

dieses Triglykosids mit Strophanthobiase gab krist. Odorobiosid K, während mit dem Enzym aus den Samen von *Adenium multiflorum* das bekannte Odorosid B erhalten werden konnte. Milde saure Hydrolyse von Odorosid K lieferte das bekannte Odorigenin B (= Uzarigenin) sowie eine Triose. Letztere gab bei der Acetolyse krist. α -Octacetyl-gentiobiose. Daraus ergibt sich für Odorosid K die Konstitution eines 4-D-Gentiobiosido-uzarigenin-D-diginosids. Aus den spez. Drehungen folgt, dass sämtliche Zuckerreste β -glykosidisch verknüpft sind. In kleiner Menge konnten auch freies Odorosid K sowie Odorobiosid K aus der Rinde erhalten werden.

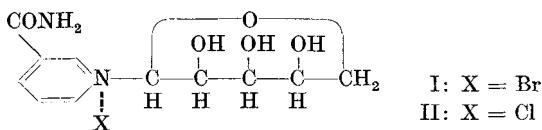
Organisch-Chemische Anstalt der Universität Basel.

161. Darstellung eines Iso-[3-carbonsäureamid-N¹-D-ribosido-pyridiniumbromids] und verwandter Verbindungen

von M. Viscontini, M. Marti und P. Karrer.

(17. V. 54.)

Vor kurzem haben wir ein kristallisiertes 3-Carbonsäureamid-N¹-D-ribosido-pyridiniumbromid (I) beschrieben, welches aus Nicotinsäureamid und der Tetracetylribose vom Smp. 110° dargestellt worden ist¹⁾; der Zucker ist in ihm in pyranosider Struktur vorhanden, die Konfiguration wahrscheinlich β -glucosidisch.



Ausser der Tetracetylribose vom Smp. 110° existiert noch eine solche vom Smp. 85°²⁾. Die Ursache dieser Isomerie war bisher nicht ganz sicher (α - β -Formen oder Ringisomere). Wir haben versucht, auch aus der Tetracetylribose vom Smp. 85° ein 3-Carbonsäureamid-N¹-D-ribosido-pyridiniumbromid zu gewinnen. Dies ist nach Überwindung beträchtlicher Schwierigkeiten insofern gelungen, als eine Verbindung mit der richtigen, Formel II entsprechenden Zusammensetzung gewonnen werden konnte, die sich auch papierchromatographisch einheitlich verhielt. Sie liess sich aber bisher nicht zur Kristallisation bringen.

¹⁾ M. Viscontini, R. Hochreuter & P. Karrer, *Helv.* **36**, 1777 (1953); *Biochem. et Biophysica Acta* **12**, 51 (1953).

²⁾ G. A. Howard, B. Lythgoe & A. R. Todd, *Soc.* **1947**, 1052; H. Zinner, *B.* **83**, 153 (1950).

Dem *Schweiz. Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung*, mit dessen Unterstützung die vorliegende Arbeit ausgeführt wurde, sprechen wir unseren verbindlichsten Dank aus.

Experimenteller Teil.

Darstellung der Tetracetylribosen¹⁾. In einem 500-ml-Kolben mit seitlichem Ansatz zur Einführung des Thermometers, Dreihalsaufsatz mit Rückflusskühler (Chlorcalciumrohr), Schlifführer und Tropftrichter wurden 120 ml Pyridin auf 95° vorgewärmt. Hierauf gab man durch den Thermometer-Ansatz 50 g D-Ribose unter Rühren hinzu. Nach 4–5 Min. war Lösung eingetreten, hierauf erwärmte man die Flüssigkeit auf 92°, entfernte das Wasserbad und setzte unter Rühren tropfenweise 170 ml Essigsäureanhydrid hinzu und zwar so langsam, dass die Temperatur nie über 96° stieg. Die Lösung blieb dunkelgelb, bis ca. $\frac{2}{3}$ des Anhydrids zugegeben waren, dann wurde sie weinrot. Nach beendigter Zugabe des Essigsäureanhydrids, die ca. 40 Min. dauerte, wurde das Reaktionsgemisch noch 15 Min. auf 96° erhitzt, hierauf auf 0° abgekühlt und in 500 ml Eiswasser gegossen. Dabei schied sich ein hellbraunes Öl ab, das nach einigen Minuten nach dem Kratzen der Glaswände kristallin erstarrte. Man nutschte den gelben Kristallbrei ab, wusch ihn viermal mit 100 ml Eiswasser und trocknete die Substanz im Exsikkator über Calciumchlorid und KOH. Ausbeute 89 g.

Dieses Rohprodukt stellte eine Mischung der Tetracetylribose vom Smp. 110° und der Tetracetylribose vom Smp. 85° dar. Zur Trennung der beiden Isomeren eignete sich folgendes Verfahren: Das Gemisch wurde in der vierfachen Menge Methanol gelöst, die Lösung mit Tierkohle entfärbt und in den Eisschrank gestellt, bis sich die ersten Kristalle zeigten. Bei Raumtemperatur kristallisierten dann beide Formen nebeneinander aus, das Acetat vom Smp. 110° in Form von Bipyramiden, das Acetat vom Smp. 85° in Form von Prismen. Durch Herauslesen mit der Pinzette wurden einige grössere Impfkristalle von beiden Sorten gewonnen. Nachdem durch Erwärmen das Kristallgemisch wieder gelöst worden war, wurde die noch warme Lösung mit einigen Kristallen vom Smp. 110° geimpft und 4 Tage bei Raumtemperatur stehengelassen. Auf diese Weise wurden zuerst 15 g vom Produkt Smp. 110° gewonnen. Nach wiederholtem Einengen bis auf 100 ml und Impfen haben wir insgesamt 40 g vom etwas schwerer löslichen Produkt Smp. 110° erhalten. Aus der Restlösung wurde durch Impfen und tagelanges Stehenlassen das Acetat vom Smp. 85° in Prismen von bis zu 3 cm Länge und 10 g Gewicht gewonnen. Daneben schieden sich noch einige Kristalle des Acetats vom Smp. 110° aus. Totalausbeute (aus 50 g Ribose) 32,2 g Acetat Smp. 85° und 48,5 g Acetat Smp. 110°.

Iso-[N¹-(triacetyl-D-ribosido)-3-carbonsäureamid-pyridiniumbromid bzw. -chlorid]. 7,5 g Tetracetylribose vom Smp. 85° wurden in einem 100-ml-Schliffkölbchen mit 15 g einer gesättigten Lösung von HBr in Eisessig versetzt und die Mischung 75 Min. bei 0° stehengelassen. Dabei trat Lösung ein. Hierauf hat man unter 10 mm Druck bei 40–45° Badtemperatur alle flüchtigen Anteile abdestilliert, den öligen Rückstand mit dem doppelten Volumen trockenen Toluols vermischt und dieses hierauf unter den selben Bedingungen wieder abdestilliert, wodurch die Entfernung der letzten Reste von Eisessig und Bromwasserstoff weitgehend gelang. Der Rückstand, ein bräunliches Öl, wurde zweimal mit dem vierfachen Volumen trockenen Petroläthers verrieben und der Petrolätherextrakt vom Rückstand dekantiert. Den letzteren, die rohe Acetobromribose, haben wir im fünffachen Volumen Acetonitril gelöst und unter Schütteln in 3–4 Portionen zur vorbereiteten Lösung von 4,0 g Nicotinsäureamid und 1,73 ml Essigsäure in 80 ml Acetonitril gegeben. Bei der Reinigung der Lösung fiel ein Niederschlag aus, der aus Nicotinsäureamid-hydrobromid bestand.

Das Gemisch wurde 90 Min. bei Raumtemperatur stehengelassen, hierauf 4 Std. am Rückflusskühler zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen und Aufbewahren bei Zimmertemperatur schied sich im Laufe von 10 Std. weiteres Nicotinsäureamid-hydro-

¹⁾ Vgl. H. Zinner, B. **83**, 153 (1950).

bromid ab, das abgenutscht, mit Acetonitril gewaschen und getrocknet wurde (insgesamt 2,4 g). Das Filtrat haben wir im Vakuum bei 40–45° Badtemperatur so weit wie möglich eingeeengt, dann zweimal das dreifache Volumen absoluten Alkohols zugesetzt und diesen im Vakuum wieder abgedampft. Schliesslich wurde der Rückstand dreimal mit absolutem Äther verrieben, letzterer dekantiert, der Rückstand in ca. 5 ml Methanol aufgenommen und unter Schütteln langsam in 250 ml absoluten Äther eingetropft. Dabei schied sich das rohe Iso-[N'-triacetyl-ribosido-nicotinsäureamid-hydrobromid] als amorphe, gelbliche Masse aus. Es wurde nach dem Abgiessen des Äthers noch zweimal mit Äther durchgerieben und hierauf getrocknet. Ausbeute 1,5 g.

Zur Reinigung der Substanz, welche noch erhebliche Mengen von Nicotinsäureamid enthielt, wurde ein Chromatogramm in einer Cellulosesäule (*Whatman*-Pulver) vorgenommen. Der Durchmesser der Säule war 3,4 cm, die Höhe der Füllung 60 cm. Die Füllung geschah nach früher gegebener Vorschrift¹⁾. Als Entwicklungsflüssigkeit diente eine Mischung von 4 Teilen mit Wasser gesättigtem n-Butanol und 1 Teil Äther. Die Durchflussgeschwindigkeit betrug 12 ml pro Stunde. Man fing Fraktionen zu 12–15 ml auf. Durch spektroskopische Untersuchung wurde festgestellt, in welchen Fraktionen sich das gesuchte Iso-N¹-(triacetyl-D-ribosido)-3-carbonsäureamid-pyridiniumbromid befand. Diese wurden vereinigt und im Vakuum zur Trockene eingedampft, der Rückstand in wenig Methanol aufgenommen und durch Eintropfen dieser Lösung in Äther die Substanz wieder ausgefällt. Ausbeute 0,600 g. Das Iso-N¹-(triacetyl-D-ribosido)-3-carbonsäureamid-pyridiniumbromid konnte nicht in kristallisiertem Zustande erhalten werden, es war aber papierchromatographisch geprüft einheitlich (Rf = 0,37, Lösungsmittel n-Butanol-Wasser-Eisessig 20:7:3) und die Analyse gab auf ein Monohydrat stimmende Werte:

$C_{17}H_{21}O_8N_2Br \cdot H_2O$	Ber. C 42,60	H 4,85	N 5,87%
(479,28)	Gef. „ 42,53	„ 4,88	„ 6,03%
$[\alpha]_D^{20} = +43^\circ (\pm 1^\circ).$			

In analoger Weise haben wir in einem zweiten Versuch aus Acetochlorribose das rohe Iso-N¹-(triacetyl-D-ribosido)-3-carbonsäureamid-pyridiniumchlorid hergestellt, wobei aber eine bei 0° mit HCl gesättigte Ätherlösung auf Tetracetylribose vom Smp. 85° zur Einwirkung kam. Für die nachfolgend beschriebene Verseifung dieses Präparates wurde auf eine Trennung der Verbindung von dem beigemischten Nicotinsäureamid verzichtet, da letzteres bei der Verseifung selber in gewissem Umfange gebildet wird.

Iso-[3-carbonsäureamid-N¹-D-ribopyranosido-pyridiniumchlorid]. 4,5 g des rohen (noch Nicotinsäureamid enthaltenden) Iso-[N¹-(triacetyl-D-ribosido)-3-carbonsäureamid-pyridiniumchlorids] wurden in 9 ml Wasser gelöst, je 3 ml dieser Lösung in 40 ml auf 90° vorgewärmte n.-Salzsäure, welche durch Einleiten von HCl in destilliertes Wasser gewonnen worden war, gegossen und 15 Min. bei 90° gehalten. Darauf hat man die Salzsäure im Vakuum bei 40° Badtemperatur abdestilliert, den Rückstand zweimal in abs. Alkohol aufgenommen, das Lösungsmittel wiederum im Vakuum verdampft, den Rückstand mit Äther gewaschen, schliesslich in trockenem Methanol gelöst und durch Eingiessen dieser Lösung in die 30fache Menge trockenen Äthers das Reaktionsprodukt ausgefällt. Ausbeute ca. 2,3 g. Diese Substanz bestand aus Nicotinsäureamid-hydrochlorid und Iso-[3-carbonsäureamid-N¹-D-ribosido-pyridiniumchlorid]; im Papierchromatogramm wurden 2 Flecken mit den Rf-Werten 0,22 und 0,12 gefunden. Als Lösungsmittel diente ein Gemisch von Butanol-Wasser-Essigsäure im Verhältnis 20:7:3.

Zur Trennung der beiden Anteile hat man das Rohprodukt in einem Cellulosepulver-Chromatogramm getrennt. 2,3 g der Substanz wurden in wenigen ml Methanol gelöst, die Lösung auf Cellulosepulver (*Whatman*, Standard Grade) aufgetropft, das Cellulosepulver-Adsorbat hierauf im Exsikkator getrocknet, fein zerrieben, anschliessend mit dem nachfolgend beschriebenen Lösungsmittelgemisch angefeuchtet und schliesslich auf die während 2 Tagen mit dem gleichen Lösungsmittel vorgewaschene Cellulosepulver-

¹⁾ H. Schmid, J. Kebrle & P. Karrer, *Helv.* **35**, 874 (1952).

Säule aufgetragen. (Der Durchmesser der Säule betrug 3,2 cm, die Höhe der Cellulosepulver-Füllung 37 cm. Das Cellulosepulver war vorher unter Rühren im Vakuum in 50-proz. wässrigem Äthanol, dem 1% Oxy-chinolin zugesetzt war, aufgeschlämmt worden; hierauf hat man es in das Glasrohr eingefüllt und durch Rühren mit dem Glasstab die eingeschlossenen Luftblasen entfernt. Durch das Beklopfen des Rohres mittels eines Gummischlauches wurde die Dichte der Cellulosefüllung auf 0,42 g pro cm³ gebracht.)

Zur Entwicklung des Chromatogramms diente ein Gemisch von Butanol-Eisessig-Wasser im Verhältnis 500:30:70 ml.

Die Entwicklung des Chromatogramms geschah während 12 Tagen, die Tropfgeschwindigkeit betrug 4 Tropfen pro Min. Die in einem Fraktionensammler aufgefangenen Eluate wurden spektrophotometrisch auf ihren Gehalt an den einzelnen Komponenten geprüft. Die aus Iso-[N¹-D-ribopyranosido-3-carbonsäureamid-pyridiniumchlorid] erhaltenen Fraktionen hat man vereinigt, das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert, den Rückstand durch mehrmaliges Aufnehmen in abs. Alkohol und Wiederverdampfen des Lösungsmittels getrocknet und schliesslich die Substanz durch Eingiessen der alkoholischen Lösung in Äther als farbloses amorphes Pulver ausgefällt. Ausbeute 500 mg. $[\alpha]_D^{20} = +49^{\circ}$ ($\pm 0,4^{\circ}$). Die Analyse ergab Werte, die auf einen Wassergehalt von ca. 0,5 Mol hinweisen.

$C_{11}H_{15}O_5N_2Cl, \frac{1}{2} H_2O$	Ber. C 44,07	H 5,39	N 9,35	Cl 11,82%
(299,75)	Gef. „ 43,35	„ 5,15	„ 8,85	„ 11,80%

Das Papierchromatogramm wies einen einzigen Fleck mit Rf 0,11 auf. Lösungsmittel Butanol-Wasser-Essigsäure-Gemisch 20:7:3.

Oxydation des Iso-[3-carbonsäureamid-N¹-D-ribosido-pyridiniumchlorids] mit Perjodsäure. 19,02 mg Substanz wurden in wenig Wasser gelöst, 2,00 ml ca. 0,25-n. Natriummetaperjodatlösung zugesetzt und dieses Gemisch mit Wasser auf 25 ml gebracht. Nach 2 und nach 4 Tagen hat man Proben entnommen und das gebildete Jod mittels 0,01-n. Lösung arseniger Säure titriert. Schon nach 2 Tagen war die Oxydation beendet. Verbrauch an Perjodsäure 23,51 mg entspr. 1,94 Mol.

Während nach der Oxydation des 3-Carbonsäureamid-N¹-D-ribosido-pyridiniumbromids mit Perjodsäure die dabei entstandene Ameisensäure durch direkte Titration der Oxydationslösung mit 0,01-n. Natronlauge bestimmt werden konnte¹⁾, war dies bei der Oxydation des Iso-[3-carbonsäureamid-N¹-D-ribosido-pyridiniumchlorids] aus unbekanntem Grunde nicht der Fall. Die titrierte Ameisensäuremenge fiel zu niedrig aus, so dass die Annahme gemacht werden muss, dass ein Teil der entstandenen Ameisensäure gebunden worden war. Aus diesem Grunde haben wir im letzteren Versuch die entstandene Ameisensäure zuerst aus der Reaktionslösung abdestilliert. Die Bestimmung gestaltete sich dann folgendermassen:

21,20 mg Kupplungsprodukt wurden in 2,0 ml 0,12-m. Natriummetaperjodat gelöst, Wasser bis zum Volumen von 25,0 ml zugegeben und die Lösung 48 Std. stehen gelassen. Nach dieser Zeit hat man 500 mg Natriumhydrogencarbonat und 250 mg Kaliumjodid zugegeben und die Lösung mit ca. 0,1-n. arseniger Säure bis zum Umschlag Gelb/Farblos versetzt (ohne Stärke-Zusatz). Hierauf wurde Schwefelsäure bis zum pH 3 zugegeben, die Flüssigkeit mit 30 ml heiss gesättigter Silbersulfatlösung versetzt und das abgeschiedene Silberjodid abfiltriert. Den Rückstand wusch man mit je 3 ml Wasser. Vom Filtrat, das ca. 80 ml betrug, wurden 20 ml abdestilliert, durch 20 ml Wasser im Destillierkolben ersetzt, wieder 20 ml abdestilliert, ersetzt und bis zu einem Gesamtvolumen des Destillates von 50 ml weiter abdestilliert. $\frac{4}{5}$ dieses Destillates verbrauchten bei der Titration 5,10 ml 0,01-n. NaOH, die 21,20 mg angewandte Substanz ($\frac{5}{5}$) daher 6,375 ml 0,01-n. NaOH. Dies entspricht 0,90 Mol HCOOH pro Mol $C_{11}H_{15}O_5N_2Cl, \frac{1}{2} H_2O$ (Mol.-Gew. 299,75).

¹⁾ Helv. 36, 1777 (1953).

Qualitativer Nachweis der Ameisensäure durch Papierchromatographie. $\frac{1}{5}$ der aus der Oxydationslösung abdestillierten Ameisensäure entsprach also ungefähr 1 mg HCOOH. Die Lösung wurde mit Natronlauge auf pH 8—9 gebracht, fast zur Trockene eingengt und in 1 ml Wasser aufgenommen. Ca. 20 γ des so erhaltenen Natriumformiat haben wir neben gleichen Mengen von reinem Natriumformiat und Natriumacetat auf *Whatman*-Nr.-1-Papier aufgetragen. Als Lösungsmittel diente *n*-Butanol, gesättigt mit 1,5-n. NH_3 . Das Chromatogramm lief 15 Std., wurde 15 Min. bei 100° getrocknet und mit Bromkresolpurpurlösung (0,04% in Äthanol) besprüht. Die Flecken der Ammoniumsalze erschienen blau auf gelbem Grund.

Da die *R_f*-Werte von Ameisensäure und Essigsäure sehr nahe beieinander liegen (0,09 und 0,1) hätte nicht mit Sicherheit zwischen den beiden Säuren unterschieden werden können. Wohl aber wurde die Ameisensäure eindeutig nachgewiesen durch Besprühen mit Silbernitrat-Ammoniak-Lösung, wobei das Formiat die Silberlösung reduzierte, das Acetat hingegen nicht.

Optische Drehung der beiden isomeren 3-Carbäthoxy- N^1 -D-ribosido-pyridiniumbromide, vor der Oxydation mit Perjodsäure, und der durch die Oxydation entstandenen Dialdehyde. Je 20,60 mg der beiden isomeren Bromide I und II wurden in 2 ml 0,12-m. Natriumperjodatlösung gelöst. Die spezifischen Drehungen der beiden Verbindungen betrugen vor der Oxydation $[\alpha] = +1^\circ$ bzw. $+49^\circ$. Die nach 4 Std. gemessenen optischen Drehungen der Oxydationslösungen ergaben die spezifischen Drehungen $+77,8^\circ$ bzw. $-71,0^\circ$. Nach 4stündiger Einwirkung des Perjodats blieben die gemessenen Drehwerte konstant.

Zusammenfassung.

Aus der Tetracetylribose vom Smp. 85° wurde über die entsprechende Acetobromribose ein neues 3-Carbonsäureamid- N^1 -D-ribosido-pyridiniumbromid gewonnen, welches mit einem früher (Helv. 36, 1777 (1953)) dargestellten 3-Carbonsäureamid- N^1 -D-ribosido-pyridiniumbromid isomer ist und daher als Iso-[3-carbonsäureamid- N^1 -D-ribosido-pyridiniumbromid] bezeichnet wird. In ähnlicher Weise wurde auch das entsprechende Chlorid erhalten. Aus den Ergebnissen der Titration mit Perjodsäure (Verbrauch 1,94 Mol Perjodat und Bildung von 0,9 Mol Ameisensäure) muss geschlossen werden, dass auch in der neuen Verbindung die Ribose pyranoside Struktur besitzt. Iso-[3-carbonsäureamid- N^1 -D-ribosido-pyridiniumbromid] steht daher zum früher beschriebenen 3-Carbonsäure- N^1 -D-ribosido-pyridiniumbromid wahrscheinlich im Verhältnis von α - zu β -glucosidischen Formen.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.