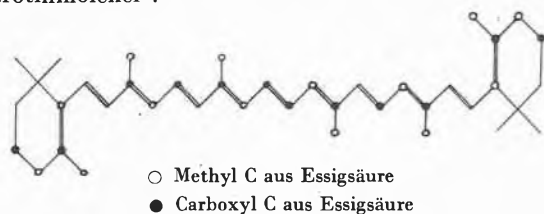


## KURZE MITTEILUNGEN

Bis am 20. des Monats bei der Redaktion eingehende kurze Mitteilungen werden in der Regel am 15. des folgenden Monats veröffentlicht

## Neues über die Biosynthese der Carotinoide\*

Zahlreiche Schimmelpilze fallen durch ihre hohe Carotinproduktion auf. Viele von ihnen lassen sich ohne Beeinträchtigung ihrer Carotinbildung auf synthetischen Nährlösungen kultivieren, wobei als Kohlenstoffquelle meist Glucose dargeboten wird. Ersetzt man bei *Phycomyces blakesleeanus* und *Mucor hiemalis* die Glucose durch Essigsäure, so wird eine beachtliche Steigerung der Carotinbildung festgestellt. Daraus kann geschlossen werden, daß die Essigsäure als primitivste Vorstufe der Carotinoide zu betrachten ist. Der oxydative Abbau des von *Mucor hiemalis* aus  $^{14}\text{C}$ -markiertem Acetat gebildeten  $\beta$ -Carotins lieferte die im untenstehenden Schema angegebene Verteilung der Essigsäure-C-Atome in der Carotinmolekel<sup>1</sup>.

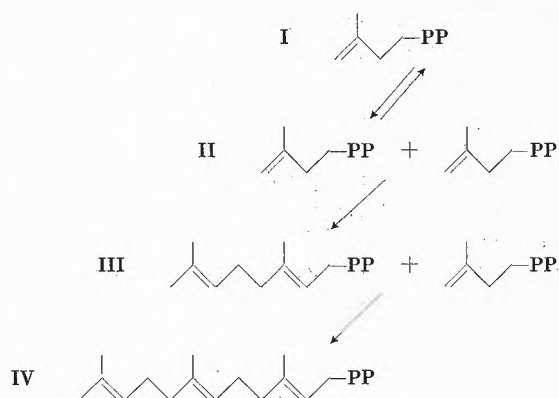


Die Essigsäure-C-Atome werden regelmäßig im  $\beta$ -Carotin eingebaut, wobei in allen Isopreneinheiten dieselbe Anordnung zu finden ist. Dies läßt sich darauf zurückführen, daß aus der Essigsäure zunächst die  $\text{C}_5$ -Bausteine gebildet werden, aus denen dann die Isoprenkette aufgebaut wird. Zum gleichen Ergebnis ist man bei der Untersuchung anderer isoprenoider Naturstoffe gelangt, womit die biogenetische Isoprenregel von Ruzicka<sup>2</sup>, wonach alle isoprenoiden Verbindungen in der Natur aus einer gemeinsamen  $\text{C}_5$ -Vorstufe hervorgehen, ihre experimentelle Bestätigung gefunden hat.

Es sind in der Natur verschiedene Verbindungen aufgefunden worden, die das Kohlenstoffgerüst des Isoprens aufweisen und die man als mögliche  $\text{C}_5$ -Vorstufen in Betracht gezogen hat (z. B.  $\beta$ -Methylcrotonsäure,  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methylglutarsäure,  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methylvaleriansäure). Die strukturelle Verwandtschaft des von Folkers isolierten und in seiner Konstitution aufgeklärten acetatpährenden Faktors, Mevalonsäure<sup>3</sup>, mit  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methylglutarsäure, bewog Tavormina<sup>4</sup>,

ihre biologische Aktivität als Vorstufe in der Biosynthese des Squalens zu prüfen. Im Gegensatz zu den zuerst angeführten Verbindungen wird die Mevalonsäure quantitativ in Squalen bzw. Cholesterin eingebaut. Die Mevalonsäure ist auch im Aufbau der Carotinoide aktiv<sup>5,6</sup>. Bei der Mevalonsäure muß es sich demnach um eine Verbindung handeln, die dem postulierten «aktiven Isopren» recht nahe steht.

Bei der Untersuchung der biologischen Umwandlung von Mevalonsäure in Squalen konnten Bloch<sup>7</sup> und Lynen<sup>8,9</sup> das «aktive Isopren» isolieren und mit  $\Delta^3$ -Isopentenylpyrophosphat (I) identifizieren. Weitere Arbeiten<sup>10,11,12,13</sup> führten zur Aufklärung des Kondensationsmechanismus, nach dem die  $\text{C}_5$ -Einheiten zu aliphatischen Isoprenketten verknüpft werden:



In einer vorgelagerten Reaktion wird die Doppelbindung von Isopentenylpyrophosphat (I) zum Dimethylallylpyrophosphat (II)<sup>10,11</sup> umgelagert (Isopentenylpyrophosphat-Isomerase), dem ersten Allylpyrophosphat, das den Aufbau der Isoprenkette auslöst. Die Alkylierung des Isopentenylpyrophosphats (I) mit II führt zum Geranylpyrophosphat (III)<sup>10</sup>, das mit einer zweiten Molekel I zum Farnesylpyrophosphat (IV)<sup>8</sup> verlängert wird (Farnesylpyrophosphat-Synthetase). Der

\* Nach einem Vortrag, gehalten von E. C. Grob in der Winterversammlung der Schweizerischen Chemischen Gesellschaft in Fribourg am 11. Februar 1961.

<sup>1</sup> E. C. Grob und R. Büttler, *Helv. Chim. Acta* 39 (1956) 1975.

<sup>2</sup> L. Ruzicka, *Experientia* 9 (1953) 357.

<sup>3</sup> L. D. Wright, E. L. Cresson, H. R. Skeggs, G. D. E. Macrae, C. H. Hoffman, D. E. Wolf und K. Folkers, *J. Amer. Chem. Soc.* 78 (1956) 5273.

<sup>4</sup> P. A. Tavormina, M. H. Gibbs und J. W. Huff, *J. Amer. Chem. Soc.* 78 (1956) 4498.

<sup>5</sup> E. C. Grob, *Chimia* 11 (1957) 378.

<sup>6</sup> G. D. Braithwaite und T. W. Goodwin, *Biochem. J.* 65 (1957) 31.

<sup>7</sup> S. Chaykin, J. Law, A. H. Phillips, T. T. Tchen und K. Bloch, *Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.)* 44 (1958) 998.

<sup>8</sup> F. Lynen, H. Eggerer, U. Henning und I. Kessel, *Angew. Chem.* 70 (1958) 738.

<sup>9</sup> H. Eggerer und F. Lynen, *Liebigs Ann. Chem.* 630 (1960) 58.

<sup>10</sup> F. Lynen, B. W. Agranoff, H. Eggerer, U. Henning und E. M. Möslein, *Angew. Chem.* 71 (1959) 657.

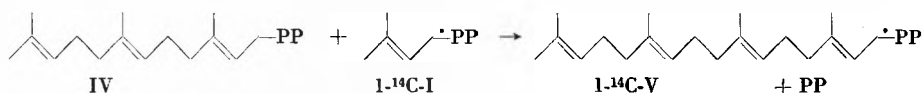
<sup>11</sup> B. W. Agranoff, H. Eggerer, U. Henning und F. Lynen, *J. Biol. Chem.* 235 (1960) 326.

<sup>12</sup> F. Lynen und U. Henning, *Angew. Chem.* 72 (1960) 820.

<sup>13</sup> U. Henning, E. M. Möslein, B. Arreguin und F. Lynen, *Biochem. Z.* 333 (1961) 534.

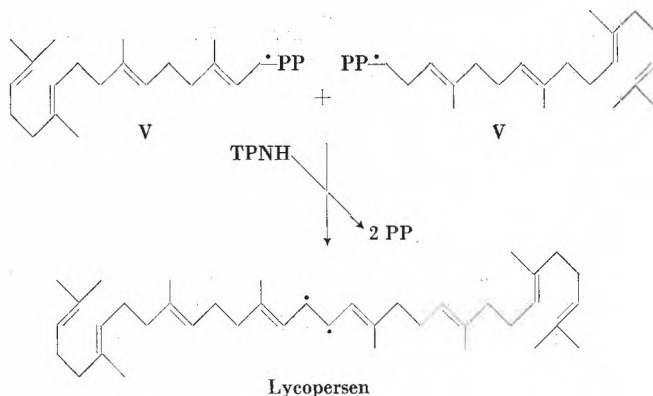
Einbau von Isopentenyl-pyrophosphat (I) in der Makromolekel des Kautschuks<sup>12, 13</sup> beweist die Allgemeingültigkeit des Mechanismus für den Aufbau von Isoprenketten.

Bei systematischen Untersuchungen<sup>14</sup> konnten wir vor kurzem die Biosynthese von Geranylgeranyl-pyrophosphat (V) aufklären. Aus Bäckerhefe wurde ein Enzym 5fach angereichert, das die Alkylierung von Isopentenyl-pyrophosphat (I) mit Farnesyl-pyrophosphat (IV) unter Bildung von Geranylgeranyl-pyrophosphat (V) katalysiert. Hemmt man die im Hefe-Extrakt befindliche Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase<sup>10, 11</sup> mit Jodacetamid, so kann die Terpensynthese nur durch Zusatz eines Allyl-pyrophosphats wieder in Gang gebracht werden. Bei der Inkubation von synthetischem Farnesyl-pyrophosphat (IV) (nach EGGERER<sup>15</sup> synthetisiert),  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Isopentenyl-pyrophosphat<sup>9</sup> und  $\text{Mg}^{++}$  ( $6 \cdot 10^{-3}$ ) mit Enzym, das mit  $10^{-3}$  m Jodacetamid vorinkubiert wurde, bildete sich eine neue, radioaktive, wasserlösliche Verbindung, die durch  $1\text{-}n$   $\text{HClO}_4$  rasch hydrolysiert wird. Die Spaltung des Reaktionsproduktes mit Phosphatase führt ausschließlich zum Geranylgeraniol (VI). Der radioaktive Alkohol wurde in den kristallisierten 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-4-ester<sup>16</sup> übergeführt und zur konstanten spezifischen Radioaktivität umkristallisiert. Das bei der Säurespaltung von  $^{32}\text{P}$ -Geranylgeranyl-pyrophosphat (V) in der wässrigen Phase verbleibende Bruchstück wurde papierchromatographisch mit anorganischem Pyrophosphat identifiziert. Die enzymatische Reaktion besitzt ein scharfes pH-Optimum bei pH 6,0 und verwendet nur den Pyrophosphorsäure-Ester des Farnesols (IV). Farnesyl-phosphat ist inaktiv. Mehrere Befunde sprechen dafür, daß das Enzym mit der Farnesyl-pyrophosphat-Synthetase<sup>8</sup> identisch ist. Allerdings verläuft die Synthese von Geranylgeranyl-pyrophosphat (V) etwa 150 mal langsamer als die Bildung von Farnesyl-pyrophosphat (IV) unter den gleichen Bedingungen.



Die  $\text{C}_{40}$ -Carotinoide sind symmetrisch aufgebaut; sie bestehen aus zwei gleichartigen Molekülhälften, die Schwanz zu Schwanz miteinander verknüpft sind. Den gleichen symmetrischen Bau weist auch das Squalen ( $\text{C}_{30}$ ) auf. Dieses Konstitutionsmerkmal deutet darauf hin, daß in der Biogenese der Carotinoide wie auch des Squalens eine spiegelbildliche Kondensation zweier Molekülhälften, deren Isoprenreste regulär angeordnet sind, stattgefunden hat. Die reduktive Kondensation

(TPNH) von zwei Farnesyl-Resten liefert Squalen<sup>8</sup>, die von zwei Geranylgeranyl-Resten (V) sollte zu der entsprechenden  $\text{C}_{40}$ -Verbindung, dem Lycopersen, führen.



Die Wahrscheinlichkeit, daß Lycopersen auf einem analogen Wege, durch Dimerisierung von Geranylgeranyl-Pyrophosphat, entsteht, ist sehr groß. Diese Reaktion ist mit Zellpartikeln aus *Neurospora crassa* studiert worden.

Die *Neurospora*-Zellen sind durch Zerschlagen mit Glasperlen nach der Methode von MERCKENSCHLAGER und SCHLOSSMANN<sup>17</sup> aufgeschlossen worden. Nach dem Abzentrifugieren der Zellbestandteile wurden die Partikel (Mitochondrien und Mikrosomen) durch hochtouriges Zentrifugieren niedergeschlagen. Die abgesetzten Partikeln wurden in Pufferlösung aufgenommen und homogenisiert (Pufferlösung: 1-m Tris-Puffer [pH 8] + Na-glycerophosphat 1-m 1:1). Bei 0° aufbewahrt, behält die Partikelsuspension die volle Aktivität während 4 bis 5 Tagen.

Zur Dimerisierung setzten wir markiertes Geranylgeranyl-Pyrophosphat (V) ein, das wie beschrieben aus Farnesyl-Pyrophosphat +  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Isopentenyl-Pyrophosphat + Synthetase gewonnen wurde<sup>14</sup>. Das gebildete  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Geranylgeranyl-pyrophosphat wurde mit *Neurospora*-Partikeln in Gegenwart von TPNH und einem TPNH regenerierenden System (Glucose-6-phosphat und Zwischenferment) inkubiert. Nach einstündiger Bebrütung bei 37°C ist die Reaktion durch Zusetzen von

methanolischer KOH abgestoppt worden. Durch Ausschütteln der alkalischen Lösung mit Petroläther gelangen Lycopersen, Squalen sowie das durch die in den Partikeln enthaltenen Phosphatasen freigesetzte Geranylgeraniol in die Petrolätherphase. Die letztgenannte Verbindung wird beim Filtrieren durch eine Aluminiumoxydsäule zurückgehalten, währenddem Lycopersen und Squalen durch die Säule hindurchgehen. Die Radioaktivität dieser Lösung entspricht ungefähr 5 bis 10% der Aktivität des eingesetzten Geranylgeranyl-Pyrophosphates.

Da infolge unvollständiger Hemmung der Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase durch Jodacetamid sich bei der Synthetase-Reaktion gleichwohl etwas radioaktives Farnesyl-Pyrophosphat bilden kann, ist damit zu rechnen, daß die Petrol-

<sup>14</sup> K. KIRSCHNER, Dissertation, München 1961.

<sup>15</sup> H. EGGERER, *Chem. Ber.* 94 (1961) 174.

<sup>16</sup> E. HECKER, *Chem. Ber.* 88 (1955) 1666.

<sup>17</sup> M. MERCKENSCHLAGER, K. SCHLOSSMANN und W. KURZ, *Biochem. Z.* 329 (1957) 332.

ätherlösung auch etwas radioaktives Squalen enthält. Es ist deshalb nach einem Verfahren gesucht worden, das die Trennung der beiden Kohlenwasserstoffe erlaubt. Ein guter Trenneffekt wird durch Papierchromatographie mit paraffiniertem Papier und Aceton/Äthylmethylketon 1:1 als Laufmittel erzielt. Um einen genügenden Trenneffekt zu erhalten, ist darauf zu achten, daß pro cm der Auftragslinie nicht mehr als 0,5 mg Substanz (in Aceton gelöst) aufgetragen wird. Ferner müssen die Chromatographiegefäße möglichst klein sein; am besten eignen sich die Chromatoboxen von E. HARTNACK (Stieglitz-Berlin). Die Entwicklung erfolgt mit wäßrigem  $\text{KMnO}_4$ .

Der radioaktiven Petrolätherlösung wurden synthetisches all-*trans*-Lycopersen und Squalen in gleichen Teilen als Träger beigegeben, der Petroläther vorsichtig verdampft und der Rückstand in wenig Aceton aufgenommen und zur Chromatographie aufgetragen. Nach 2½-stündiger Chromatographie wurde ein Leitstreifen entwickelt, nach dem die Lycopersen- und Squalen-Zone des übrigen Chromatogramms festgelegt

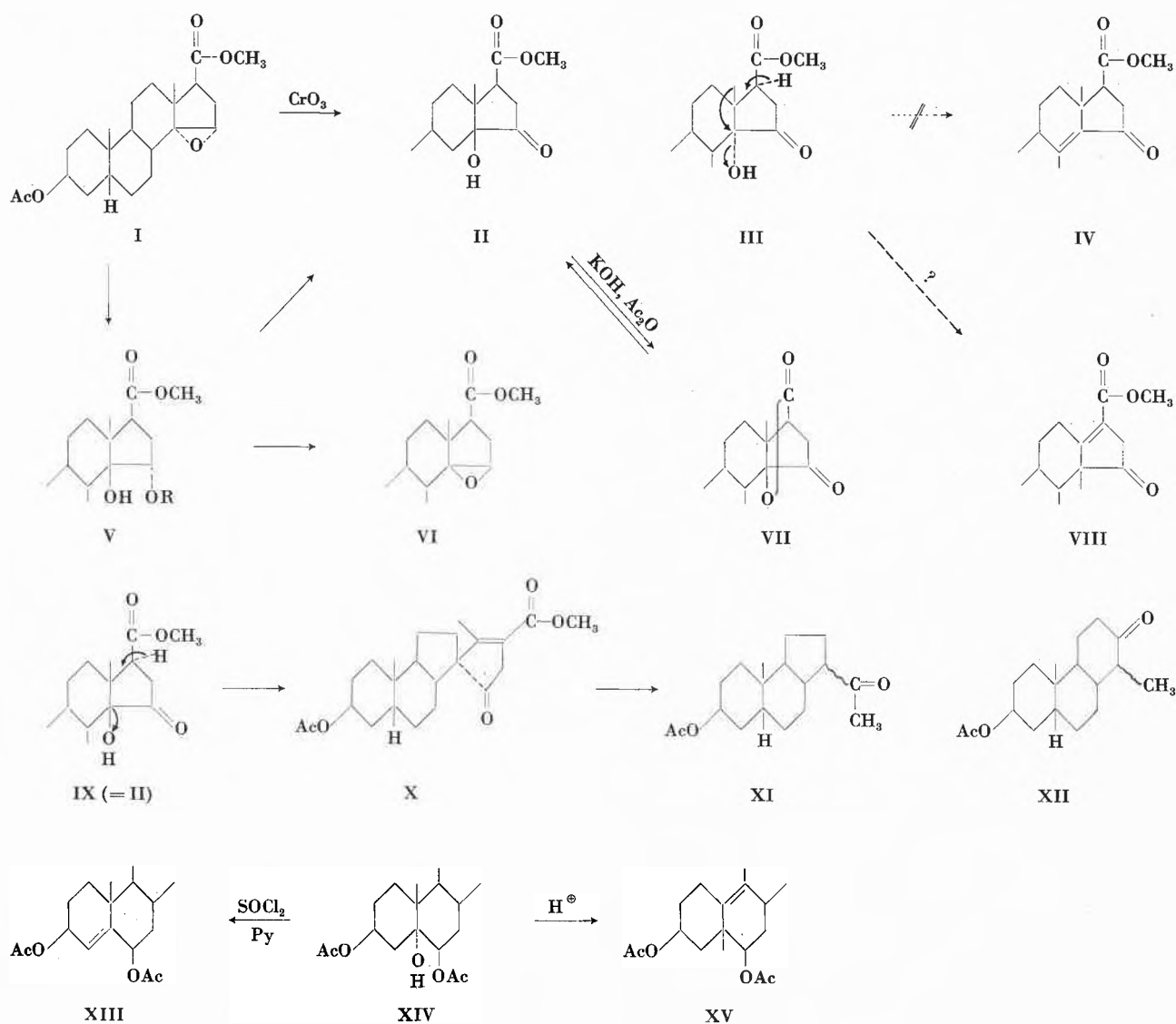
wurden. Zur Messung der Radioaktivität wurden die beiden Zonen in je vier gleiche Abschnitte geteilt, herausgeschnitten und mit Toluol extrahiert. Die so erhaltenen Lösungen wurden einzeln im Szintillationszähler gemessen. Es konnte festgestellt werden, daß die Hauptaktivität in der Lycopersen-Zone zu finden ist, wogegen die Squalen-Zone eine bedeutend geringere Aktivität aufweist.

Damit ist der Beweis erbracht, daß *Neurospora crassa* das Enzymsystem besitzt, um Geranylgeranyl-pyrophosphat zum Lycopersen zu dimerisieren.

Der Firma F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel, danken wir für die freundliche Überlassung von synthetischem all-*trans*-Lycopersen.

E. C. GROB, K. KIRSCHNER und F. LYNEN  
Max-Planck-Institut für Zellchemie, München

### Umlagerungen an 14-Hydroxysteroiden\*



\* Vorläufige Mitteilung, vorgetragen von T. REICHSTEIN an der Winterversammlung der Schweizerischen Chemischen Gesellschaft

in Fribourg am 11. Februar 1961. Eine ausführliche Publikation erscheint später in *Helv. Chim. Acta*.

Behandlung des  $\alpha$ -Epoxy-esters I (sowie des isomeren  $\beta$ -Epoxy-esters VI) mit  $\text{CrO}_3$  in wässriger Essigsäure liefert einen Ketol-ester, für den die Formeln II<sup>1</sup> und III<sup>2</sup> diskutiert wurden. Wir haben III bevorzugt<sup>2</sup>, da bei der Wasserabspaltung mit  $\text{SOCl}_2 + \text{Pyridin}$ <sup>3</sup> in ausgezeichneter Ausbeute ein Produkt entstand, das nach dem UV-Absorptionsspektrum ( $\lambda_{\text{max}}^{\text{Alk}} = 230 \text{ m}\mu$ ) sicher nicht das ungesättigte cisoide Keton IV, sondern ein voll substituierter  $\alpha,\beta$ -ungesättigter Ester war. Wir vermuteten, es sei VIII entstanden<sup>2</sup>. Die Bildung von VIII aus III (nicht aus II) durch eine Wagner-Meerwein-Umlagerung wäre leicht verständlich, da bei III (aber nicht bei II) die Methylgruppe und die HO-Gruppe *trans*-diaxial stehen (bezogen auf Ring C). Eine ganz analoge Reaktion ist die Westphalen-Umlagerung<sup>4</sup> aus XIV zu XV, die sich allerdings nur mit Säuren vollzieht, während XIV mit  $\text{SOCl}_2 + \text{Pyridin}$  das normale Produkt XIII liefert<sup>5</sup>.

<sup>1</sup> H. LINDE und K. MEYER, *Helv. Chim. Acta* 42 (1959) 807.

<sup>2</sup> A. LARDON, H. P. SIGG und T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta* 42 (1959) 1457.

<sup>3</sup> G. DARZENS, *C. R. Acad. Sci.* 152 (1911) 1601.

<sup>4</sup> L. F. FIESER und MARY FIESER, *Steroids*, Reinhold Publ. Corp., New York, und Chapman & Hall, London 1959), S. 325.

<sup>5</sup> V. PETROW, O. ROSENHEIM und W. W. STARLING, *J. Chem. Soc.* 1938, 677.

Wir fanden jetzt, daß der aus I und VI entstehende Ketol-ester nicht Formel III, sondern II besitzt. Dies beweisen u. a. folgende Reaktionen. Die aus II erhaltene Säure liefert ein Lacton VII; die Reaktion ist reversibel. I läßt sich ferner hydrolytisch zum Dihydroxy-ester V ( $\text{R} = \text{H}$ ) spalten. V liefert nach Tosylierung ( $\text{R} = \text{Ts}$ ) mit  $\text{Al}_2\text{O}_3$  den bekannten  $\beta$ -Epoxy-ester VI, dessen räumlicher Bau gesichert ist<sup>1</sup>. Aus V entsteht mit  $\text{CrO}_3$  der Ketol-ester II.

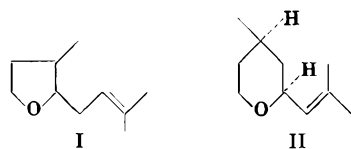
Für den aus II mit  $\text{SOCl}_2$  erhaltenen ungesättigten Ester wird damit Formel VIII höchst unwahrscheinlich. Wir glauben jetzt, daß sich die Reaktion entsprechend IX vollzieht und daß dem Wasserabspaltungsprodukt die Spiranformel X zukommt. Der Abbau mit Ozon, dann mit  $\text{CrO}_3$  gab erwartungsgemäß (aber in schlechter Ausbeute) eine Säure, die beim Erwärmen leicht  $\text{CO}_2$  verlor und ein amorphes Keton lieferte, das durch ein krist. Semicarbazon charakterisiert wurde. Die Analyse ist mit XI vereinbar, ebenso das Protonenresonanzspektrum, wonach ein Methylketon vorliegt. Das isomere Keton XII, das aus VIII entstehen sollte, wird damit ausgeschlossen.

A. LARDON und T. REICHSTEIN

Organisch-Chemisches Institut der Universität  
Basel

## Konstitution und Synthese des Oxyds $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$ aus bulgarischem Rosenöl\*

Aus den tiefsiedenden Anteilen von bulgarischem Rosenöl wurde im Jahre 1951 ein links drehendes Oxyd  $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$  isoliert, das interessante geruchliche Eigenschaften besaß und das wir Rosenoxyd genannt haben. Durch oxydativen Abbau wurde damals für diese Verbindung die Struktur eines 3-Methyl-2[3'-methyl-2'-buten-yl]-tetrahydrofurans (I) abgeleitet.



Die beiden möglichen *cis*- und *trans*-Formen von I wurden synthetisch hergestellt. Die geruchlichen Eigenschaften sowie die IR-Spektren dieser Verbindungen waren jedoch verschieden von denen des natürlichen Rosenoxyds.

Ein weiterer Versuch zur Synthese des Oxyds durch Oxydation des Dibromids von (+)-Citronellol mit Bleitetraacetat<sup>1</sup> und anschließende Entbromierung mit Zink

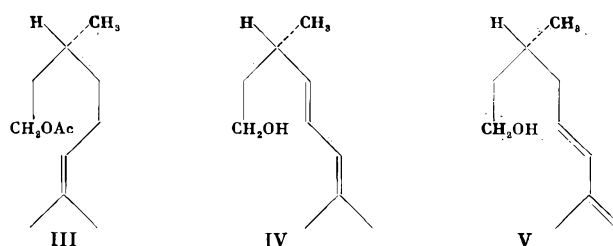
\* Nach einem Vortrag, gehalten von C. F. SEIDEL in der Winterversammlung der Schweizerischen Chemischen Gesellschaft in Fribourg am 11. Februar 1961.

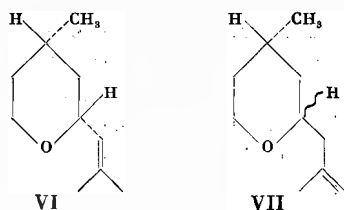
<sup>1</sup> Vgl. G. CAINELLI, R. L. MIHAILOVIC, D. ARIGONI und O. JEGGER, *Helv. Chim. Acta* 42 (1959) 1124.

führte zu einer Verbindung, deren spektroskopische Eigenschaften sich von jenen des natürlichen Oxyds als verschieden erwiesen, dagegen eindeutig der Struktur I entsprachen.

Nachdem in neuerer Zeit dasselbe Oxyd auch aus dem ätherischen Öl von *Geranium Bourbon* isoliert wurde, konnte auf Grund des Massenspektrums und des Kernresonanzspektrums gezeigt werden, daß dem Rosenoxyd die Konstitution II des (-)-4-R-*cis*-2(2'-Methyl-1'-propen-yl)-4-methyl-tetrahydropyrans zukommt.

Die Synthese einer Verbindung, die sich in der Folge als das Enantiomere (VI) des natürlichen Oxyds II erwies, ging von (+)-Citronellol aus. Bromierung des entsprechenden Acetats (III) mit Bromsuccinimid und anschließende Bromwasserstoffabspaltung führte nach alkalischer Verseifung zu einem Gemisch von strukturell isomeren Dehydrocitronellolen vom Typus IV und V.





Dieses Gemisch wurde direkt durch Erhitzen mit *p*-Toluolsulfonsäure zyklisiert. Aus dem Reaktionsgemisch wurde das gesuchte Oxyd (VI) durch präparative Trennung im Gaschromatographen in reiner Form erhalten. Es war auf Grund des IR-, NMR- und des Massenspektrums mit dem natürlichen Rosenoxyd identisch. Die Drehung war derjenigen des Naturproduktes ent-

gegengesetzt. Bei einem isomeren Nebenprodukt der Zyklisation dürfte es sich auf Grund der analytischen und spektroskopischen Daten um ein Oxyd der Formel VII mit endständiger Lage der Doppelbindung handeln.

In bezug auf die Konfiguration des Oxyds konnten wir nachweisen, daß sich die beiden Substituenten am Tetrahydropyranring in *cis*-Stellung befinden.

Eine ausführliche Publikation von C. F. SEIDEL, DOROTHEE FELIX, A. ESCHENMOSER, K. BIEMANN, E. PALLUY und M. STOLL erschien in *Helv. Chim. Acta*, LIV (1961) 598.

C. F. SEIDEL und M. STOLL

Laboratorium für Organische Chemie der ETH, Zürich,  
und wissenschaftliches Laboratorium der  
Firmenich & Cie, Genf

## Synthese von Peptiden mit hoher corticotroper Wirkung\*

Das lebenswichtige Hypophysenhormon Corticotropin (ACTH = adrenocorticotropes oder adrenocorticotropes Hormon) ist ein Polypeptid, welches 39 Aminosäurereste, wie Kettenglieder zu einer Kette gefügt, enthält. Da diese Aminosäurereste durchaus normale Struktur aufweisen und in jedem Protein vorkommen könnten, ist die besondere, hormonale Aktivität des Corticotropins offenbar eine Funktion der Zahl und der speziellen Reihenfolge der Aminosäurereste. Der Aufbau des Schweine-Corticotropins ist abgekürzt in Formel I wiedergegeben<sup>1</sup>.

### Formel I

H · Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Try-Gly-Lys-Pro-Val-  
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13  
-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-Asp-Gly-Ala-  
14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27  
-Glu-Asp-Glu(NH<sub>2</sub>)-Leu-Ala-Glu-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe · OH  
28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39

Es ist auffallend, daß die Aminosäurereste mit basischen Seitenketten (Arg = Arginin, Lys = Lysin) sich auf die linke (N-terminale) Hälfte der Kette konzentrieren, während die sauren Reste (Asp = Asparaginsäure, Glu = Glutaminsäure) sich mehr auf die rechte (C-terminale) Seite beschränken.

Durch enzymatische Abbauprobieren war es BELL gelungen, zu zeigen, daß Peptidketten mit den Aminosäureresten 1 bis 28 und 1 bis 24 noch die gesamte corticotrope Aktivität aufweisen. Weiter war aber in der Frage nach der kürzesten Kette mit corticotroper Aktivität durch Abbauprobieren an isoliertem Material nicht

zu kommen, da die Enzyme diese kurzen Ketten schnell zu ganz kleinen Bruchstücken fragmentieren; hier würden also nur synthetische Versuche zum Ziel führen. Immerhin war aber durch die Versuche von BELL wahrscheinlich gemacht, daß die basischen Aminosäurereste eine wesentliche Rolle bei der Entfaltung der hormonalen Aktivität spielen.

Die Frage nach dem kürzesten Peptid mit Corticotropin-Aktivität ist nun aber keine rein akademische, sondern sie hat ganz wichtige praktische Implikationen: alle heute für die Klinik zur Verfügung stehenden ACTH-Präparate sind aus tierischen Hypophysen isoliert und enthalten mehr oder weniger große Mengen von hochmolekularen und anderen Begleitstoffen, welche bei der Anwendung sehr unerwünschte Nebenreaktionen (allergische Erscheinungen u. a.) hervorrufen können. Je kleiner aber ein Polypeptid ist, desto größer sind heute die Aussichten, daß es aus Aminosäuren chemisch aufgebaut werden kann und daß eine solche Synthese auch technisch durchgeführt werden könnte. Synthetisches Material wäre aber, aller Voraussicht nach, frei von Nebenwirkungen.

Im Jahre 1956 wurde von BOISSONNAS<sup>2</sup> die Synthese eines Eikosapeptid-Materials mit den Aminosäureresten 1 bis 20 des Corticotropins beschrieben; es besaß die relativ kleine Aktivität von 2 bis 3 Einheiten pro mg. Kürzlich konnten wir die Synthese eines reinen Nonadekapeptides (Aminosäurereste 1 bis 19) veröffentlichen<sup>3</sup>, welches eine Aktivität von 28 I. Einheiten besitzt. Für diese Synthese wurden neue Methoden entwickelt, die einen eindeutigen Verlauf und gute Ausbeuten, besonders in der letzten der etwa 63 Stufen

\* Nach einem Vortrag, gehalten von R. SCHWYZER vor der Winterversammlung der Schweizerischen Chemischen Gesellschaft in Fribourg am 11. Februar 1961.

<sup>1</sup> R. C. SHEPHERD, S. D. WILLSON, K. S. HOWARD, P. H. BELL, D. S. DAVIES, S. B. DAVIS, E. A. EIGNER und N. E. SHAKESPEARE, *J. Amer. Chem. Soc.* 78 (1956) 5067.

<sup>2</sup> R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, J.-P. WALLER und P.-A. JAQUENOUD, *Experientia* 12 (1956) 446.

<sup>3</sup> Vortrag von R. SCHWYZER vor der Naturforschenden Gesellschaft in Zürich am 24. Oktober 1960; Vorläufige Mitteilung von R. SCHWYZER, W. RITTEL, H. KAPPELER und B. ISELIN, *Angew. Chem.* 72 (1960) 915.

(Abspaltung der Schutzgruppen), gewährleisten. Dieser Befund wird bestätigt durch eine Arbeit von C. H. LI und Mitarbeitern<sup>4</sup>, die dasselbe Peptid auf andere Art synthetisiert und eine gleich große Wirkungsintensität gefunden haben. Auch die Gruppe von Professor K. HOFMANN hat ein Peptid mit corticotroper Wirksamkeit synthetisch hergestellt; es umfaßt die Aminosäuresequenz 1 bis 23 des Corticotropins und besitzt eine ähnliche Aktivität wie das 24er Peptid, welches BELL durch Abbau von ACTH erhalten hatte<sup>5</sup>. Allerdings werden bei diesen Synthesen in den letzten Stufen Ausbeuten von nur 2 bis 3 bzw. 20 bis 30% erreicht.

<sup>4</sup> C. H. LI, J. MEIENHOFER, E. SCHNABEL, D. CHUNG, T.-B. LO und J. RAMACHANDRAN, *J. Amer. Chem. Soc.* 82 (1960) 5760.

<sup>5</sup> K. HOFMANN, H. YAJIMA, N. YAMAOKA, T.-Y. LIU und S. LANDE, *J. Amer. Chem. Soc.* 83 (1961) 487.

Da eine Reihe kleinerer, synthetischer Peptide als unwirksam befunden wurde und nach WHITE<sup>6</sup> die Aminosäurereste 1 und 2 für die Wirkung der Gesamtmolekel unentbehrlich sind, ist mit einiger Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß 18 bis 19 Aminosäurereste wohl das Minimum für die Entfaltung einer ACTH-Aktivität darstellen; wie weit die Aminosäurereihenfolge aber abgeändert werden kann, ist erst noch durch weitere Synthesen zu ergründen.

<sup>6</sup> W. F. WHITE, *J. Amer. Chem. Soc.* 77 (1955) 4691.

R. SCHWYZER,  
W. RITTEL, H. KAPPELER und B. ISELIN  
CIBA AG, Basel

## Perfectionnement de l'analyse des terres rares par chromatographie de déplacement sur échangeurs d'ions\*

### Summary

The recently published procedure for the quantitative analysis of the rare-earth elements by displacement chromatography on ion exchangers has been markedly improved by using a resin on which small amounts of morin have been adsorbed. Any rare-earth element of the lanthanum series (excepted europium), as well as yttrium, can be determined on such a resin; a 0.04 M EDTA solution buffered with ammonium formate for obtaining a pH of 3.0 in the separating column is used as eluant. Since the morin is very strongly adsorbed on the ion-exchanger, several analysis can be achieved before the treatment with the dye must be renewed.

Besides x-ray spectrometry, the proposed method is at present the only procedure allowing the qualitative and quantitative analysis of yttrium and the elements of the lanthanum series in any rare-earth mixture not enriched in europium.

Le procédé pour l'analyse chromatographique des terres rares, décrit récemment<sup>1</sup>, présente le défaut de ne pas permettre le dosage individuel des éléments gadolinium, terbium et yttrium d'une part, ainsi que de l'ytterbium et du lutécium d'autre part. Entre temps, cette lacune a pu être comblée par l'emploi d'une résine traitée par de faibles quantités de morine (5,7,2',4'-tétrahydroxyflavonol). Le chromatogramme est développé par une solution 0,04-m. d'éthylènediaminetetraacétate d'ammonium, tamponnée par du formiate d'ammonium de façon à obtenir un pH de 3,0 dans la colonne<sup>2</sup>. A la lumière ultraviolette, on peut alors reconnaître tous les éléments des terres rares dont les zones; se distinguent en général plus nettement que sur une résine non traitée par la morine<sup>3</sup>. On reconnaît (zones

de haut en bas): 1) La: forte fluorescence claires; 2) Ce: zone assez foncée; 3) Pr: vert olive; 4) Nd: violet foncé; 5) Sm: zone assez foncée; 6) Eu: zone diffuse foncée (voir plus loin); 7) Gd: zone assez claire; 8) Tb: bande brun foncé; 9) Y: forte fluorescence claire; 10) Dy: zone assez foncée; 11) Ho: brun olive clair; 12) Er: roux; 13) Tm: zone grisâtre, assez difficile à distinguer de celle de Yb (n'est observable que dans l'obscurité complète); 14) Yb: faiblement fluorescent; 15) Lu: forte fluorescence claire.

Si le mélange à analyser contient comme impuretés des éléments alcalino-terreux, ceux-ci se déposent au-dessus de la zone du lanthane. On les reconnaît à leur faible fluorescence sous U.V.; la résine chargée d'ions ammonium ne donne presque pas de fluorescence. De faibles quantités de fer se manifestent par un dépôt d'hydroxyde à la limite supérieure de la zone du lanthane.

A la limite inférieure de la zone des terres rares se forme, au cours de l'éluion, une bande  $\text{Cu}^{++}/\text{NH}_4^+$  (vert foncé sous U.V., vert à la lumière du jour); le complexe de thorium, très stable ( $\log K = 23,24$ ), traverse cette zone; il est cependant décomposé par la barrière  $\text{Cu}^{++}/\text{H}^+$  (résine dans son état initial: non fluorescente sous U.V.; bleu verdâtre à la lumière du jour). En présence de thorium, on observe une bande diffuse, fortement fluorescente, à la limite des deux zones de cuivre. Le complexe du scandium ( $\log K = 23,1$ ) passe, à l'encontre de celui du thorium, dans la zone  $\text{Cu}^{++}/\text{H}^+$ ; ceci s'explique par le

Er, Tm, Yb donnent des taches brunes (F. H. POLLARD, J. F. MC-OMIE et H. M. STEVENS, *J. Chem. Soc.* 1954, 3436). Dans la colonne d'échangeurs d'ions, l'absorption caractéristique des diverses terres rares se superpose à l'effet du à la morine; il en résulte une plus grande différenciation entre les zones des divers éléments.

<sup>4</sup> G. SCHWARZENBACH, R. GUT und G. ANDEREGG, *Helv. Chim. Acta* 37 (1954) 937.

\* Reçu le 18 mars 1961.

<sup>1</sup> G. BRUNISHOLZ et J. P. QUINCHE, *Chimia* 14 (1960) 343.

<sup>2</sup> *Chimia* 14 (1960) 349.

<sup>3</sup> A la lumière ultraviolette on observe sur papier filtre, après traitement avec la morine, une intense fluorescence verte avec les éléments Y, La, Gd et Lu, alors que les éléments Ce, Pr, Nd, Sm, Dy,

fait que l'affinité de  $\text{Sc}^{3+}$  pour la résine est moins grande que celle de  $\text{Th}^{4+}$ .

Des quantités notables d'euporium empêchent la détermination du Sm et du Gd. Les différences de stabilité entre les complexes des éléments Sm, Eu et Gd sont en effet très faibles, de sorte que la séparation entre ces trois éléments (surtout entre Sm et Eu) est très mauvaise. En présence d'euporium, la limite supérieure de la zone du Gd est diffuse; si cette limite est nette, on peut conclure que le mélange à analyser contient tout au plus des traces d'euporium.

Une légère erreur systématique est introduite lorsqu'on effectue l'analyse, par élution à pH 3,0, de mélanges contenant à la fois des terres cériques et yttriques; le rapport  $\text{R}^{+++}/\text{NH}_4^+$  fixé sur la résine (R = terres rares) est un peu plus élevé dans les zones des terres cériques que dans celles des terres lourdes. Les zones des éléments lourds sont par conséquent relativement trop longues et les résultats pour ces éléments sont systématiquement trop forts de 1 à 2%.

### Partie expérimentale

1) *Traitement de la résine avec la morine.* La résine fraîche (nous utilisons la qualité Dowex 50 WX 2, 200–400 mesh) est débarrassée de ses impuretés, comme décrit antérieurement<sup>2</sup>; on l'introduit dans un cylindre gradué, attend qu'elle se soit complètement déposée, puis on lit le volume qu'elle occupe. Ensuite on la transvase dans un récipient approprié, ajoute de l'eau de sorte que le volume total (résine-eau) soit environ 1,5 fois le volume de la résine, agite vigoureusement à l'aide d'un agitateur mécanique et ajoute goutte à goutte

une solution très diluée de morine. Pour 100 ml de résine, il faut 5 mg de morine dissous dans 400 ml d'eau<sup>5</sup>. On filtre la résine sur verre fritté et la lave à fond avec de l'eau. La moitié de la résine est conservée sous forme d'ammonium, le reste est chargé d'ions  $\text{Cu}^{++}$  et  $\text{H}^{+2}$ .

La morine est très fortement absorbée sur la résine et on peut effectuer plusieurs analyses avant qu'il soit nécessaire de renouveler le traitement<sup>6</sup>.

2) *Détermination de l'acidité disponible dans les solutions d'éthylènediamine-tétraacétate d'ammonium.* On peut utiliser une solution de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  au lieu de la solution de  $\text{La}(\text{NO}_3)_3$  préconisée précédemment pour cette détermination. (Prélever ~ 20 ml d'une solution non titrée ~ 0,4-m. de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , ajouter quelques gouttes d'un indicateur mixte bleu de méthylène-rouge de méthyle; si nécessaire, ajouter NaOH 0,1-n. jusqu'à coloration verte, introduire 20 ml de la solution EDTA diluée à 0,1-m., et titrer l'acidité libérée jusqu'au virage de l'indicateur au vert.)

3) *Dissolution des oxydes pour l'analyse:* On peut employer dans la plupart des cas l'acide acétique au lieu de l'acide chlorhydrique pour dissoudre les oxydes à analyser. Un excès d'acide acétique ne provoque pas d'acidification de la résine lors de l'adsorption des terres rares, de sorte qu'il n'est par conséquent pas nécessaire d'éliminer l'excès de l'acide après la dissolution. On évite ainsi une opération assez longue qui présente de plus un certain risque d'hydrolyse dans le cas des terres lourdes.

<sup>5</sup> On dissout 5 mg de morine «pour analyse» dans 4 ml d'alcool et on dilue à 400 ml avec de l'eau.

<sup>6</sup> Lorsque ce renouvellement est nécessaire, on traite la résine d'abord avec de l'alcool à 95% (ou avec  $\text{NH}_3$  conc.) pour éliminer le colorant restant et on la lave ensuite à l'eau.

R. MORET et G. BRUNISHOLZ

Laboratoire de chimie minérale et analytique  
de l'Université, Lausanne

## Pyridoxhydrazine und Derivate \*

Alte und neue, zum Teil widersprechende Beobachtungen über die biologischen Wirkungen der Hydrazide<sup>1, 2, 3</sup> und Hydrazone<sup>4, 5</sup> der Pyridoxinreihe kommen in der Literatur vor. Ihr Interesse ist wegen der chemischen Verwandtschaft mit dem bekannten Tuberkulose-Heilmittel Isonicotinylhydrazid und dem Monoaminoxidase-hemmenden Iproniazid<sup>6</sup> (N-Isopropylisonicotinylhydrazid) besonders verbunden. Das von YALE und Mitarbeitern<sup>1</sup> hergestellte 2-Methyl-3-hydroxy-5-hydroxymethylisonicotinsäurehydrazid besitzt nach EMOTO<sup>2</sup>

eine bakteriostatische Wirkung gegen *Mycobacterium tuberculosis* H37 Rv, die jene von Isoniazid übertrifft. Per os sollte jedoch die Verbindung nach ISLER<sup>3</sup> unwirksam sein. Sehr aktiv gegen den gleichen Bakterienstamm sind nach SUTTON<sup>7</sup> das Pyridoxalisonicotinylhydrazon sowie nach SAH und PENG<sup>5</sup> einige neue Pyridoxalthiosemicarbazone, deren Verwendung für die Therapie vorausgesehen wird. Die Isomeren Pyridoxal-nicotinyl- und -isonicotinylhydrazone, die eine Vitamin-B<sub>6</sub>-Aktivität zeigen, sollten nach B. FREEDLANDER<sup>8</sup> scharfe Wirkung gegen Brustkrebs und Leukämie der Ratte zeigen. Keine pharmakologischen Angaben liegen dagegen für einige weitere Pyridoxinderivate, die als potentielle Antimitotika vor kurzem hergestellt worden sind<sup>9, 10</sup>, vor.

\* Eingegangen am 12. Februar 1961.

<sup>1</sup> H. L. YALE, K. LOSEE, F. MARTINS, M. HOLSING, F. M. PERRY und J. BERNSTEIN, *J. Amer. Chem. Soc.* 75 (1953) 1933.

<sup>2</sup> S. EMOTO, *J. Sci. Res. Inst. (Tokyo)* 47 (1953) 37, ref. *Chem. Abstr.* 48 (1954) 12096.

<sup>3</sup> O. ISLER, H. GUTMANN, O. STAUB, B. FUST, E. BÖHNI und A. STUDDER, *Helv. Chim. Acta* 38 (1955) 1033.

<sup>4</sup> P. P. T. SAH, *J. Amer. Chem. Soc.* 76 (1954) 300.

<sup>5</sup> P. P. T. SAH und C. T. PENG, *Arch. Pharm.* 293 (1960) 501.

<sup>6</sup> P. DICK, *Schweiz. Med. Wschr.* 89 (1959) 1288.

<sup>7</sup> W. B. SUTTON, Fußnote der Literaturangabe 4.

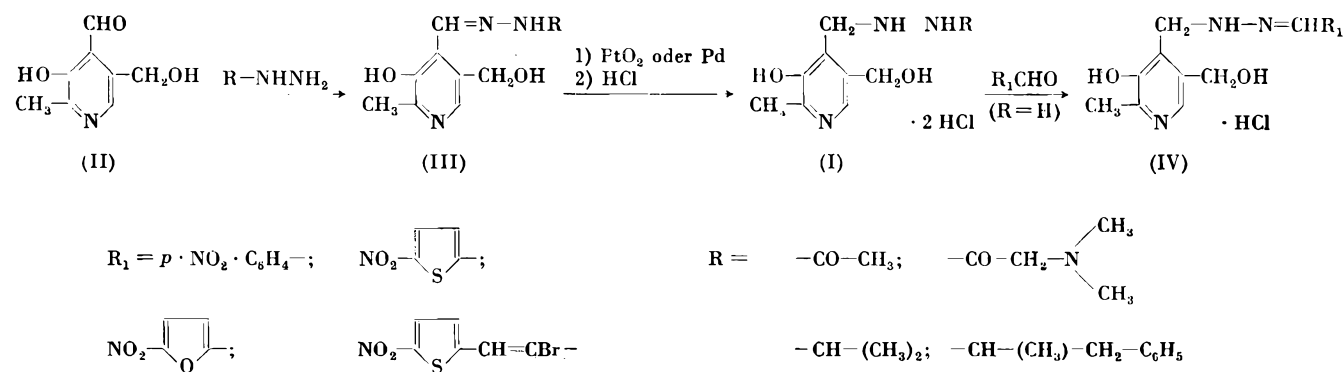
<sup>8</sup> B. FREEDLANDER und A. FURST, Fußnote der Literaturangabe 4.

<sup>9</sup> G. E. McCASLAND, E. BLANZ und A. FURST, *J. Org. Chem.* 23 (1958) 1570.

<sup>10</sup> G. E. McCASLAND, E. BLANZ und A. FURST, *J. Org. Chem.* 24 (1959) 1000.

Andererseits scheint Vitamin B<sub>6</sub> sowie Pyridoxamin eine gewisse Rolle beim experimentellen Krebs zu spielen<sup>11</sup>. Vor einiger Zeit haben einer von uns und Mitarbeiter über die Herstellung von Pyridoxin<sup>12, 13</sup> (Vitamin B<sub>6</sub>) und Pyridoxamin<sup>14</sup> referiert. Es schien uns jetzt interessant, in Fortsetzung unserer Arbeit auf diesem Gebiete das bis jetzt unbekannte 2-Methyl-3-hydroxy-4-hydrazino-methyl-5-hydroxymethylpyridin-dihydrochlorid [das nach der üblichen Nomenklatur<sup>15</sup> auf diesem Gebiete kurz mit Pyridoxhydrazin (I-R = H) bezeichnet werden kann] und einige Derivate davon herzustellen, um ihre potentielle vitaminische, antivitaminische, antibakterische und antimittotische Wirkung nachzuprüfen.

Wir sind von Pyridoxal (II) ausgegangen, das nach dem Verfahren von VISCONTINI, EBNÖTHER und KARRER<sup>16</sup> aus Pyridoxin hergestellt und mit verschiedenen substituierten Hydrazinen (Acetylhydrazid<sup>17</sup>, N,N-Dimethylglycinhydrazid<sup>18</sup>, Isopropylhydrazin<sup>19</sup> und  $\alpha$ -Methyl- $\beta$ -phenyläthylhydrazin<sup>20</sup>) umgesetzt wurde, wobei die entsprechenden Pyridoxalhydrazone (III) gebildet wurden.



Die Reduktion der Verbindungen III wurde in alkoholischem/essigsauerm Milieu mit 5prozentigem Pd auf Kohle oder mit PtO<sub>2</sub> und die nachträgliche Verseifung des Acetylrestes mit Säuren durchgeführt. Im Falle des N-Isopropylderivats (III-R = iC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>) kann die Reduktion nur mit dem rohen, nach einer von uns früher beschriebenen Methode<sup>13</sup> hergestellten Acetylderivat zur Vollendung gebracht werden (Pt als Katalysator). Durch saure Hydrolyse war es möglich, alle O- und N-Acylreste abzuspalten und das gewünschte N-Isopropyl-pyridox-

hydrazin (I-R = iC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>) als Dihydrochlorid zu erhalten. Das Pyridoxhydrazin selbst (I-R = H) wurde schließlich mit einigen Aldehyden (p-Nitrobenzaldehyd; 5-Nitro-2-thiophenaldehyd<sup>21</sup>; 5-Nitro-2-furfurylaldehyd<sup>22</sup>;  $\alpha$ -Bromo- $[\beta$ -(5-nitro-2-thienyl)]-acrolein<sup>23</sup>) kondensiert, um seine Struktur endgültig zu beweisen und potentiell antibakteriell wirkende Verbindungen herzustellen. Die dargestellten Pyridoxhydrazon-Hydrochloride (IV) sind rot gefärbte, schwer lösliche Verbindungen mit hohen Zersetzungspunkten.

Die hergestellten Verbindungen, besonders das Pyridoxhydrazin-hydrochlorid, sind verschiedenen biologischen Untersuchungen unterworfen worden. Bei den pharmakologischen Versuchen\* [Toxizität, direkte Beobachtung, antikonvulsive und antiphlogistische Wirkung, Analgesie, Lokalanästhesie, Wirkung auf den isolierten Darm, auf den Blutdruck, auf die Atmung sowie auf einige Enzyme (Cholinesterase, Pseudocholinesterase, Carbonsäureanhydrase und Monoaminoxidase)] hat sich ergeben, daß die Verbindungen im allgemeinen wenig

toxisch und wenig aktiv sind. N-Acetyl-pyridoxalhydrazone ( $LD_{50}$  200 mg/kg), N-Dimethylaminoacetyl-pyridoxalhydrazone ( $LD_{50}$  600 mg/kg), N-Dimethylaminoacetyl-pyridoxhydrazin ( $LD_{50}$  > 1000 mg/kg) und Pyridoxhydrazin ( $LD_{50}$  ~ 600 mg/kg) besitzen eine schwache analgetische Wirkung. N-Acetyl-pyridoxalhydrazone und N-( $\alpha$ -Methyl- $\beta$ -phenyläthyl)-pyridoxhydrazin hemmen 50% der Monoaminoxidase-Wirkung bei einer Konzentration von 200  $\gamma$ /cm<sup>3</sup> bzw. 20  $\gamma$ /cm<sup>3</sup>. Letzteres wirkt auch schwach spasmolytisch.

Die vitaminische und antivitaminische Aktivität\*\* der hergestellten Verbindungen wurde mit dem Wachs-

<sup>11</sup> K. YAMADA und M. NAGAI, *J. Vitaminology* 5 (1959) 188.

<sup>12</sup> E. TESTA und A. VECCHI, *Gazz. Chim. Ital.* 87 (1957) 467.

<sup>13</sup> E. TESTA und F. FAVA, *Chimia* 11 (1957) 307.

<sup>14</sup> E. TESTA und F. FAVA, *Chimia* 11 (1957) 310.

<sup>15</sup> H. VOGEL, *Chemie und Technik der Vitamine*, Band 2, Teil II, S. 278, Verlag Enke, Stuttgart 1957.

<sup>16</sup> M. VISCONTINI, C. EBNÖTHER und P. KARRER, *Helv. Chim. Acta* 34 (1951) 1834.

<sup>17</sup> TH. CURTIUS und T. S. HOFMAN, *J. prakt. Chem.* 53 [2] (1896) 524.

<sup>18</sup> M. VISCONTINI und J. MEIER, *Helv. Chim. Acta* 33 (1950) 1773.

<sup>19</sup> L. F. ANDRIETH und L. H. DIAMOND, *J. Amer. Chem. Soc.* 76 (1954) 4896.

<sup>20</sup> J. H. BIEL, A. E. DRUKKER, P. A. SBORE, S. SPECTOR und B. BRODIE, *J. Amer. Chem. Soc.* 80 (1959) 1519.

<sup>21</sup> T. M. PATRIK jr. und W. M. S. EMERSON, *J. Amer. Chem. Soc.* 74 (1952) 1356.

<sup>22</sup> H. GILMAN und G. F. WRIGHT, *J. Amer. Chem. Soc.* 52 (1930) 2550.

<sup>23</sup> G. CARRARA, R. ETTORRE, F. FAVA, G. ROLLAND, E. TESTA und A. VECCHI, *J. Amer. Chem. Soc.* 76 (1954) 4341.

\* Die Versuche wurden in der pharmakologischen Abteilung (Leiter: Prof. Dr. G. MAFFII) der Lepetit S. p. A. durchgeführt.

\*\* Die Versuche wurden in den biochemischen Laboratorien der Lepetit S. p. A. (Leiter: Dr. E. GINOULHIAC) von Professor V. FERRARI und Prof. S. NANI durchgeführt.



tum des *Saccharomyces Carlsbergensis* ATCC 4228 ( $B_6$ -abhängiger Mikroorganismus) untersucht. Kein Produkt zeigt eine antivitaminische Wirkung: Die vitaminische Aktivität ist als molares Verhältnis gegen Pyridoxinhydrochlorid (=1), die für ein gleiches Wachstum notwendig ist, angegeben. N-Acetylpyridoxalhydraton 1:2,2; N-Acetyl-pyridoxhydratin 1:6,6; N-Dimethylaminoacetyl-pyridoxhydratin 1:3,3. Die übrigen Verbindungen zeigen eine noch niedrigere Pyridoxin-Aktivität.

Bei der bakteriologischen Untersuchung\* hat sich ergeben, daß, mit Ausnahme der Pyridoxhydratone (IV), alle Verbindungen – aber auch das *p*-Nitrobenzalpyridoxhydraton – praktisch inaktiv sind. Die drei übrigen Pyridoxhydratone besitzen eine gute antibakterielle Wirksamkeit, sind aber leider zu toxisch, um eine praktische Verwendung zu ermöglichen ( $LD_{50} < 100$  mg/kg, Ratte).

Zuletzt wurden die Verbindungen auf ihre antimittotische Wirkung\*\* untersucht. Besonders interessant erscheint das Pyridoxhydratinhydrochlorid, das sich in Vorversuchen als stark hemmend für den menschlichen Krebsstamm KB<sub>49</sub> *in vitro* erwies.

Wir danken allen unseren Kollegen bestens für die Überlassung der preliminären Ergebnisse ihrer Versuche.

#### Beschreibung der Versuche\*\*\*

##### 1. Pyridoxal-hydratone (III)

a) N-Acetylpyridoxalhydraton. 67,5 g Pyridoxinhydrochlorid werden nach den Angaben von VISCONTINI, EBNÖTHER und KARRER<sup>16</sup> mit MnO<sub>2</sub> in Anwesenheit von Schwefelsäure zu Pyridoxal oxydiert. Die erhaltene Lösung (etwa 2,5 Liter) wird im Vakuum auf 600 cm<sup>3</sup> eingengt, mit Tierkohle behandelt und filtriert. Dem Filtrat werden 120 g Natriumacetat zugesetzt, wobei das pH auf 5 bis 6 steigt; gleich nachher gibt man 80 g Acetylhydratin<sup>17</sup> hinzu. Nach einigen Stunden nützt man den gelben Niederschlag ab und wäscht ihn dreimal mit 100 cm<sup>3</sup> kaltem Wasser. Beim Einengen der Mutterlauge bis auf das halbe Volumen scheidet sich eine weitere Menge des Hydratons ab. Gesamtausbeute 46,8 g (59% der Theorie). Smp. 256 bis 258°. Eine kleine Menge wird aus Wasser umkristallisiert, wobei der Smp. auf 260 bis 262° steigt. C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (223,23).

b) N-(Dimethylaminoacetyl)-pyridoxalhydratonhydrochlorid. Es wurde genau nach den Angaben von VISCONTINI und Mitarbeitern<sup>16</sup> aus Pyridoxal hergestellt. Smp. 208 bis 212°. C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>·HCl·2H<sub>2</sub>O (338,79).

c) N-Isopropylpyridoxalhydratonhydrochlorid. 20 g Pyridoxalhydrochlorid werden in 60 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst und mit einer Lösung von 10,86 g Isopropylhydratinhydrochlorid in 20 cm<sup>3</sup> Wasser behandelt. Man stellt das pH mit Natriumacetat auf 5 ein, wobei sich ein reicher Niederschlag ausscheidet. Man erhält 17,8 g (70% der Theorie) N-Isopropylpyridoxalhydratonhydrochlorid. Hellgelbes Pulver von Smp. 219 bis 221°. C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>·HCl (259,73).

\* Die Versuche wurden im bakteriologischen Laboratorium (Leiter: Dr. M. T. TIMBAL) der Lepetit S. p. A. durchgeführt.

\*\* Privatmitteilung von Prof. Dr. G. MAGNI, Universität Pavia.

\*\*\* Schmelzpunkte unkorrigiert. Alle hier angegebenen Bruttoformeln wurden durch Elementaranalyse bestätigt.

d) N-( $\alpha$ -Methyl- $\beta$ -phenyläthyl)-pyridoxalhydratonhydrochlorid. Eine Lösung von 12,35 g Pyridoxalhydrochlorid in 35 cm<sup>3</sup> Wasser wird mit einer Lösung von 11,3 g  $\alpha$ -Methyl- $\beta$ -phenyläthylhydratin<sup>20</sup> in 35 cm<sup>3</sup> Wasser versetzt, wobei nach kurzer Zeit ein Niederschlag von gelbem N-( $\alpha$ -Methyl- $\beta$ -phenyläthyl)-pyridoxalhydratonhydrochlorid entsteht. Ausbeute 16 g (78,5% der Theorie). Smp. 202 bis 204°. C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>·HCl (335,83).

##### 2. N-Acyl-pyridoxhydratin (I)

a) N-Acetyl-pyridoxhydratin. 14,7 g N-Acetyl-pyridoxalhydraton werden in 2100 cm<sup>3</sup> abs. Äthanol gelöst, mit 9 cm<sup>3</sup> Eisessig behandelt und in Anwesenheit von 5 g 5prozentigem Pd auf Kohle bei Zimmertemperatur hydriert. Ist die Wasserstoffaufnahme beendet, wozu einige Stunden notwendig sind, so filtriert und engt man im Vakuum zur Trockne ein. Der Rückstand wird aus 120 cm<sup>3</sup> abs. Äthanol umkristallisiert. Ausbeute 13,15 g (91% der Theorie). Smp. 184–185°. C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (225,24).

b) N-(Dimethylaminoacetyl)-pyridoxhydratin. 17,4 g N-(Dimethylaminoacetyl)-pyridoxalhydratonhydrochlorid werden in 1100 cm<sup>3</sup> abs. Äthanol gelöst, mit 15 cm<sup>3</sup> Eisessig behandelt und bei Zimmertemperatur in Anwesenheit von 2,1 g 5prozentigem Pd auf Kohle hydriert. Nach 4 Stunden ist die Wasserstoffaufnahme beendet. Die filtrierte Lösung wird im Vakuum eingengt, neutralisiert und der teilweise ölige Rückstand aus Essigester umkristallisiert. Ausbeute 12,1 g (88,5% der Theorie). Smp. 203 bis 205°. C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> (268,31).

##### 3. Pyridoxhydratin (I)

a) Pyridoxhydratin-dihydrochlorid (I-R=H). 15 g N-Acetylpyridoxhydratin werden in 140 cm<sup>3</sup> 10prozentiger Salzsäure gelöst und 7 Stunden zum Rückfluß erhitzt. Die gekühlte Lösung wird mit Tierkohle entfärbt und im Vakuum zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird aus Äthanol umkristallisiert. Ausbeute 11,5 g (67,5% der Theorie). Smp. 186 bis 189°. C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (256,14). Das gleiche Produkt erhält man auch bei einer ähnlichen sauren Hydrolyse des N-(Dimethylaminoacetyl)-pyridoxhydratins.

b) N-Isopropylpyridoxhydratin-dihydrochlorid. 10 g N-Isopropylpyridoxalhydratonhydrochlorid werden in 100 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst und mit Natriumacetat neutralisiert. Unter Rühren tropft man langsam bei Zimmertemperatur 35 cm<sup>3</sup> Essigsäureanhydrid zu; dann wird die Lösung solange gerührt, bis die Acetylierung vollständig ist (Verschwinden der FeCl<sub>3</sub>-Farbreaktion), was etwa 3 Stunden verlangt. Die Lösung wird 5mal mit 30 cm<sup>3</sup> Essigester extrahiert, die vereinigten Auszüge werden mit einer gesättigten NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Man engt im Vakuum ein, wobei ein durch Zusatz von Isopropyläther bald erstarrendes Öl zurückbleibt. 3,8 g des rohen Acetylderivats werden in 250 cm<sup>3</sup> Äthanol gelöst und in Anwesenheit von 1 g PtO<sub>2</sub> hydriert. Ist die Wasserstoffaufnahme beendet, so filtriert man den Katalysator weg und engt im Vakuum zur Trockne ein. Der Rückstand wird in 10 cm<sup>3</sup> 10prozentiger Salzsäure gelöst, 4 Stunden zum Rückfluß erwärmt und erneut zur Trockne eingengt. Das so erhaltene rohe N-Isopropylpyridoxhydratin-dihydrochlorid wird aus Isopropylalkohol umkristallisiert, wobei es als weißes, bei 157 bis 160° schmelzendes Produkt erhalten wird. Ausbeute 2,3 g (20% der Theorie). C<sub>11</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>·2HCl (298,21).

c) N-( $\alpha$ -Methyl- $\beta$ -phenyläthyl)-pyridoxhydratinhydrochlorid. 7,43 g N-( $\alpha$ -Methyl- $\beta$ -phenyläthyl)-pyridoxalhydratonhydrochlorid werden in 150 cm<sup>3</sup> Äthanol und 20 cm<sup>3</sup> Eisessig gelöst und in Anwesenheit von 1,5 g PtO<sub>2</sub> bei Zimmertemperatur hydriert. Die Wasserstoffaufnahme ist nach etwa 6 Stunden beendet. Die filtrierte Lösung wird im Vakuum eingengt und der Rückstand mehrmals aus Äthanol umkristallisiert. Ausbeute

1,18 g (16% der Theorie). Smp. 197 bis 198°. Die erhaltene Verbindung ist vom Ausgangsprodukt verschieden (IR-Spektrum; Mischsmp. zeigt starke Depression).  $C_{17}H_{23}N_3O_2 \cdot HCl$  (337,84).

#### 4. Pyridoxhydrazone (IV)

a) *p*-Nitrobenzal-pyridoxhydrazone-hydrochlorid (IV- $R_1 = pNO_2-C_6H_4-$ ). Eine Lösung von 500 mg Pyridoxhydrazin-dihydrochlorid in 10 cm<sup>3</sup> 80prozentigem Äthanol wird mit einer Lösung von 295 mg *p*-Nitrobenzaldehyd in 7,5 cm<sup>3</sup> abs. Äthanol versetzt. Es bildet sich sofort ein Niederschlag, der nach 15 Minuten abgenutscht (400 mg, Smp. 212 bis 215°) und aus 30 cm<sup>3</sup> Methanol umkristallisiert wird. Ausbeute 150 mg. Smp. 212 bis 215° (Zers.).  $C_{15}H_{18}N_4O_4Cl$  (352,77).

b) (2-Nitro-5-furfuryliden)-pyridoxhydrazone-hydrochlorid (IV- $R_1 = NO_2-\text{C}_5\text{H}_3\text{O}-$ ). Eine Lösung von 2,56 g Pyridoxhydrazin-dihydrochlorid in 20 cm<sup>3</sup> Wasser wird mit einer Lösung von 1,41 g 2-Nitro-5-furfurylaldehyd<sup>22</sup> in 10 cm<sup>3</sup> Äthanol versetzt. Der sich gleich ausscheidende Niederschlag wird nach einer Stunde gesammelt und aus Äthanol umkristallisiert. Ausbeute 1,7 g. Smp. 203 bis 205° (Zers.).  $C_{13}H_{15}N_4O_5Cl$  (342,74).

c) (2-Nitro-5-thienyliden)-pyridoxhydrazone-hydrochlorid (IV- $R_1 = NO_2-\text{C}_5\text{H}_3\text{S}-$ ). Eine Lösung von 2,56 g Pyridoxhydrazin-dihydrochlorid in 35 cm<sup>3</sup> Wasser wird mit einer Lösung von 1,57 g 2-Nitro-5-thiofenaldehyd<sup>21</sup> versetzt. Es bildet sich gleich ein gelber Niederschlag, der nach 15 Minuten abgenutscht und, da es sich nicht um das gewünschte Hydrazone handelt, verworfen wird. Aus den Mutterlaugen scheidet sich im Kühlschrank im Verlaufe von 24 Stunden ein rötliches Produkt aus. Ausbeute 1,15 g. Smp. 212 bis 215° (Zers.).  $C_{13}H_{15}N_4O_4SCl$  (358,80).

d) [ $\beta$ -(2-Nitro-5-thienyl)- $\alpha$ -bromacrolein]-pyridoxhydrazone-hydrochlorid (IV- $R_1 = NO_2-\text{C}_5\text{H}_3\text{S}-CH=CBr-$ ). Eine Lösung von 256 mg Pyridoxhydrazin-dihydrochlorid in 5 cm<sup>3</sup> Wasser wird mit einer Lösung von 270 mg  $\beta$ -(2-Nitro-5-thienyl)- $\alpha$ -bromacrolein<sup>23</sup> in 10 cm<sup>3</sup> abs. Äthanol versetzt. Das sich gleich ausscheidende rote Hydrazone wird aus 250 cm<sup>3</sup> Äthanol umkristallisiert. Ausbeute 250 mg. Smp. 200° (Zers.).  $C_{15}H_{16}N_4O_4SBrCl$  (463,75).

Wir danken Herrn Prof. Dr. R. FUSCO für die wertvollen Diskussionen während der Arbeit, Herrn A. RESTELLI und Fräulein Dr. G. PELIZZA für die Mikro- und organischen Analysen, Herrn Dr. G. G. GALLO für die physikalisch-chemischen Messungen und ihre Interpretation und Fräulein Dr. A. WITTEGENS für ihre Hilfe bei der Abfassung des Manuskripts.

#### Zusammenfassung

Pyridoxhydrazin-dihydrochlorid (2-Methyl-3-hydroxy-4-hydrazinomethyl-5-hydroxymethylpyridin-dihydrochlorid) und eine Reihe chemisch verwandter Verbindungen sind aus Pyridoxal durch Kondensation mit substituierten Hydrazinen und anschließende katalytische Reduktion hergestellt worden. Pyridoxhydrazin wurde auch mit einigen Aldehyden umgesetzt, wobei sich die erwarteten Pyridoxhydrazone bilden. Es wird über einige biologische Wirkungen dieser Verbindungen referiert.

EMILIO TESTA, ATTILIO BONATI und  
GIUSEPPE PAGANI

Forschungsabteilung der Lepetit S.p.A., Mailand