

77. Über einen Bestandteil von gegen perniciöse Anämie
hochaktiven Leberpräparaten
von P. Karrer, P. Frei und H. Fritzsche.
(15. V. 37.)

Leberpräparate, die bei perniciöser Anämie beim Menschen in einer einmaligen Dépôt-dosis von 10—20 mg einen vollen anti-anämischen Effekt besitzen, enthalten erhebliche Mengen Phosphor, und zwar scheint dessen Menge parallel der Wirksamkeit der Präparate anzusteigen. In unseren bisher hochwertigsten Präparaten betrug er ca. 3,8 %. Parallel damit verläuft ein entsprechender Gehalt an Pentose und Adenin (isoliert als Pikrat; Zersetzungspunkt 285°, N gef. 30,8 % ber. 30,76 %). Solche hochaktive Präparate enthalten daher sehr wahrscheinlich ein Adenin-Nucleotid, und es wird weiter zu prüfen sein, ob dieses mit ihrer Wirksamkeit in ursächlicher Beziehung steht.

Über die Darstellung der Präparate wird später berichtet werden. Die weitere Reinigung des Nucleotids wird fortgesetzt.

Die klinischen Versuche werden durch Herrn Dr. F. Koller (Medizinische Universitätsklinik Zürich) ausgeführt.

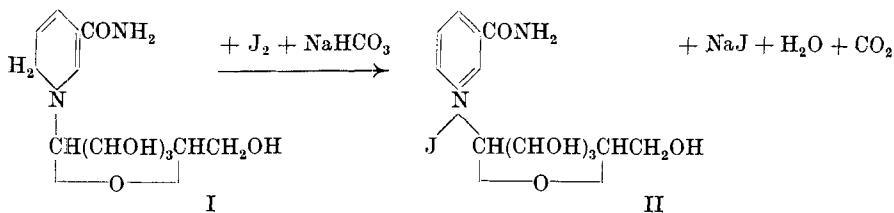
Zürich, Chemisches Institut der Universität.

78. Reduktionswirkungen des N-Glucosido-o-dihydro-nicotinsäure-amids und analoger Verbindungen
von P. Karrer und B. H. Ringier.
(15. V. 37.)

Während die homologen N-Alkyl-o-dihydro-nicotinsäure-amide schon durch Kaliumferricyanid oxydiert und in dieser Weise quantitativ bestimmt werden können¹⁾, sprechen die N-Glucosido-o-dihydro-nicotinsäure-amide auf dieses Oxydationsmittel nicht an²⁾. Dagegen lassen sie sich, wie wir jetzt feststellten, bei Anwesenheit von Natriumbicarbonat mit Jod titrieren, so dass die Kontrolle ihres Reinheitsgrades auf diesem Wege möglich ist. Die Reaktionen vollziehen sich nach der Gleichung

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

²⁾ P. Karrer, Ringier, Büchi, Fritzsche, Solmsen, Helv. **20**, 55 (1937), insbesondere S. 58 ff.



Gleichzeitig ist damit eine Methode zur Rückgewinnung der N-Glucosido-pyridinium-3-carbonsäure-amid-salze aus den o-Dihydro-nicotinsäure-amid-derivaten in präparativem Maßstab gegeben. Wir haben das Jodid II isoliert und uns überzeugt, dass es sich durch Reduktion mit Natriumhyposulfit wieder zum N-Glucosido-o-dihydro-nicotinsäure-amid I reduzieren lässt; die Reindarstellung des Jodids II ist allerdings mit gewissen Schwierigkeiten und Substanzverlusten verknüpft. Leichter gewinnt man sein gut krystallisiertes Tetracetat, das sich bei der Oxydation des N-Tetracetyl-glucosido-o-dihydro-nicotinsäure-amids mittels Jod bildet.

Es ist vorauszusehen, dass sich auch Dihydro-cozymase (Dihydro-codehydrase I, Dihydro-diphosphopyridin-nucleotid) sowie Dihydro-triphosphopyridin-nucleotid (reduziertes wasserstoffübertragendes Coferment, Dihydro-codehydrase II) in gleicher Weise durch Jod zu den Cofermenten zurückoxydieren lassen und dass sie bei Abwesenheit anderer Jod-bindender Substanzen in dieser Weise bestimmt werden können.

Nach den Untersuchungen von *H. v. Euler* und *E. Adler*¹⁾ kommen die reduzierten Formen der Cofermente in nicht unbedeutenden Mengen in den Zellen vor. Bei der starken Reduktionswirkung dieser Verbindungen können sie daher unter Umständen zu Fehlerquellen werden, wenn man andere reduzierende Substanzen auf Grund ihrer Reduktionswirkung ermittelt. So stützt sich bekanntlich die Bestimmung der Ascorbinsäure (Vitamin C) ausschliesslich auf verschiedene Reduktionswirkungen dieser Substanz.

Wir haben mit der Modellsubstanz für die reduzierten Cofermente, dem N-Glucosido-o-dihydro-nicotinsäure-amid, einige Reduktionsversuche unter Bedingungen vorgenommen, wie sie gewöhnlich beim Ascorbinsäure-Nachweis oder bei der Ascorbinsäure-Bestimmung gewählt werden. Dichlorphenol-indophenol, das *Tillmanns* zur Ascorbinsäuretitration einführte, wird auch durch N-Glucosido-o-dihydro-nicotinsäure-amid in schwach saurer (z. B. essigsaurer) Lösung entfärbt, allerdings bedeutend langsamer als durch Ascorbinsäure; nach 5 Minuten waren z. B. 38 %, nach 60 Minuten 78 % der theoretischen Menge des Indophenolfarbstoffs reduziert. — Silbersalzlösung, die z. B. zum Nachweis der Ascorbinsäure

¹⁾ *E. Adler* und *H. v. Euler*, Svensk Kemisk Tidskrift, **48**, 221 (1936).

in Schnitten von Nebennierenrinde empfohlen wurde, wird auch durch N-Glucosido-o-dihydro-nicotinsäure-amid zu Silber reduziert, jedoch ebenfalls bedeutend langsamer als durch Vitamin C. Unsere o-Dihydro-nicotinsäure-amidverbindung reduziert schliesslich beim Erhitzen in soda-alkalischer Lösung auch o-Dinitrobenzol zu einer violetten Reduktionsstufe, die vermutlich mit o-Nitrophenyl-hydroxylamin identisch ist¹⁾.

Wenn auch alle diese Reduktionsvorgänge durch Ascorbinsäure beträchtlich rascher bewirkt werden als durch N-Glucosido-o-dihydro-nicotinsäure-amid, so ist doch damit zu rechnen, dass die analytisch durch Reduktionsprozesse erfassten Ascorbinsäuremengen etwas zu hoch ausfallen können, wenn gleichzeitig Verbindungen vom Typus der hydrierten Cofermente zugegen sind.

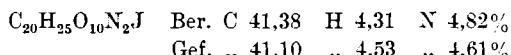
Auch andere Wirkungen des N-Glucosido-o-dihydro-nicotinsäure-amids, die vermutlich mit dessen Reduktionsvermögen zusammenhängen, erinnern an Einflüsse der Ascorbinsäure. So hat Herr W. Straus festgestellt, dass inaktives Cathepsin durch N-Glucosido-o-dihydro-nicotinsäure-amid aktiviert werden kann; einen gleichartigen Einfluss übt nach unseren früheren Feststellungen²⁾ Ascorbinsäure aus. Über den Einfluss der o-Dihydro-pyridin-Verbindungen auf verschiedene Fermente soll später in anderem Zusammenhang berichtet werden.

Experimenteller Teil.

Oxydation von N-Tetracetyl-d-glucosido-o-dihydro-nicotinsäure-amid mit Jod.

300 mg N-Tetracetyl-d-glucosido-o-dihydro-nicotinsäure-amid werden in einer Mischung von 10 cm³ Alkohol und 10 cm³ Wasser gelöst, 60 mg Natriumbicarbonat eingetragen und unter gutem Rühren tropfenweise mit 0,1-n. Jodlösung titriert. Es wurden 13,00 cm³ Jodlösung verbraucht, d. h. genau die theoretische Menge, da sich diese zu 13,01 cm³ berechnet.

Nach beendigtem Jodzusatz wurde die Lösung mit einigen Tropfen Jodwasserstoffsäure schwach kongosäuer gemacht und bei 30° im Vakuum eingedampft. Den Rückstand krystallisierten wir zweimal aus absolutem Alkohol um. Dabei wurde das N-Tetracetyl-glucosido-pyridinium-3-carbonsäure-amid-jodid in gut krystallisierter Form erhalten.



¹⁾ Vgl. die Reduktion von o-Dinitrobenzol durch Ascorbinsäure zu o-Nitrophenyl-hydroxylamin, R. Kuhn, F. Weygand, B. **69**, 1969 (1936).

²⁾ P. Karrer, F. Zehender, Helv. **16**, 701 (1933); H. v. Euler, P. Karrer und F. Zehender, Helv. **17**, 157 (1934).

Oxydation des N-d-Glucosido-o-dihydro-nicotinsäure-amids mit Jod.

a) Titrimetrische Bestimmung.

50,0 g mg N-d-Glucosido-o-dihydro-nicotinsäure-amid wurden in Wasser gelöst, 20 mg Natriumbicarbonat hinzugefügt und unter gutem Schütteln mit 0,1-n. Jodlösung titriert. (Indikator Stärke). Verbrauch 13,40 cm³ Jodlösung. Berechnet 13,45 cm³.

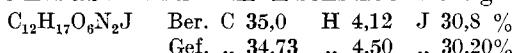
b) Präparative Oxydation. Bei der Darstellung des 3-Carbonsäure-amids des N-d-Glucosido-pyridinium-jodids aus N-Glucosido-o-dihydro-nicotinsäure-amids durch Oxydation mit Jod müssen bestimmte Reaktionsbedingungen eingehalten werden, damit man das Jodid in einigermassen reiner Form isolieren kann. Anfänglich arbeiteten wir mit einem grösseren Überschuss von Natriumbicarbonat, das nach beendigter Oxydation durch Zugabe von Jodwasserstoffsäure in Natriumjodid übergeführt wurde. Doch erschwerte diese Arbeitsweise die Gewinnung des reinen Jodids.

Zweckmässig verfährt man z. B. in folgender Weise:

2,135 g N-d-Glucosido-o-dihydro-nicotinsäure-amid werden in Wasser gelöst, dazu gibt man 0,65 g Natriumbicarbonat und hierauf unter starkem Rühren die berechnete Menge 0,1-n. Jodlösung (147 cm³).

Nach beendigter Reaktion wird die Flüssigkeit im Vakuum verdampft, der Rückstand in Alkohol gelöst, mit Äther gefällt und nach dem Trocknen zweimal mit je 10—12 cm³ absolutem Pyridin ausgezogen; der Pyridinextrakt wurde im Vakuum verdampft und der zurückbleibende Rückstand aus absolutem Alkohol umkristallisiert.

Auch jetzt enthielt die ausgeschiedene Verbindung noch wesentlich zu wenig Jod. Wir haben sie hierauf unter Zusatz von 2 Tropfen konz. Jodwasserstoffsäure nochmals aus Alkohol umkristallisiert und dabei in nicht ganz reiner aber immerhin in sehr hochwertiger Form erhalten.



Das Jodid ist in Wasser spielend löslich, in absolutem Alkohol nur in der Hitze und auch da recht schwer. Bei der Einwirkung von Natriumhyposulfit in bicarbonat- oder soda-alkalischer Lösung wird es wieder zu N-Glucosido-o-dihydro-nicotinsäure-amid reduziert.

c) Manometrische Messung der Reduktion des 3-Carbonsäure-amids des N-Glucosido-pyridinium-jodids. Die Reduktion wurde nach Warburg und Christian¹⁾ durch manometrische Messung des entwickelten Kohlendioxyds verfolgt.

21,3 mg Substanz setzten innerhalb 30 Minuten 2,36 cm³, innerhalb 60 Minuten 2,64 cm³ CO₂ frei. Berechnet für die Reduktion zur Dihydroverbindung 2,34 cm³ CO₂.

Die geringfügige Überschreitung des theoretischen Werts erklärt sich daraus, dass das verwendete Jodid nur 29,75 % Jod statt 30,8 % Jod enthielt.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

¹⁾ Bioch. Z. 282, 157 (1935); 287, 291 (1936).