionshemmende Wirkung auf den intramolekularen  
negativen Phosphatgruppen, die durch elektrostatische Abstoßung die Annäherung  
der Sulfitionen erschweren. Eine Neutralisation dieser negativen Ladung, und damit  
eine Erhöhung der Affinität zum Substrat, könnte auch durch Bildung nicht dissozi-  
ierender Salze, wie sie bei der Adsorption von DPN an basische Gruppen von Prote-  
inen vorliegt, oder durch Komplexbildung mit Metallen ( $\text{Zn}^{2+}$  u. a.) eintreten. Wir  
fanden bisher lediglich durch 1 *m* Äthylendiguandinium-acetat einen kleinen der-  
artigen aktivierenden „Abschirmeffekt“ (Tab. I).

Bemerkenswert ist weiterhin die Tatsache, daß das Ribosid in seinem positiveren  
Einfluß auf den Pyridinring durch das Glucosid übertroffen wird. Einen zusätz-  
lichen Effekt verursachen die Acetylgruppen, wie die Differenz zwischen Glucosid (4)  
und Tetraacetylglucosid (5) anzeigt. Die nicht unwesentliche<sup>22)</sup> Konfiguration der  
glykosidischen Bindung wurde bisher nicht besonders berücksichtigt. Die von uns  
gemessenen Substanzen gehören der  $\beta$ -Reihe an. Die Differenz von 0.5 im  $pK_{\text{Diss}}$   
zwischen Benzyl- und 2.6-Dichlorbenzyl-Derivat ist auf den induktiven Effekt der  
beiden Cl-Atome zurückzuführen. Sowohl der Sprung in  $pK_{\text{Diss}}$  von den Alkyl-

<sup>21)</sup> TH. WIELAND und G. PFLEIDERER, *Angew. Chem.* **69**, 199 [1957].

<sup>22)</sup> K. WALLENFELS, M. GELLRICH und F. KUBOWITZ, *Liebigs Ann. Chem.* **621**, 137 [1959].

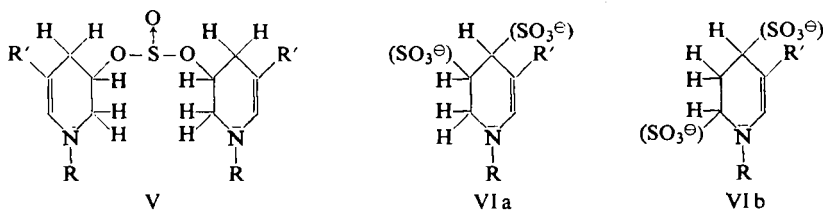
zu den glykosidischen Resten von etwa 2 als auch der zugehörige Sprung der  $\lambda_{\max}$ -Werte um etwa 20 m $\mu$  kommt durch den induktiven Effekt des Brückensauerstoffatoms zustande, wie WALLENFELS und Mitarbb.<sup>22,14)</sup> am Benzyloxymethyl-Derivat mit Cyanid nachweisen konnten.

Den größten  $pK_{\text{Diss}}$ -Wert von allen bisher getesteten Substanzen liefert das durch LDH aktivierte DPN; er liegt über 5, je nach LDH etwa bei 7. Das Addukt zerfällt aber trotzdem bei der Trägerelektrophorese. Vom selben Enzym wurden weder TPN, NMN, DPN-Methylester noch Desamino-DPN in ihrer Sulfid-Affinität aktiviert. In einer anderen Arbeit<sup>1)</sup> war die Aktivierung des DPN zur Sulfid-Adduktbildung durch Äpfelsäuredehydrogenase untersucht worden. Das ternäre Addukt erreicht hier nur ein  $pK_{\text{Diss}}$  von etwa 3.

Für die längstwelligsten  $\lambda_{\max}$ -Werte der Sulfid-Addukte ist aus den Tab. 2 und 3 zu sehen, daß sie sich bei positivierender Wirkung der R-Reste wenig zu kürzeren und der R'-Reste stärker zu längeren Wellen verschieben. Dies ist von Interesse im Zusammenhang mit den Feststellungen, daß sich das  $\lambda_{\max}$  des DPNH von 340 m $\mu$  durch DH verlagern kann, z. B. durch Leber-ADH nach 325 m $\mu$ <sup>23)</sup> oder durch MDH auf 351 m $\mu$ <sup>1)</sup>.

#### 4. Eigenschaften der Pyridinium-Sulfid-Addukte

*Die sekundäre Sulfid-Addition:* Wie schon von E. HAAS<sup>24)</sup> beobachtet wurde, vermag Sulfid mit 1.4-Dihydro-pyridinnucleotid (DPNH), also mit demselben System, wie man es auch bei der DPN-Sulfid-Verbindung vor sich hat, zu reagieren. WALLENFELS und Mitarbb.<sup>25,26)</sup> zeigten, daß sich schweflige Säure an die 5.6-Doppelbindung der 1.4-Dihydro-pyridin-Derivate anlagert und formulierten einen Ester (V). Sie nehmen den Sulfid-Rest in 5-Stellung an, da sie das gleiche Produkt, wenn auch etwa 1000mal langsamer, aus dem entsprechenden 1.6-Dihydro-Derivat erhalten konnten. Wie wir feststellten, erfolgt Sulfid-Anlagerung an 1.4-Dihydropyridin-Derivate auch in schwach alkalischem Medium. Dort verhalten sich nun die Pyridinium-Sulfid-Addukte etwa den entsprechend substituierten 1.4-Dihydro-pyridinen analog, d. h. sie addieren ein zweites Molekül als Hydrogensulfid zu VIa oder VIb.



Diese sekundäre Sulfid-Addition läßt sich spektrophotometrisch verfolgen (Abbild. 6), wie die Bildung eines „Säureprodukts“ aus dem 1.4-Dihydro-pyridin, wobei die Doppelbindung zwischen 5 und 6 ebenfalls, und zwar durch Anlagerung von Was-

<sup>23)</sup> J. VAN EYS, F. E. STOLZENBACH, L. SHERWOOD und N. O. KAPLAN, *Biochim. biophys. Acta* [Amsterdam] **27**, 63 [1958].

<sup>24)</sup> *Biochem. Z.* **288**, 123 [1936].

<sup>25)</sup> K. WALLENFELS und H. SCHÜLY, *Biochem. Z.* **329**, 75 [1957].

<sup>26)</sup> K. WALLENFELS, D. HOFMANN und H. SCHÜLY, *Liebigs Ann. Chem.* **621**, 188 [1959].

ser<sup>27,28)</sup> oder schwachen Säuren<sup>25,26)</sup> aufgehoben wird. Die „Säureprodukte“ der Sulfit-Addukte III, zu denen auch das Anlagerungsprodukt von Hydrogensulfit VI (a oder b) gehört, zeigen das Absorptionsmaximum (in Abbild. 6: 287 m $\mu$ ; aber für R = CH<sub>3</sub>, R' = NO<sub>2</sub>: 370 m $\mu$ ) nur um etwa 4 m $\mu$  kürzerwellig als die von 1.4-Dihydropyridinen<sup>29)</sup> abgeleiteten. Dessen genaue Feststellung ist deshalb erschwert, weil die neue Bande vielfach von der der Pyridiniumverbindung II überlagert wird, die immer mit ihrem Sulfit-Addukt III im Gleichgewicht steht. Da bei weitgehender Bildung von VI (a oder b) III nicht im selben Maß verschwindet, sondern durch die vorgelagerte Reaktion aus II + Sulfit nachgebildet wird, geht die langwellige Absorption (338 m $\mu$ ) relativ langsam auf den Wert 0 zurück.

Aus dem Schema ist ersichtlich, daß die Geschwindigkeit der Entstehung des Sekundärprodukts VI nicht nur von der Sulfit-Konzentration, sondern auch vom  $p_H$  abhängig sein muß: Bei kleiner  $[H^+]$  ( $p_H > 7$ ) läuft zwar Reaktion II  $\rightleftharpoons$  III nach rechts, jedoch sind dann nur wenig oder gar keine HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Ionen für die Reaktion III  $\rightarrow$  VI verfügbar. Bei großer  $[H^+]$  könnte bei Sulfit-Überschuß die

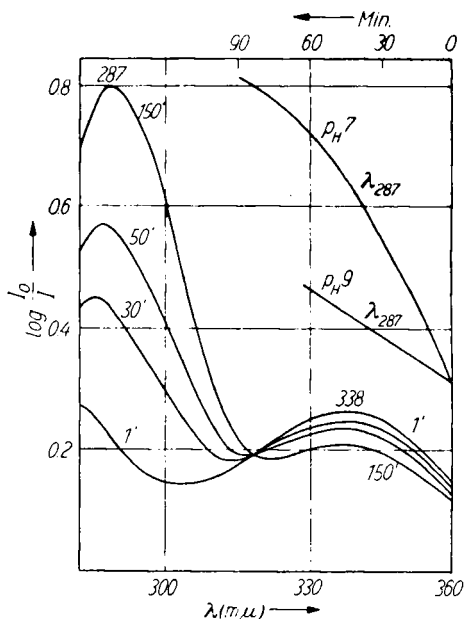
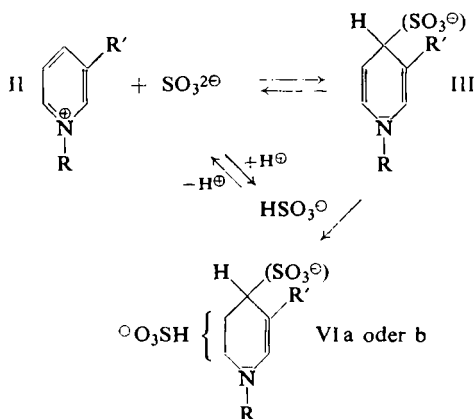


Abbildung 6. Sekundäre Sulfit-Anlagerung.  
2 · 10<sup>-4</sup> m [1-Benzyl-nicotinsäureamid]-chlorid  
in 0.2 m Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>,  $p_H$  7 bzw.  $p_H$  9



<sup>27)</sup> G. W. RAFTER und S. P. COLOWICK, J. biol. Chemistry **224**, 373 [1957].

<sup>28)</sup> A. G. ANDERSON JR. und G. BERKELHAMMER, J. Amer. chem. Soc. **80**, 992 [1958]; J. org. Chemistry **23**, 1109 [1958].

<sup>29)</sup> G. PFLEIDERER, Angew. Chem. **72**, 160 [1960].

Endreaktion rasch ablaufen, doch ist dann die Bildung von III aus II rückläufig oder unmöglich. Das optimale  $p_H$  liegt bei etwa 7.

Bezüglich des Einflusses der Reste R und R' ist festzustellen, daß die sekundäre  $\text{HSO}_3^-$ -Addition durch dieselben elektronischen Eigenschaften beeinflusst wird, die auch auf die primäre Sulfit-Addition einwirken.

*Zur Bindung des Sulfits in den primären Addukten:* Durch die beschriebene Hydrogensulfit-Anlagerung zeigen die Pyridinium-Sulfit-Addukte ihre 1.4-Dihydro-pyridin-Struktur mit reaktionsfähiger 5.6-Doppelbindung. Sie geben mit Alkalihydroxyden die Pseudobasen und liefern bei der katalytischen Hydrierung S-freie Piperidinderivate<sup>30)</sup>. Diese stellten KRÖHNKE und Mitarbb.<sup>11)</sup> auch bei den entsprechenden Methylketon-Addukten fest. In diesen Fällen reagiert also das dissoziierte Pyridinium-Kation schneller als das undissoziierte Addukt. Die daraus ersichtliche sehr lockere Bindungsart des Sulfits geht auch aus den IR-Spektren der Addukte hervor.

Diese wurden von folgenden Substanzen in KBr aufgenommen: 1-Methyl-3-cyan-pyridinium-jodid, dessen Sulfit-Addukt ( $p_H$  10),  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , 1-Methyl-3-cyan-1.4-dihydro-pyridin und der Benzaldehyd-hydrogensulfitverbindung. Durch Vergleichen der Spektren konnte ausgesagt werden, daß das kristalline Sulfit-Addukt, das frei von der Sekundärverbindung war, zu etwas über 50% aus seinen beiden Komponenten, dem Pyridiniumsalz und dem freien Sulfit, bestand. Es enthielt aber gleichzeitig mehrere Banden des 1.4-Dihydro-pyridin-Derivats, z. B. eine bei 1683/cm. In etwa gleichem Anteil trat eine Sulfonsäurebande bei 1190/cm auf. Diese wurde ebenfalls von der Benzaldehyd-hydrogensulfitverbindung gezeigt, allerdings viel stärker ausgeprägt. Da nur bis zu 15  $\mu$  gemessen werden konnte, war der C—S-Schwingungsbereich nicht mehr feststellbar.

Vermutlich beruht die im Vergleich zur echten Aldehyd-hydrogensulfitverbindung erheblich geringere Bindungsfestigkeit auf der hohen Rearomatisierungstendenz des Pyridins, die erst durch Quartärsalzbildung und elektronenanziehende 3-Substituenten herabgesetzt wird. Die Erhöhung der Pyridiniumbanden-Halbwertsbreiten bei den Derivaten ohne ausreichende Positivierung und das Verhalten in Lösungsmitteln kleinerer  $DK$  weist auch für die Sulfit-Addukte auf einen aktivierten Übergangszustand bzw. einen Elektronen-Donator-Acceptor-Komplex als Zwischenzustand hin.

Als Ort der Bindung kommt für eine nucleophile Addition, wie auch für eine partielle Hydrierung am Pyridiniumring, vor allem die 2-, 4- oder 6-Stellung in Frage. Für die Sulfit-Addition ist es nach den obigen experimentellen Daten, die auch bei der  $\text{H}^+$ -Aufnahme bevorzugte 4-Stellung. Dies geht aus Vergleichen mit den 1.2-, 1.4- und 1.6-Dihydro-pyridin-Derivaten im Reaktionsverhalten und in den UV- und IR-Spektren hervor: Die sekundäre Sulfit-Addition verläuft nur bei den 1.4-Dihydro-Derivaten mit relativ hoher Geschwindigkeit, die UV-Spektren entsprechen, wie oben bereits gesagt, nur den 1.4-Dihydro-pyridin-Derivaten<sup>15)</sup>. Deshalb darf man die *primären Sulfit-Addukte* III als *1-Alkyl-1.4-dihydro-pyridin-4-sulfonate* formulieren, wobei wir die große Labilität der C—S-Bindung durch Einklammern des Substituenten andeuten.

<sup>30)</sup> E. SANN, Diplomarb. Univ. Frankfurt a. M. 1959.

Unser besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. TH. WIELAND für sein großes Interesse an dieser Arbeit. Er hat unsere Untersuchungen von Anfang an unterstützt und wichtige Hinweise gegeben.

Herrn Privatdozent Dr. H. FRITZ danken wir für Beratung bei der Beurteilung der IR-Spektren.

Der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT sind wir für Sachbeihilfe zu großem Dank verpflichtet. Ferner wurden unsere Arbeiten durch den FONDS DER CHEMISCHEN INDUSTRIE unterstützt.

## BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

### 1.3-Substituierte Pyridiniumsalze

Die als Ausgangsprodukte verwendeten Pyridin-3-Derivate sind käufliche Präparate oder wurden nach bekannten Methoden dargestellt (UV-Spektren s. Tab. 2).

*Nicotinsäure-methylanilid*: 6 g *Nicotinsäurechlorid-hydrochlorid* werden mit 5 ccm *Methylanilin* 3 Stdn. bei 170° verschmolzen. Nach dem Erkalten wird in Wasser aufgenommen und aus alkalischer Lösung ausgeäthert. Die getrocknete Ätherphase wird i. Vak., zuletzt an der Ölpumpe, fraktioniert destilliert und aus Chloroform mit Petroläther umkristallisiert. Farblose Kristalle vom Schmp. 110°. Ausb. 4 g (65% d. Th.).

*3-Substituierte 1-Methyl-pyridinium-jodide*: Wie bei KARRER<sup>17)</sup> und KAPLAN<sup>10)</sup> werden 0.02 Mol Nicotinsäurederivat (-amide, -ester, -säure, -aldehyd, -nitril) bzw. 3-Acetyl-, 3-Methyl- oder 3-Carbomethoxymethyl-pyridin in 6 ccm Methanol und 4 ccm Methyljodid gelöst bzw. aufgeschlämmt und 4 Stdn. unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Nach Einengen wird das Jodid aus Methanol evtl. unter Ätherzusatz umkristallisiert und i. Vak. getrocknet. — Äthylamid- und Äthylester-Derivate kristallisieren schwer. — Für das doppelt zu quaternisierende Picolyl-(3)-amin werden 6 ccm Methyljodid benutzt. — 0.02 ccm 3-Nitro-pyridin werden mit 4 ccm Methyljodid im Einschlußrohr 3 Stdn. auf 100° erhitzt und wie oben isoliert<sup>31)</sup>.

Hellgelbe bis gelbe Kristalle vom Schmp. (Nr. in Tab. 2):

1) 209°, 2) 176°, 3) 145°, 4) 181°, 5) 150°, 6) 135°, 7) 180°, 8) 132°, 9) 100°, 10) 123°, 11) 215° (Zers.), 12) 90°, 13) 162°, 14) 196°, 15) 215° (Zers.), 16) 95°, 17) 190°. Ausb. 75–100% d. Th.

Die Reinheit wurde durch Analysen und Elektrophoresen überprüft. UV-Spektren s. Tab. 2.

Die Umwandlung einiger Jodide in Chloride erfolgte durch Anionenaustauscher (Dowex 2-Cl) in der Säule.

Von den 1-substituierten 3-Aminoformyl-pyridiniumsalzen wurde das 1-Benzyl-3-aminoformyl-pyridinium-chlorid (Schmp. 232°) nach KARRER und Mitarb.<sup>18)</sup> durch 2stdg. Rückflußkochen von 0.03 Mol Nicotinsäureamid mit 40 ccm Benzylchlorid und das 1-[2.6-Dichlor-benzyl]-3-aminoformyl-pyridinium-bromid (Schmp. 242°) nach KRÖHNKE und Mitarb.<sup>11)</sup> durch 5stdg. Rückflußkochen von 0.02 Mol Nicotinsäureamid mit 25 ccm Aceton und 5 g 2.6-Dichlor-benzylbromid erhalten. 1-β-Tetraacetylglucosido-nicotinsäureamid-bromid<sup>\*)</sup> (Schmp. 198°) wurde nach KARRER und Mitarb.<sup>19)</sup> dargestellt und das 1-β-Glucosidonicotinsäureamid-bromid aus jenem durch Desacetylierung<sup>32)</sup> erhalten: 18stdg. Stehenlassen, 20-proz. in 3-proz. HBr bei 30°, Einengen i. Vak. bei 30° zur sirupösen Konsistenz und Umkristallisieren aus Methanol unter Ätherzusatz (Zers. 150°).

\*) Von Herrn Dipl.-Chem. F. GALLE, D. GERLACH und Frau Dr. E. MERZ freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

<sup>31)</sup> A. E. TSCHITSCHIBABIN und A. W. KIRSSANOW, Ber. dtsch. chem. Ges. **61**, 1226 [1928].

<sup>32)</sup> M. VISCONTINI, R. HOCHREUTER und P. KARRER, Helv. chim. Acta **36**, 1777 [1953].



Das 1-Triacetylribosid und das Ribosid des Nicotinsäureamids \*) wurden ebenfalls nach KARRER und Mitarbb.<sup>33)</sup> synthetisiert.

DPN und TPN sind käufliche Präparate (BOEHRINGER, Mannheim).

NMN \*) wurde durch enzymatische Spaltung von DPN mit Kartoffel-Pyrophosphatase und anschließende Isolierung (Kohleadsorption, AMP-Abtrennung durch Anionen-Austauschersäule (Amberlite IRA 400), Acetonfällung bei  $p_H$  3) frei nach PLAUT<sup>34)</sup> kristallin erhalten.

Das 1- $\beta$ -Ribosid des Nicotinamids wurde durch enzymatische Schlangengift-Phosphatase-Spaltung aus NMN gewonnen<sup>35)</sup>. Es war mit dem synthetisierten Ribosid bei der Elektrophorese identisch.

Desamino-DPN \*) wurde aus DPN durch chemische Desaminierung mit Nitrit hergestellt<sup>36)</sup>.

Zur Darstellung der NMN-, DPN- und TPN-Mono- und -Dimethylester wurden jeweils 0.1 mMol NMN, DPN bzw. TPN in 0.5 ccm Wasser unter langsamem Eintragen von 2 ccm frischer, ätherischer Diazomethanlösung (2 mMol) gut geschüttelt und bei 25° stengelassen. Nach einigen Stunden wurde im Wasserbad i. Vak. eingengt und durch Hochspannungselektrophorese<sup>21)</sup> in  $m/10$  Tris-citrat-Puffer  $p_H$  8.0 bis zu einwandfreier Bandenaufspaltung einige Stunden getrennt. Die Banden mit entsprechender Ladung, im Teststreifen mittels UV-Licht durch ihre Absorption und nach Methyläthylketon/Ammoniak-Behandlung<sup>37)</sup> durch ihre Fluoreszenz erkannt, wurden eluiert und gefriergetrocknet.

#### Bestimmung der $K_{Diss}$

Die allgemeinen Methoden sind oben (S. 3086) beschrieben, die Meßbedingungen unter den Tab. angegeben. Das Äthylendiguandiniumsalz wurde durch Anlagerung von 2 Moll. S-Methyl-isothioharnstoff an Äthylendiamin erhalten<sup>38)</sup>. 1 *m* Sulfit-Lösungen konnten wegen ihrer Oxydierbarkeit nur kurze, beschränkte Zeit Verwendung finden. Die  $p_H$ -Einstellungen erfolgten mit Glaselektrode. Die UV-spektrophotometrischen Messungen wurden in Quarz-Stöpselküvetten (3 ccm,  $d = 1$  cm) mit dem registrierenden Spektralphotometer von Beckman „Modell DK 2“ und in einigen Fällen mit dem Zeiss-Spektralphotometer „PMQ II“ ausgeführt.

<sup>33)</sup> M. VISCONTINI, M. MARTI und P. KARRER, *Helv. chim. Acta* **37**, 1373 [1954].

<sup>34)</sup> G. W. E. PLAUT und K. A. PLAUT, *Arch. Biochem. Biophysics* **48**, 189 [1954].

<sup>35)</sup> R. M. BURTON und N. O. KAPLAN, *J. biol. Chemistry* **206**, 283 [1954].

<sup>36)</sup> N. O. KAPLAN, S. P. COLOWICK und M. M. CIOTTI, *J. biol. Chemistry* **194**, 579 [1952].

<sup>37)</sup> E. KODICEK und K. K. REDDI, *Nature [London]* **168**, 475 [1951].

<sup>38)</sup> M. SCHENCK und H. KIRCHHOF, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **158**, 100 [1926].