

H. Auterhoff und H. Hamacher*)

Die Farbreaktionen des Eserins

Aus dem Pharmazeutisch-chemischen Institut der Universität Tübingen

(Eingegangen am 11. April 1967)

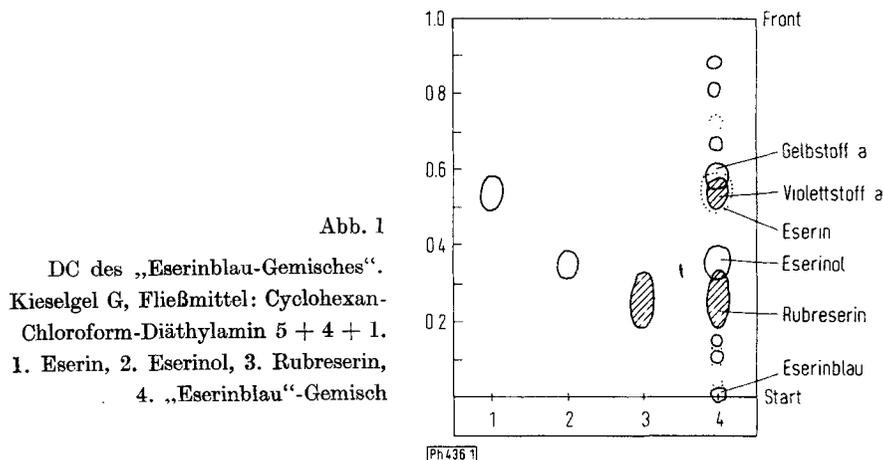
Es wurden die in Pharmakopöen benutzten Identitätsreaktionen für Eserin untersucht. Das mit Alkali entstehende Rubreserin wurde zur zusätzlichen Charakterisierung mit *o*-Phenylendiamin zum entsprechenden Phenazin umgesetzt.

Bei der Eserinblau-Reaktion entstehen mindestens 12 verschiedene Substanzen. Die blaugefärbte Komponente („Eserinblau“) wurde auf chromatographischem Wege in 15proz. Ausbeute rein dargestellt und als sauerstoffhaltiges Phenoxazonderivat identifiziert. Die theoretisch denkbare Chinonanilform konnte ausgeschlossen werden.

Weiter isoliert wurde eine dem Eserinblau sehr ähnliche violette Substanz, der „Violetstoff a“. Auch diesem kommt Phenoxazonstruktur zu.

Als ein Endprodukt der ammoniakalischen Zersetzung des Eserins wurde der „Gelbstoff a“ erkannt; er wurde als Phenazinderivat identifiziert.

Das Alkaloid Eserin ist durch auffällige Farbreaktionen gekennzeichnet. So wird es in den officinellen Arzneibüchern meist durch eine Rotfärbung mit Alkali („Rubreserin-Reaktion“) und eine Blaufärbung bei der Behandlung mit Ammoniak („Eserinblau-Reaktion“) charakterisiert; die Chemie dieser Umsetzungen ist aber



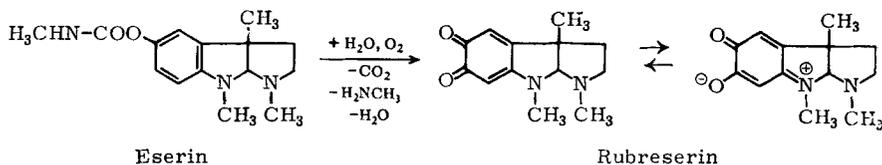
*) Teil der Dissertation H. Hamacher, Tübingen 1967.

nur unvollständig bekannt. Bereits orientierende Vorversuche zeigten, daß die Reaktionen komplizierter verlaufen als allgemein bisher angenommen wurde. Dampft man — wie dies *Petit* erstmals beschrieben hat¹⁾ — Eserin mit Ammoniak zur Trockne ein und chromatographiert an einer Kieselgel-Schicht, so treten 12 Flecke auf, wobei das eigentliche „Eserinblau“ noch am Start verbleibt (Abb. 1). Wir beschränken uns hier auf die Untersuchung der vier in größerer Menge entstehenden Substanzen: Rubreserin, Eserinblau, „Violettstoff a“ und „Gelbstoff a“. „Violettstoff a“ und „Gelbstoff a“ sind bisher noch nicht beschrieben worden.

Rubreserin

Rubreserin ist die am häufigsten beschriebene farbige Substanz dieser Reihe. Sie entsteht neben anderen Substanzen bei der Einwirkung von Alkali auf Eserin. Reines Rubreserin erhält man nur, wenn man Konzentrationen, pH-Werte und Zeitfaktoren günstig wählt. Ein geeignetes Verfahren ist im experimentellen Teil beschrieben. Die Umkristallisation — geeignet ist chloroformhaltiger Äther — ist nur mit großen Verlusten möglich.

Die Konstitutionsklärung des Rubreserins ist insbesondere auf *Ellis*²⁾ zurückzuführen. Er verglich das UV-Absorptionsspektrum des Rubreserins mit dem des Adrenochroms und formulierte es als Orthochinon:



Coyne und *Patterson*³⁾ gaben Rubreserin auf Grund des IR-Spektrums die Zwitterionenformel, die der Adrenochromformel von *Harley-Mason*⁴⁾ entspricht. Adrenochrom gibt mit Carbonylreagenzien nur Monokondensationsprodukte und reagiert mit *o*-Phenylendiamin nicht⁴⁾. Im Rubreserin liegt das Gleichgewicht zwischen Orthochinon- und Zwitterionen-Struktur offensichtlich stärker als im Adrenochrom auf der Seite des Orthochinons, denn bei der Umsetzung des Rubreserins mit *o*-Phenylendiamin konnten wir ein Kondensationsprodukt isolieren, dem auf Grund der Elementaranalyse, des Molekulargewichtes, der UV- und IR-Spektren die Struktur des Phenazins I zukommt. I ist eine gelbe Substanz, die insbesondere im UV-Licht eine grüne Fluoreszenz zeigt. Saure wäßrige Lösungen sind rot gefärbt, beim Alkalisieren schlägt die Farbe nach Gelborange um (Abb. 2).

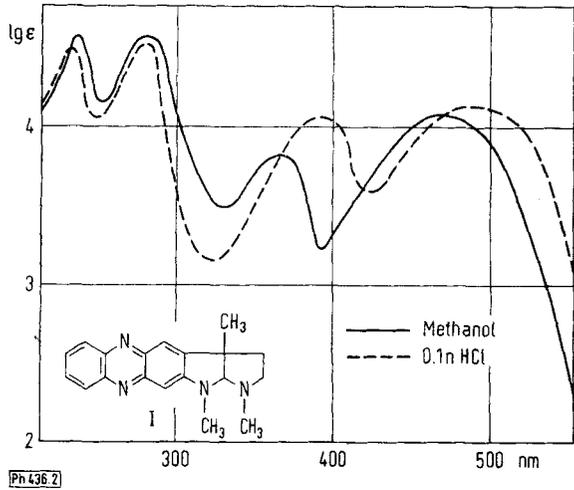
¹⁾ *M. A. Petit*, C. R. hebdomadaire des Séances Acad. Sci. Cr. 62, 569 (1871).

²⁾ *S. Ellis*, J. Pharmacol. exp. Therapeut. 79, 295, 309, 364 (1943).

³⁾ *W. E. Coyne* und *G. R. Patterson*, Canad. pharmac. J., Sci. Sec. 94, 45 (1961).

⁴⁾ *J. Harley-Mason*, Experientia (Basel) 4, 307 (1948).

Abb. 2
Elektronenspektrum
des Rubreserinphenazins



Das IR-Spektrum von I zeigt im Gegensatz zu dem des Rubreserins eine ausgeprägte C=N-Bande bei 1640 cm^{-1} , während die 1679 cm^{-1} -CO-Bande des Rubreserins bei I fehlt; auch zeigt I keine Banden bei 3400 cm^{-1} (NH bzw. OH) (Abb. 3).

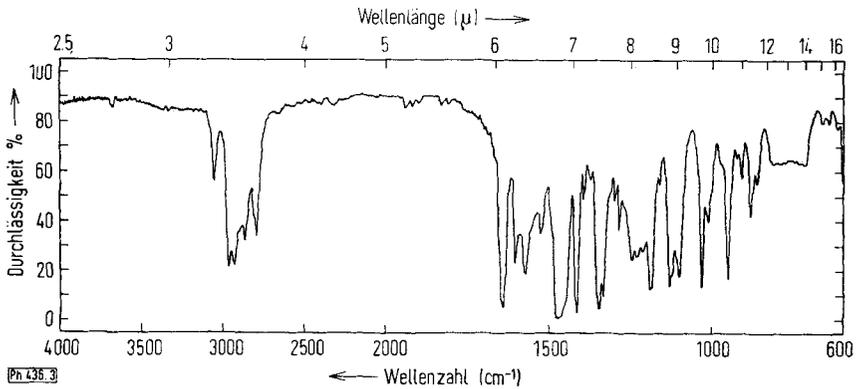


Abb. 3. IR-Spektrum des Rubreserin-phenazins

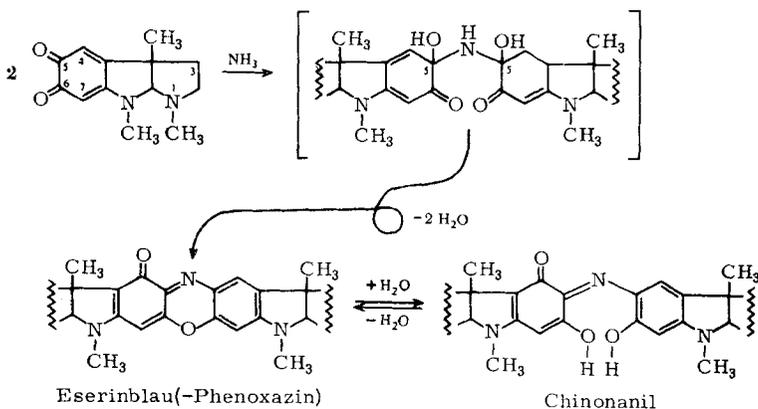
Eserinblau

Wird Eserin oder auch Rubreserin mit Ammoniaklösung zur Trockne eingedampft, so entsteht ein Substanzengemisch, dessen DC in Abb. 1 schematisch dargestellt ist. Die Zusammensetzung des Gemisches ist nicht wesentlich anders, wenn man nach *Salway*⁵⁾ eine alkoholische Eserinlösung mit Bariumhydroxidlösung unter Luftzutritt behandelt. Auch eigene Versuche, die Bildung der blauen Sub-

⁵⁾ A. H. Salway, J. chem. Soc. (London) 101, 978 (1912).

stanz im Gemisch auf Kosten der Begleitsubstanzen zu fördern, waren erfolglos. Daher versuchten wir, das eigentliche Eserinblau auf säulenchromatographischem Wege zu reinigen, und fanden, daß neutrales Aluminiumoxid das geeignetste Adsorbens war. Mit Chloroform wurden die meisten Begleitsubstanzen eluiert, Eserinblau konnte dann mit Methanol abgelöst werden. Die Ausbeute an dem fast einheitlichem Produkt betrug etwa 15% des eingesetzten Rubreserins oder Eserinols.

Eserinblau ist ein blaues, amorphes Pulver, das bis 350° nicht schmilzt, sich in Äthanol, Chloroform oder Wasser mit blauer Farbe löst, nicht aber in Äther und Benzol. In saurer Lösung ist Eserinblau recht stabil. Ein aus salzsaurer äthanolischer Lösung mit Äther ausgefälltes Hydrochlorid hatte jedoch keinen höheren Reinheitsgrad als die Base. Osmometrisch durchgeführte Molekulargewichtsbestimmungen ergaben den Wert von 450. Damit war die von *Pavolini*⁶⁾ an weniger reinen Eserinblaupräparaten aufgestellte Strukturformel als Phenoxazinderivat wahrscheinlich. Da aber im Eserinblau auch nach dem Trocknen bei 50° über P₂O₅ i. Vak. bei Zerewitinoff-Bestimmungen aktiver Wasserstoff nachgewiesen wurde und da durch Reduktionsmittel entfärbtes Eserinblau mit Eisen(III)-chlorid eine Rotfärbung gibt, die auf Phenole hindeutet, muß ein sauerstoffreicherer Molekül als dies *Pavolini* angegeben hat diskutiert und auch der ringgeschlossenen Phenoxazinstruktur das ringoffene Chinonanil gegenübergestellt werden. Die Verknüpfung beider Eserinmoleküle über N vom C-5 zum C-5 kann der Struktur des Rubreserins wegen als gesichert gelten; an Stelle der O-Verknüpfung im Phenoxazin vom C-6 zum C-6 könnte auch eine Verknüpfung vom C-6 nach C-4 eingetreten sein.



Eserinblau ist in mineralsaurer Lösung stabil, was für die Phenoxazinstruktur spricht, denn Chinonanile sind gegen Säuren labil. Dies haben *Piloty*⁷⁾ am Murexid,

⁶⁾ T. *Pavolini*, F. *Gambarin* und A. S. *Godenigo*, Gazz. chim. ital. 81, 527 (1951).

⁷⁾ O. *Piloty*, Liebigs Ann. Chem. 333, 32 (1904).

*Butenandt, Keck und Neubert*⁸⁾ an Ommochromfarbstoffen, *Auterhoff und Kinsky*⁹⁾ an Azomethinderivaten von Hydroxyanthronen und *Horner und Sturm*¹⁰⁾ an Anilin-farbstoffen gezeigt.

Im allgemeinen gestatten Elektronenspektren die Entscheidung zwischen Phenoxazin- und Chinonanilstruktur, denn Phenoxazine, die im UV-Bereich längerwellig absorbieren, können u. U. hydrolytisch durch Alkali zu Chinonanilen gespalten werden, deren Absorptionsmaxima um etwa 70 nm kürzerwellig liegen^{8) 11)}. Komplizierter wird das Bild, wenn es sich um aminosubstituierte Phenoxazine handelt; eine eindeutige Entscheidung ist hier nach den vorliegenden Beispielen nicht möglich*).

Für die Phenoxazonstruktur des Eserinblau spricht auch das IR-Spektrum mit einer ausgeprägten aromatischen Ätherbande bei 1287 cm^{-1} (Abb. 4) **).

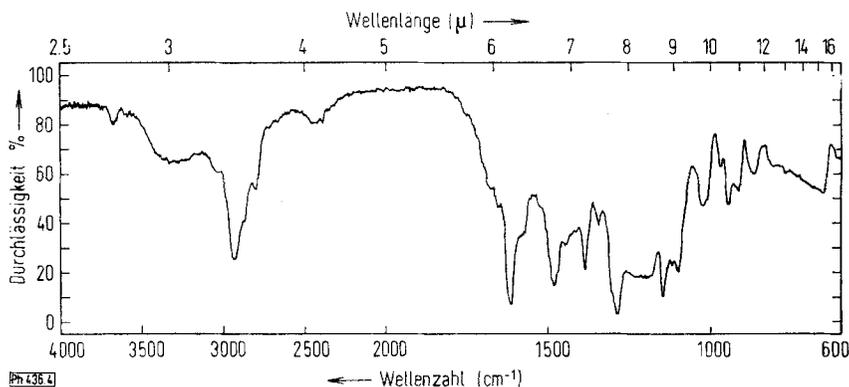


Abb. 4. IR-Spektrum von Eserinblau

„Violettstoff a“ und „Gelbstoff a“

Bei der Gewinnung von Eserinblau aus Rubreserin wurde durch Säulenchromatographie an Aluminiumoxid mit Chloroform ein Vorlauf gewonnen, der hauptsächlich eine violette und eine gelbe Substanz enthielt. Die Fraktion entsprach etwa 60% des eingesetzten Rubreserins. Das Gemisch wurde durch präparative Schichtchromatographie an Kieselgel G mit Aceton-Diäthylamin als Fließmittel in 9 Zonen zerlegt. Die am stärksten rotviolett gefärbte Zone wurde abgehoben und mit Metha-

*) Eine ausführliche Zusammenstellung interessierender Elektronenspektren findet sich in der Dissertation *H. Hamacher*, Tübingen 1967.

***) Neuerdings geben *H. Musso, K. Sparke und K. R. Walter* die Lage der Phenoxazonätherbande mit 1169 cm^{-1} an [Chem. Ber. 100, 1436 (1967)]. Eine Bande des Eserinblaus liegt bei 1150 cm^{-1} .

8) *A. Butenandt, J. Keck und G. Neubert*, Liebigs Ann. Chem. 602, 61 (1957).

9) *H. Auterhoff und G. Kinsky*, Arch. Pharmaz. 292, 621 (1959).

10) *L. Horner und K. Sturm*, Chem. Ber. 88, 329 (1955).

11) *H. Musso und H. G. Matthies*, Chem. Ber. 90, 1814 (1957).

not extrahiert. Man erhielt ein amorphes, hygroskopisches, violettgefärbtes Pulver („Violettstoff a“), das fast in allen Eigenschaften dem Eserinblau entspreche und sich nur im Rf-Wert und im sichtbaren Teil des Elektronenspektrums deutlich von diesem unterschied. So bleibt bei der DC an Kieselgel G Eserinblau mit allen Fließmitteln am Start, „Violettstoff a“ hat z. B. beim Fließmittel Aceton-Diäthylamin (9 + 1) den Rf-Wert von 0,5—0,6. Die IR-Spektren beider Substanzen sind sehr ähnlich. So muß auch für „Violettstoff a“ Phenoxazoncharakter angenommen werden. Aus Eserinblau entsteht bei längerem Aufbewahren der Substanz neben anderen Produkten auch etwas „Violettstoff a“, „Violettstoff a“ lagert sich andererseits z. T. in Eserinblau um. Die Einstellung eines Gleichgewichtes konnte aber nicht beobachtet werden. Eventuell ist „Violettstoff a“ ein weniger hydroxyliertes Eserinblau.

Aus dem Schichtchromatogramm zur Gewinnung von „Violettstoff a“ wurde auch die am stärksten gelb gefärbte Zone eluiert. Der gewonnene „Gelbstoff a“ scheint ein Endprodukt der ammoniakalischen Zersetzung des Eserins zu sein. Erhitzt man längere Zeit Eserin in 25proz. Ammoniaklösung, so enthält das Reaktionsgemisch, in dem Eserinblau und „Violettstoff a“ nicht mehr nachweisbar sind, mehrere gelbe und rote Bestandteile. Diese wurden schichtchromatographisch getrennt und die Zone des „Gelbstoff a“ extrahiert. Die amorphe, orangefarbene, sehr hygroskopische Substanz fiel in 13proz. Ausbeute, ber. auf Eserin, an. Die saure Lösung ist rot, die alkalische fluoresziert gelbgrün. Im IR-Spektrum des „Gelbstoff a“ fehlt die Phenoxazonätherbande bei 1287 cm^{-1} , es treten aber die Absorptionsbanden des Phenazingerüsts zwischen 1400 und 1650 cm^{-1} auf; die Bande bei 1623 cm^{-1} kann der C=N-Valenzschwingung zugeordnet werden. So ist „Gelbstoff a“ sicher ein Phenazinderivat, über dessen Substitution aber keine Aussagen gemacht werden können.

Wir danken dem Fonds Chemie für die Unterstützung der Arbeit.

Beschreibung der Versuche

Gewinnung von Rubreserin

1 g Eserinsulfat wird mit 100 ml 0,1 n NaOH 10 Min. geschüttelt, der Ansatz rasch mit gesättigter Weinsäurelösung angesäuert und mit Natriumhydrogencarbonatlösung auf pH 8 gebracht. Man extrahiert 4mal mit je 50 ml Äther, wodurch Eserin und Eserinol entfernt werden. Anschließend wird 4mal mit je 50 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten Chloroformauszüge werden zur Trockne gebracht. Das gewonnene Rubreserin, das in etwa 35proz. Ausbeute anfällt, enthält noch etwas Eserinol und Eserinblau. Eine Umkristallisation ist aus Chloroform-Äther (1 + 9) möglich; die Ausbeute an reinstem Rubreserin (Schmp. 152°) beträgt 10% des rohen Rubreserins.

Phenazin des Rubreserins (I)

50 mg Rubreserin, 23,3 mg o-Phenylendiamin, 3 ml Äthanol und 2 ml Wasser wurden 2 Std. unter Rückfluß erhitzt, die Lösung auf $\frac{2}{3}$ des Vol. eingengt, mit Natronlauge alkalisiert und 6mal mit je 25 ml Petroläther (Sdp. $50\text{--}70^\circ$) ausgeschüttelt. Der Petrolätherrückstand betrug 49 mg. Eine etwas niedrigere Ausbeute wurde erzielt, wenn man als Lösungsmittel 1 ml Äthanol + 1 ml Eisessig verwendete. Die Ausbeute war kaum halb so

hoch, wenn als Lösungsmittel 1 ml Äthanol + 7 ml 34proz. Salzsäure verwendet wurden. Der Schmp. von I lag nach dem Trocknen bei 80° i. Vak. über P₂O₅ bei 99—100°.

C₁₉H₂₀N₄ Ber.: C 74,97 H 6,62 N 18,40 Mol.-Gew. 304,4
Gef.: C 73,40 H 6,73 N 16,63 Mol.-Gew. 335 (osmometr.)

Das Hydrochlorid wurde aus Äther mit HCl gefällt; der Schmp. lag nach zweimaligem Umkristallisieren aus Äthanol/Äther bei 213—215°.

C₁₉H₂₂N₄Cl₂ · H₂O (395,3) Ber.: C 57,73 H 6,12 N 14,17 Cl 17,94
Gef.: C 57,45 H 6,26 N 12,93 Cl 16,06
C 57,33 H 6,37 N 13,63 Cl 15,96

Gewinnung von Eserinblau

500 mg Rubreserin wurde in 40 ml Äthanol unter Einleiten von NH₃-Gas 3 Std. unter Rückfluß erhitzt und das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in 10 ml Chloroform gelöst und die Lösung auf eine Säule mit 30 g Aluminiumoxid (neutral) gegeben. Mit Chloroform wurden eine gelbe und zwei rotviolette Zonen heruntergelöst und dann mit Methanol das Eserinblau eluiert. Die blaue Substanz wurde noch 2mal in gleicher Weise über je 10 g Aluminiumoxid gereinigt. Ausbeute an Eserinblau nach einmaliger Säulenchromatographie 80 mg.

C₂₆H₃₁N₅O₂ · 3H₂O Ber.: C 62,51 H 7,47 N 14,02 Akt. H 1,2 Mol.-Gew. 499,6
Gef.*): C 63,39 H 6,96 N 14,69 Akt. H 1,0 Mol.-Gew. 450
(osmometr.)

Hydrochlorid

C₂₆H₃₁N₅O₂ · 4H₂O · 3HCl (627,0) Ber.: C 49,81 H 6,75 N 11,17 Cl 19,96
Gef.*): C 49,80 H 6,78 N 12,00 Cl 16,13

Gewinnung von „Violettstoff a“

Die bei der säulenchromatographischen Reinigung des Eserinblaugemisches an Aluminiumoxid gewonnene Chloroformlösung wurde zur Trockne gebracht. 60 mg des Rückstandes wurden in 4 ml Chloroform gelöst und auf eine Kieselgel-G-Platte (Schichtdicke 1,5 mm) zur präparativen Trennung aufgetragen. Entwickelt wurde mit dem Fließmittel Aceton-Diäthylamin (9 + 1). Von den entstandenen 9 Zonen (Abb. 5) wurde die rotviolette (Rf 0,45 bis 0,65) abgehoben, mit Methanol eluiert und erneut an der Kieselgelschicht chromatographiert. Der Rückstand des Methanoleluats wurde in 5 ml Chloroform gelöst, die Lösung filtriert, zur Trockne gebracht und der Rückstand über P₂O₅ bei 50° getrocknet. Ausbeute: 20 mg.

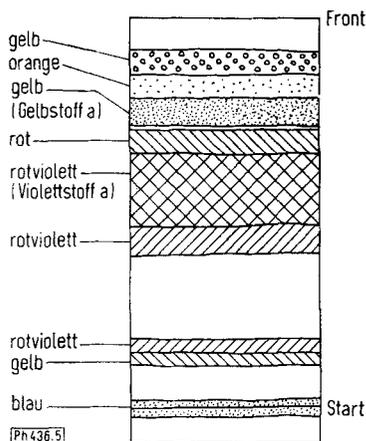


Abb. 5

Schematisches Chromatogramm zur Gewinnung von „Violettstoff a“ und „Gelbstoff a“

Da sich bei jeder chromatographischen Operation Zersetzungsprodukte neu bilden, kann die Reinigung des „Violettstoffs a“ nicht beliebig oft wiederholt werden.

C₂₆H₃₁N₅O₂ · 2H₂O Ber.: C 64,84 H 7,33 N 14,54 Akt. H 0,84 Mol.-Gew. 481,6
Gef.*): C 65,12 H 7,13 N 14,15 Akt. H 1,03 Mol.-Gew. 425

*) Mittelwerte von 4 Chargen.

Gewinnung von „Gelbstoff a“

a) Vom Schichtchromatogramm Abb. 5 wurden die gelben Zonen Rf 0,75—0,90 abgehoben, mit Methanol eluiert und erneut an einer Kieselgel-Schicht chromatographiert, wobei Petroläther (Sdp. 50—70°)-Chloroform-Diäthylamin (6 + 3 + 1) als Fließmittel verwendet wurde. Von 3 entstehenden Zonen wurde die am stärksten entwickelte (Rf 0,35 bis 0,45) eluiert und gab „Gelbstoff a“. Die Substanz wurde mit Chloroform umgelöst.

b) 1 g Eserin, 5 ml Äthanol und 50 ml 25proz. Ammoniaklösung wurden unter Einleiten von NH₃-Gas 24 Std. am Rückfluß erhitzt. Die Mischung wurde zur Trockne gebracht und wie oben beschrieben chromatographiert. Ausbeute an „Gelbstoff a“ 130 mg.

Anschrift: Prof. Dr. H. Auterhoff, 74 Tübingen, Wilhelmstr. 27.

[Ph 486]

H. Pischel und G. Wagner

Nucleotidanaloga von 1-(β -D-Ribofuranosyl)-pyridon-(2)

Aus dem Pharmazeutischen Institut der Karl-Marx-Universität Leipzig

(Eingegangen am 11. April 1967)

Bei der Umsetzung von 1-Brom-2,3-di-O-benzoyl-5-O-diphenylphosphoryl-D-ribofuranose (I) mit dem Silbersalz des 2-Hydroxypyridins (II) nach dem *Fischer-Helferich*-Verfahren entsteht das 2-Hydroxypyridin-O-Derivat III. III kann durch O \rightarrow N-Umglykosidierung mittels HgBr₂ in das Pyridon-(2)-N-Derivat IV übergeführt werden, wobei die Ausbeuten von der HgBr₂-Konzentration abhängen. Durch quantitativen Vergleich mit der O \rightarrow N-Umglykosidierung des benzylierten 2-Hydroxypyridin-O-ribofuranosids IIIa unter gleichen Bedingungen wurde festgestellt, daß die Diphenylphosphorylgruppe in 5'-Stellung des Ribofuranosidrestes einen hemmenden Einfluß auf die genannte Reaktion ausübt.

IV kann auch aus dem 2',3'-Di-O-benzoylribofuranosid V und Diphenylphosphochloridat erhalten werden. Alkalische Hydrolyse von IV mittels 0,5 n NaOH ergibt Pyridon-(2)-N-ribofuranosid-5'-phenylphosphat (VI), das durch Schlangengiftphosphodiesterase in Pyridon-(2)-N-ribofuranosid-5'-phosphat (VII) gespalten wird. VII entsteht auch aus dem 2',3'-Isopropylidenribofuranosid VIII und β -Cyanäthylphosphat durch Kondensation mit Dicyclohexylcarbodiimid und Abspaltung der Schutzgruppen. VII wird durch intestinale alkalische Phosphatase in Pyridon-(2)-N-ribofuranosid und Phosphorsäure gespalten.

Die Synthese von Nucleotiden erfolgt in der Regel vom Nucleosid aus, das nach einem der in den letzten Jahren zahlreich entwickelten Methoden phosphoryliert wird¹⁾ 2). Prinzipiell werden nach diesen Methoden das in geeigneter Weise ge-

¹⁾ *Houben-Weyl*, Methoden der organischen Chemie, Band XII, Organische Phosphorverbindungen, Teil 2, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1964.

²⁾ *F. Cramer*, Angew. Chem. 73, 49 (1961); 78, 186 (1966).