

Steroid und schüttelten die Suspension 24 Std. bei 28°. Nach der Filtration wurde die so erhaltene wäßrige Lösung (W_I) mit dem gleichen Vol. wassergesättigtem Äther 20 Min. bei Raumtemperatur geschüttelt. Beide Phasen wurden wiederum getrennt. Zur Gehaltsbestimmung diente die extrahierte wäßrige Lösung (W_{II}).

Die wäßrigen Lösungen der einzelnen Steroide, W_I und W_{II} , wurden mit Chloroform ausgeschüttelt, die mit Natriumsulfat getrockneten Extrakte wurden i. Vak. unter Stickstoff eingedampft.

Die Rückstände wurden wie unter A bestimmt. Die Berechnung des Verteilungskoeffizienten (VK) erfolgte nach der Beziehung

$$VK = \frac{W_I - W_{II}}{W_{II}}$$

Anschrift: Doz. Dr. R. Hüttenrauch, 69 Jena, Otto-Schott-Straße.

[Ph 578]

H. J. Roth und K.-H. Surborg

Die Rolle der Borsäure bei der Gehaltsbestimmung von Pyridoxol mit 2,6-Dichlorchinonchlorimid*)

Aus dem Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn

(Eingegangen am 15. Januar 1968)

Die Farbreaktion zwischen Pyridoxol und 2,6-Dichlorchinonchlorimid, die zu einem blauen Aza-Indophenol führt, wird in Anwesenheit von Borsäure deshalb verhindert, weil die phenolische Hydroxylgruppe an der Bildung eines Bispyridoxolborates beteiligt ist.

Aus Pyridoxol, Borsäure und geeigneten bifunktionellen Verbindungen sowie aus Pyridoxol und Diphenylborinsäure lassen sich kristalline Borchelate und Spiroborate herstellen, an deren Bildung jeweils die phenolartige OH-Gruppe und die benachbarte HOH_2C -Gruppe des Pyridoxols beteiligt sind.

The colour-reaction between pyridoxole and 2,6-dichlorquinone-chloroimide which forms a blue aza-indophenole is inhibited by boric acid because the phenolic hydroxyl-group takes part in the formation of a bispyridoxole-borate.

Pyridoxole, boric acid and suitable bifunctional compounds and also pyridoxole and diphenylborinic acid form crystalline borchelates and spiroborates. The corresponding phenolic OH-group and the neighbouring HOH_2C -group of the pyridoxole take part in their formation.

Der 3. Nachtr. DAB 6 enthält als Gehaltsbestimmung für Pyridoxolhydrochlorid wie die Austr. 1960 eine argentometrische Bestimmung des Chlorid-Ions und läßt auf Pyrid-

*) Anzuzug aus der Dissertation *Surborg*, Bonn 1967.

oxolhydrochlorid umrechnen. USP 1965, Brit. 1963, Gall. 1965 und Nord. 1963 lassen eine Titration im wasserfreien Milieu durchführen und erfassen die Base direkt, wie auch das DAB 7-DDR/64, das eine Kjeldahl-Bestimmung enthält.

In den Entwurf für ein DAB 7-BRD sind zur Gehaltsbestimmung von Pyridoxolhydrochlorid als Reinsubstanz (Pyridoxinhydrochlorid DAB 7) und zur Gehaltsbestimmung von Pyridoxol-Tabletten (Pyridoxin-Tabletten DAB 7) zwei spektrophotometrische Methoden aufgenommen worden. Bei der Bestimmung der Reinsubstanz wird die Extinktion einer 1proz. Lösung in 0,1 n HCl bei 290 nm gegen 0,1 n HCl gemessen.

Bei der Bestimmung des Gehaltes von Pyridoxol-Tabletten kommt ein Verfahren zur Anwendung, das auf Hochberg, Melnick und Oser¹⁾ zurückgeht. Nach salzsaurer Extraktion des Wirkstoffes wird in ammoniakalischer, ammoniumchlorid-gepufferter, alkoholischer Lösung mit 2,6-Dichlorchinonchlorimid unter Bildung eines blauen Farbstoffes (Intensitätsmaximum der Blaufärbung 60—80 Sek. nach Reagenz-Zugabe) umgesetzt, dessen Extinktion photometrisch bei 620 nm gemessen wird. Phenole, die mit 2,6-Dichlorchinonchlorimid ebenfalls unter Blaufärbung reagieren, werden dadurch ausgeschaltet, daß man als Vergleichslösung eine Lösung verwendet, die sich von der zu bestimmenden Lösung nur durch einen Zusatz von Borsäure unterscheidet. Bei Anwesenheit von Borsäure gibt Pyridoxol keine Blaufärbung mit dem Reagens. Der Gehalt wird einer zuvor mit Pyridoxol-Reinsubstanz unter gleichen Bedingungen aufgestellten Eichkurve entnommen. Das Verfahren bietet neben dem Vorteil der Farbigkeit des Umsetzungsproduktes, den einer größeren Spezifität für Pyridoxol. Die Umsetzung von Phenolen mit 2,6-Dichlorchinonchlorimid unter Bildung von blaugefärbten Indophenolen ist von Gibbs²⁾ untersucht worden. Die Reaktion wird in höchstens 0,1—0,2proz. Lösung bei pH 8—10 von allen Phenolen gegeben, die in p-Stellung unsubstituiert sind, auch bei Anwesenheit von Borsäure. Pyridoxol jedoch, das man als isosteres Phenol auffassen kann, bildet mit Borsäure einen Komplex, der sich nicht mit dem Reagens umsetzt.

Über die Art der Veresterung von Pyridoxol mit Borsäure und über die Konstitution des Pyridoxol-Borsäure-Komplexes herrscht in der Literatur Unklarheit. In einigen gängigen Handbüchern^{3) 4)} ist etwa folgendes zu lesen: „Die Spezifität der Farbreaktion wird wesentlich erhöht durch Zusatz von Borsäure, die unter Komplexbildung mit den beiden benachbarten HOH₂C-Gruppen die Bildung des blauen Farbstoffes verhindert.“

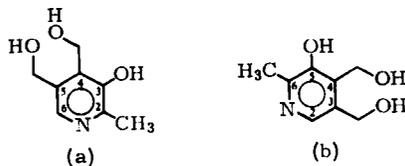
1) M. Hochberg, D. Melnick und B. L. Oser, J. biol. Chemistry 155, 109 (1944); ref. C. II, 6, 927 (1946).

2) H. D. Gibbs, J. biol. Chemistry 72, 649 (1927); ref. C. II, 1, 1058 (1927).

3) F. Götirner, Chem.-phys. Vit.-Best.-Methoden, Enke-Verlag, Stuttgart 1965, S. 149.

4) R. Strohecker und H. M. Henning, Vit.-Best., E. Merck A. G., Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1963, S. 133.

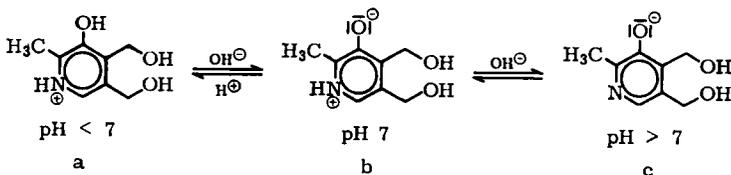
Untersuchungen über die Konstitution des Pyridoxol-Borsäure-Komplexes sind von *Scudi*, *Bastedo* und *Webb*⁵⁾ durchgeführt worden. Die Autoren kommen auf Grund UV-spektrophotometrischer und potentiometrisch-titrimetrischer Befunde zu der Feststellung, daß eine Veresterung der Borsäure über das phenolische Hydroxyl und die benachbarte HOH₂C-Gruppe erfolgt, wobei über Borsäure 2 Pyridoxolmoleküle miteinander verknüpft sein sollen und schreiben in der Zusammenfassung ihrer Arbeit: „Es konnte gezeigt werden, daß Vitamin B₆ mit Borsäure einen Komplex eingeht. Borsäure mit einer Koordinationszahl von 4 wird dabei von 2 Molekülen Vitamin über die Sauerstoff-Atome in 3- und 4-Stellung gebunden.“ Der beschriebene Borkomplex wurde jedoch nicht isoliert. Die verschiedenen Auffassungen über die Art der Veresterung der Borsäure kommen durch unterschiedliche Zählweise zustande. *Scudi*, *Bastedo* und *Webb*⁵⁾ beziffern Pyridoxol folgendermaßen (a):



Legt man die in der deutschsprachigen Literatur übliche Bezifferung (b) zugrunde, ist es verständlich, daß die genannten Autoren beim Lesen der Zusammenfassung der Scudischen Arbeit oder von Referaten zu dem Ergebnis kamen, eine Veresterung der Borsäure erfolge über die benachbarten Hydroxymethyl-Gruppen.

Das Molekül des Pyridoxols enthält neben den beiden Hydroxymethylgruppen ein schwach saures, phenolisches Hydroxyl und einen, wenn auch nur schwach basischen Pyridin-Stickstoff.

Das Verhalten des Pyridoxols in Lösung ist von *Harris* und Mitarb.⁶⁾ eingehend untersucht worden. Pyridoxol liegt in stark saurer Lösung (pH 2,0) als Kation (a), in neutraler Lösung praktisch vollkommen als Zwitterion (b) und in alkalischer Lösung als Anion (c) vor.

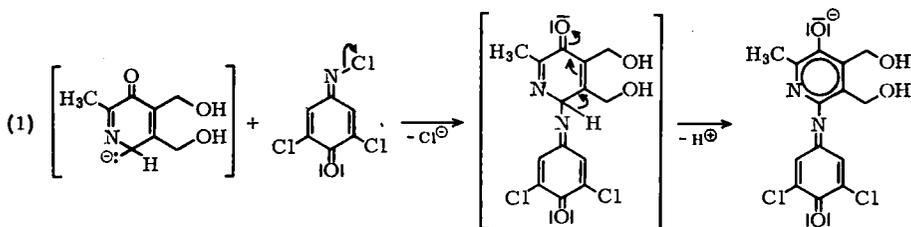


⁵⁾ *J. V. Scudi, W. A. Bastedo und T. J. Webb, J. biol. Chemistry 136, 399 (1940); ref. C. I, 2, 1899 (1942).*

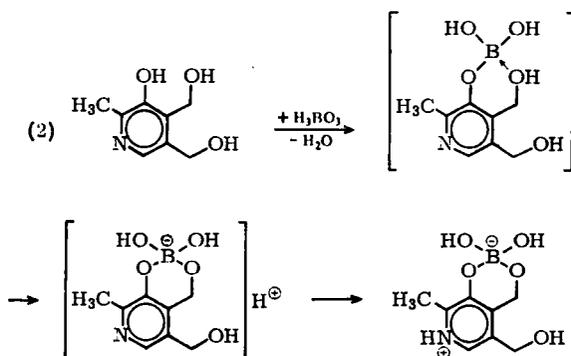
⁶⁾ *St. A. Harris, T. J. Webb und K. Folkers, J. Amer. chem. Soc. 62, 3198 (1940).*

Das beschriebene UV-spektrophotometrische Verfahren arbeitet in ammoniakalischem Milieu; Pyridoxol wird in diesem Milieu als Anion (c) vorliegen. Betrachtet man die Mesomerie des Phenolat-Ions, so ist ersichtlich, daß das vom Sauerstoffatom in den Benzolkern eingeschobene Elektronenpaar in p- und o-Stellung eine hohe Elektronendichte bedingt, die in den mesomeren p- bzw. o-quinoiden Grenzformeln als einsames Elektronenpaar symbolisiert werden kann.

Analoge Verhältnisse herrschen auch in Hydroxypyridinen. Im Pyridoxol-Anion sind jedoch die o-Positionen bereits durch eine Methyl- bzw. eine Hydroxymethylgruppe besetzt, so daß nur in p-Stellung eine elektrophile Substitution durch 2,6-Dichlorchinonchlorimid möglich ist (1):



Bei Veresterung von Pyridoxol mit Borsäure über das phenolische Hydroxyl wird die Tendenz des Phenolat-Sauerstoffs, ein Elektronenpaar in den Ring einzuschieben, dadurch verringert, daß ein Elektronenpaar das Oktett am Bor auffüllt. Aus diesem Grunde findet nach Veresterung von Pyridoxol mit Borsäure auch keine Umsetzung mit 2,6-Dichlorchinonchlorimid mehr statt (2).

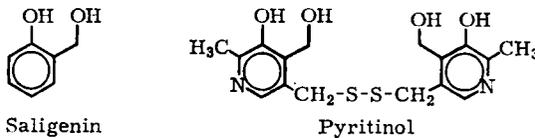


Bei einer Veresterung der Borsäure über die Hydroxymethylgruppen wäre die CH-Aktivität der p-Position des Pyridoxol-Anions aus diesen Überlegungen heraus

nicht beeinträchtigt. Es müßte, wenn keine sterischen Behinderungen auftreten, eine Umsetzung mit 2,6-Dichlorchinonchlorimid unter Blaufärbung stattfinden.

Diese theoretischen Überlegungen konnten auf folgende Weise gesichert werden:

1. *o*-Hydroxybenzylalkohol (Saligenin) und Bis(3-hydroxy-4-hydroxymethyl-2-methylpyridyl-(5)-methyl)-disulfid (Pyritinol)*), die beide jeweils über ein phenolisches und nur ein alkoholisches Hydroxyl verfügen, geben mit 2,6-Dichlorchinonchlorimid unter den gleichen Bedingungen wie Pyridoxol ebenfalls eine Blaufärbung, die bei vorheriger Veresterung mit Borsäure ausbleibt.

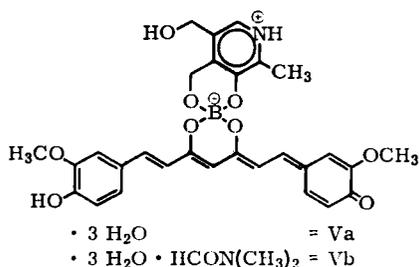
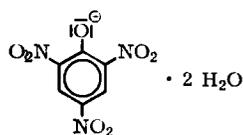
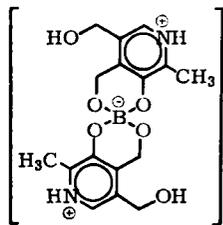
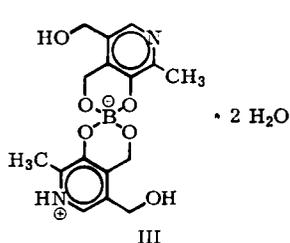
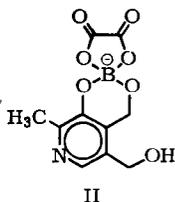
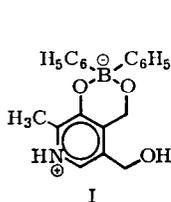


2. Borkomplexe aus Kohlenwasserstoff-Derivaten mit zwei funktionellen Gruppen (Hydroxyl- oder Aminogruppen) bilden sich dann leicht, wenn die funktionellen Gruppen in 1,2- oder 1,3-Stellung angeordnet sind, d. h. wenn sich ein fünf- bzw. sechsgliedriges Borchelat formulieren läßt. Ein borhaltiger, gesättigter Siebenring, wie er bei Veresterung über die benachbarten HOH₂C-Gruppen entstehen würde, ist genauso unwahrscheinlich wie die spontane Bildung von Laktonen oder Laktamen mit sieben Ringgliedern. Da es gelang, verschiedene borhaltige Heterocyclen aus Pyridoxol herzustellen und zu isolieren, wie weiter unten gezeigt wird, besteht auch kein Zweifel daran, daß sie die stabile Partialstruktur (a) besitzen und die Partialstruktur (b) ausscheidet:



3. Die dargestellten, isolierten Borkomplexe geben keine FeCl₃-Reaktion, d. h. die phenolische OH-Gruppe ist verestert. Dargestellte Pyridoxol-Borsäure-Komplexe:

* Pyritinol ist die dem Pyriothioxin® zugrunde liegende Base, die als Dihydrochlorid-monohydrat im Handel ist und als Neurodynamicum therapeutisch angewandt wird.

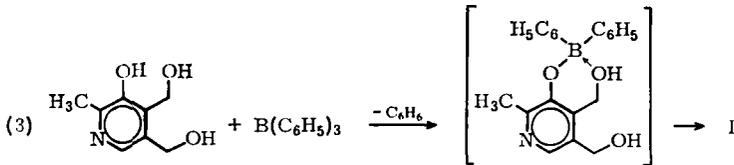


Die gebräuchlichsten Reagenzien zur Herstellung stabiler, isolierbarer Komplexe mit borhaltigen Sechsringen sind die von *Neu*⁷⁾ eingeführte Diphenylborinsäure, die über Natriumtetraphenylborat bzw. Triphenylbor zugänglich ist, und die Boroxalsäure, die erstmals von *Tauböck*⁸⁾ zum Nachweis von Flavonolen herangezogen wurde.

Setzt man Pyridoxol mit Triphenylbor in Äthanol um, so fällt nach kurzem Erwärmen im Wasserbad und Zugabe von Wasser ein weißes, kristallines Reaktionsprodukt an. Die Umsetzung verläuft unter Abspaltung von 1 Mol Benzol nach Gleichung (3):

⁷⁾ *R. Neu*, *Z. analyt. Chem.* **142**, 335 (1954); *Z. analyt. Chem.* **151**, 328 (1956).

⁸⁾ *K. Tauböck*, *Naturwissenschaften* **38**, 439 (1942).



Das IR-Spektrum von I (Abb. 1) zeigt neben einer OH-Bande bei 3500 cm^{-1} , die der freien Hydroxymethylgruppe zugeordnet werden muß und einer intensiven Bande bei 1525 cm^{-1} , die der $\text{C}=\text{N}$ -Schwingung des Pyridins zukommt, drei weniger intensive Banden bei 1310 , 1220 und 1090 cm^{-1} , die der 2-Methylphenol-Struktur des Pyridoxols zugeordnet werden müssen; jedoch treten diese Banden gegenüber dem Spektrum des Pyridoxolhydrochlorids (Abb. 2) in Folge der Veresterung der phenolischen OH-Gruppe in deutlich abgeschwächter Form auf. Diese Erscheinung kann auch beim Vergleich der Spektren des Pyritoxins und des Pyritinol-bisdiphenylborates beobachtet werden und, da in diesem Fall eine Veresterung der Borsäure über das phenolische Hydroxyl und die noch freie Hydroxymethylgruppe erfolgen muß, als ein weiterer Beweis dafür gelten, daß das phenolische Hydroxyl an der Komplexbildung beteiligt ist.

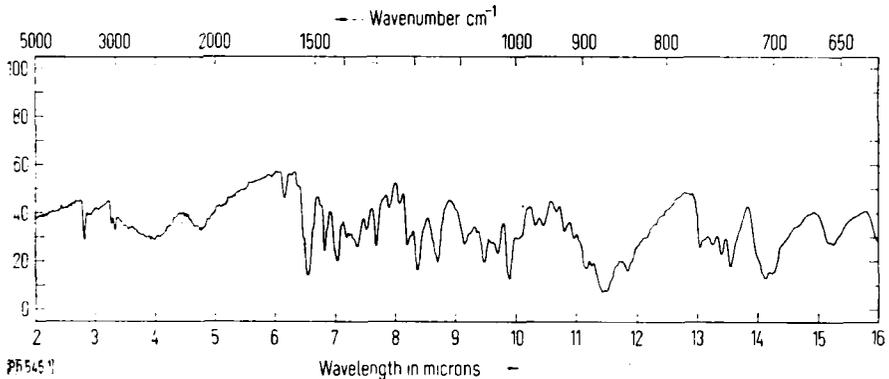


Abb. 1. IR-Spektrum von I, gemessen als KBr-Preßling

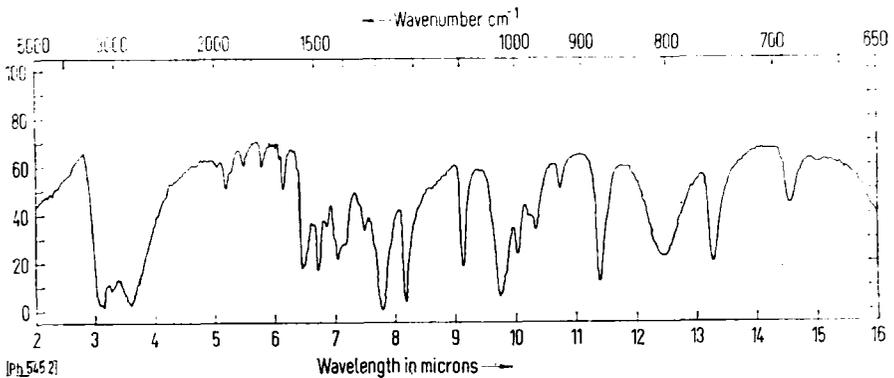


Abb. 2. IR-Spektrum des Pyridoxolhydrochlorids, gemessen als KBr-Preßling

Pyridoxol besitzt zwar keine Flavonol-Struktur, jedoch wie dieses in Nachbarschaft zum phenolischen Hydroxyl eine elektronenliefernde Gruppe, so daß wie bei den Flavonolen die Bildung und Isolierung eines entsprechenden Boroxalats (II) mit koordinativ vierwertigem Bor möglich sein sollte.

II fällt nach Umsetzen der Reaktanten in Äthanol unter Erhitzen und Einengen der Lösung als mikrokristallines, weißes Reaktionsprodukt an. Das IR-Spektrum von II (Abb. 3) zeigt neben den bereits angeführten Banden eine intensive Carbonylbande bei 1650 cm^{-1} . Nach alkalischer Hydrolyse der Substanz mit 3 n NaOH sind nach Ansäuern mit Essigsäure eindeutig Oxalat-Ionen als Calciumoxalat nachweisbar. Versucht man II aus wäßrigem Äthanol umzukristallisieren, so lagert es sich in ein Produkt um, das nach Auswertung des IR-Spektrums und der quantitativen Analyse als Bispyridoxol-borat (III) bezeichnet werden muß. Das IR-Spektrum von III (Abb. 4) zeigt keine Carbonylbande bei 1650 cm^{-1} mehr; der Nachweis von

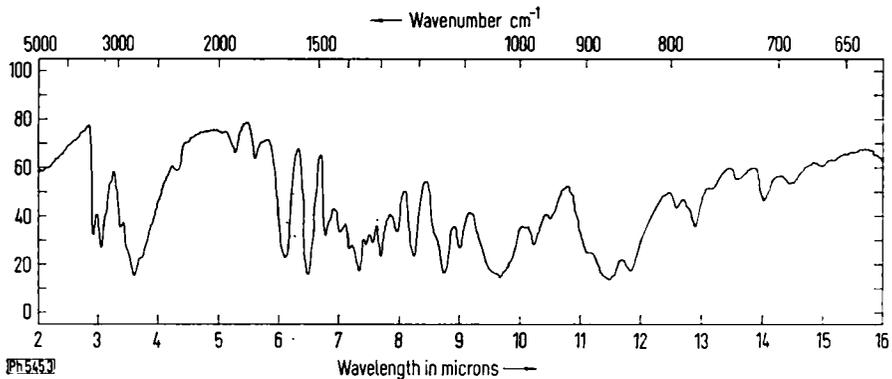


Abb. 3. IR-Spektrum von II, gemessen als KBr-Preßling

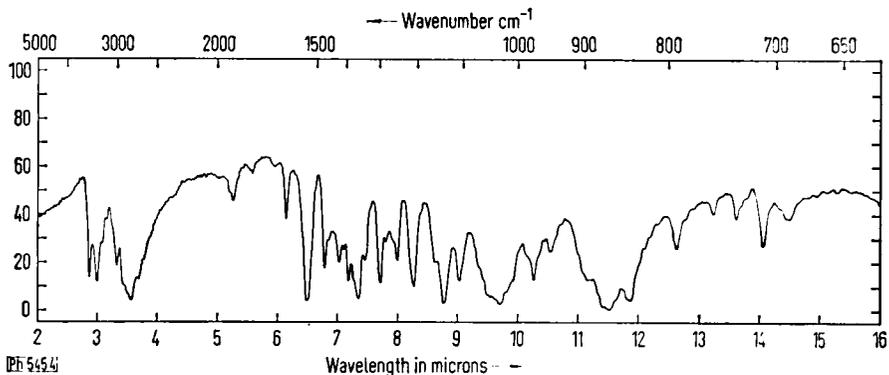


Abb. 4. IR-Spektrum von III, gemessen als KBr-Preßling

Oxalat-Ionen ist negativ. Die Verbindung muß auf Grund IR-spektrophotometrischer Befunde im Bereich um 3500 cm^{-1} und der quantitativen Analyse mit 2 Mol Wasser formuliert werden, eine Erscheinung, die bei verschiedenen vergleichbaren Borkomplexen beobachtet wird.

Sollte die Annahme einer Umwandlung von II in die stabilere Form III richtig sein, dann müßte sich das von *Scudi*⁵⁾ in Lösung bereits nachgewiesene aber nicht isolierte Bispyridoxolborat nach Umsetzung von Pyridoxol mit Borsäure ebenfalls isolieren lassen, was auch der Fall ist. Setzt man beide Partner in Äthanol durch Kochen unter Rückfluß miteinander um, so fällt beim Erkalten ein mikrokristallines Reaktionsprodukt (IIIa) an, das im IR-Spektrum und allen weiteren physikalischen Eigenschaften mit III identisch ist. Die Substanz ist bereits in einem US-Patent⁹⁾ erwähnt, aber nicht näher beschrieben worden. In jüngster Zeit sind von einigen Autoren^{10) 11)} ähnliche Spiroborate in der Cortison-Reihe und vom Colchicin dargestellt und isoliert worden.

In den 3. Nachtr. DAB 6 und in den Entwurf für ein DAB 7 ist zur Identifizierung von Pyridoxolhydrochlorid eine Umsetzung mit Pikrinsäure angeführt. Als Pikrat sollte sich ebenfalls das oben angeführte Bispyridoxolborat (III) fassen lassen, indem die Salzbildung mit Pikrinsäure an dem nicht protonisierten Stickstoff eines Pyridoxol-Moleküls unter Bildung eines Bispyridoxolborat-pikrates (IV) stattfindet: IV fällt beim Erhitzen der Reaktanten in Äthanol nach kurzer Zeit als kanariengelbes Reaktionsprodukt an.

Von *Roth* und *Miller*¹²⁾ sind neben der Diphenylborinsäure weitere aromatische Borsäurederivate mit Curcumin zu isolierten, farbigen Komplexen umgesetzt worden. Es sollte deshalb möglich sein, Pyridoxol über Borsäure mit Curcumin zu verknüpfen. Die Reaktion wurde in Eisessig durchgeführt, da diese Methode nach Angabe obiger Autoren nahezu analysenreine Produkte liefert. Nach einigen vergeblichen Versuchen konnte ein dunkelroter Pyridoxol-Borsäure-Curcumin-Komplex isoliert werden (Va).

Das UV-Spektrum von Va (Abb. 5), gemessen in einem alkalischen Veronalpuffer, zeigt eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums um 120 nm gegenüber Curcumin.

Das IR-Spektrum von Va ist wenig charakteristisch und gibt keine Auskunft über Strukturfeinheiten. Der Komplex muß auf Grund der quantitativen Analyse mit 3 Mol Essigsäure oder 3 Mol Wasser formuliert werden. Bei Anwesenheit von Essigsäure im Kristall sollte jedoch im IR-Spektrum eine Carbonylbande auftreten, was nicht der Fall ist, denn nach Umkristallisation aus Dimethylformamid tritt im Spektrum des isolierten Produktes bei 1650 cm^{-1} eine deutliche Bande auf. Die

⁹⁾ U. S. 2442677; *M. L. Brown*, *C. A.* **42**, 5174 (1958).

¹⁰⁾ *L. J. Leeson*, *J. A. Lowery*, *G. M. Sieger* und *S. Muller*, *J. pharmac. Sci.* **50**, 193 (1961).

¹¹⁾ *A. T. Balaban*, *G. Mihai*, *R. Antonescu* und *P. T. Frangopol*, *Tetrahedron (London)* **16**, 68 (1961).

¹²⁾ *H. J. Roth* und *B. Miller*, *Arch. Pharmaz.* **297**, 617 (1964); *Arch. Pharmaz.* **297**, 660 (1964).

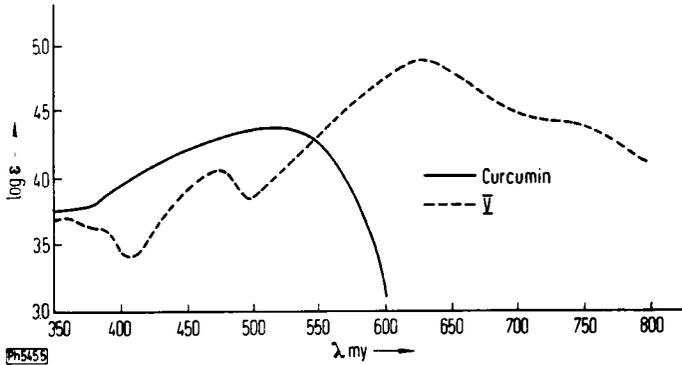
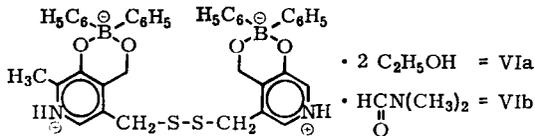


Abb. 5. UV-Spektrum von V, gemessen als 10^{-5} m Lösung in alkalischem Veronalpuffer

Verbindung kristallisiert in diesem Fall mit 3 Mol Wasser und 1 Mol Dimethylformamid (Vb).

Wie bereits erwähnt, geben Pyritinol und Saligenin unter den gleichen Bedingungen wie Pyridoxol mit 2,6-Dichlorchinonchlorimid eine Blaufärbung, die bei vorheriger Veresterung mit Borsäure ausbleibt. Es lag deshalb nahe, zu überprüfen, ob sich die genannten Verbindungen mit Triphenylbor ebenfalls zu isolierbaren Diphenylborinsäure-Derivaten umsetzen lassen. Vom Saligenin ließ sich trotz zahlreicher Versuche kein Diphenylborat-Komplex isolieren, was dadurch erklärt werden kann, daß in der Molekel kein Stickstoff zur Verfügung steht, der das freiwerdende Proton unter innerer Salzbildung, die zu stabilen, kristallinen Produkten führt, bindet.

Pyritinol jedoch ließ sich analog Pyridoxol mit Triphenylbor zu einem Pyritinol-bisdiphenylborat umsetzen, das aus Äthanol mit 2 Mol des Lösungsmittels kristallisiert (VIa). Löst man aus einem Gemisch von Äthanol und Dimethylformamid (5 : 1) um, so kristallisiert der Komplex mit 1 Mol Dimethylformamid (VIb).



Das Gelingen der Darstellung von I—VI beweist, daß an der Komplexbildung mit Borsäure und ihren Derivaten jeweils eine Hydroxymethyl- und die phenolische Hydroxylgruppe beteiligt sind, insbesondere deshalb, weil Verbindungen mit nur einer zur phenolischen Hydroxylgruppe benachbarten Hydroxymethylgruppe analoge Komplexe liefern und die Farbreaktion mit 2,6-Dichlorchinonchlorimid auch bei solchen Verbindungen in Anwesenheit von Borsäure unterbleibt.

Nachdem gezeigt werden konnte, daß Pyritinol analog Pyridoxol mit Borsäure einen Komplex bildet, sollte schließlich noch untersucht werden, ob eine UV-

spektrophotometrische Gehaltsbestimmung von Pyrithioxin nach Umsetzung mit 2,6-Dichlorchinonchlorimid analog dem für Pyridoxolhydrochlorid (Pyridoxin-Tabl. DAB 7) im Entwurf für ein DAB 7 angegebenen Verfahren möglich ist. De facto ist für die Pyritinol-Dichlorchinonchlorimid-Umsetzung innerhalb des für Pyridoxol angegebenen Konzentrationsbereiches das Lambert-Beersche Gesetz erfüllt und eine Gehaltsbestimmung möglich. Das Extinktionsmaximum wird im Gegensatz zur Pyridoxol-Bestimmung 180—210 Sek. nach Reagenz-Zugabe erreicht und bei 588 nm gemessen.

Dem Fonds der Chemischen Industrie sind wir für Sachbeihilfen zu Dank verpflichtet.

Beschreibung der Versuche

Allgemeine Bemerkungen

Schmp. wurden mit dem Kofler-Schmp.-Mikroskop ermittelt und sind unkorrigiert angegeben. UV-Spektren wurden mit dem Beckman-Spektralphotometer DU oder mit dem Spectronic-505-Gerät der Firma Bausch u. Lomb aufgenommen. IR-Spektren wurden mit dem Beckman-IR-5 oder im Spektrophotometer 221 (Bodenseewerk Perkin-Elmer u. Co. GmbH) in KBr aufgenommen.

Triphenylbor (TPB)

Triphenylbor wurde durch saure Hydrolyse von Natriumtetraphenylborat (Kalignost) gewonnen, neutral gewaschen, scharf abgenutscht und in diesem Zustand eingesetzt. Vorschrift: Dissertation *S. Al Sarraj*, Braunschweig 1965.

Pyridoxol

0,205 g Pyridoxolhydrochlorid (0,001 Mol) und 0,04 g Natriumhydroxid (0,001 Mol) werden heiß in 30 ml absol. Äthanol gelöst. Das abgeschiedene Natriumchlorid wird abfiltriert und das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert. Weißes, amorphes, teilweise schuppiges Pulver, gut löslich in Wasser, löslich in Äthanol und Aceton, praktisch unlöslich in Äther und Chloroform. Schmp. 156—157° (Lit.-Schmp. 160°).

Pyridoxol-diphenylborat (I)

0,169 g Pyridoxol (0,001 Mol) werden unter Erwärmen im Wasserbad in 15 ml Äthanol gelöst. Die Lösung wird mit 0,3 g Triphenylbor (0,0012 Mol) in 5 ml Äthanol versetzt und 10 Min. auf dem siedenden Wasserbad unter Umschwenken erwärmt. Nach dem Erkalten wird filtriert und mit 40 ml Wasser versetzt. Das beim Abkühlen auskristallisierende Rohprodukt wird aus 45proz. Äthanol umkristallisiert. Ausbeute: 0,28 g (84%). Weiße, mikrokristalline Nadeln, löslich in Äthanol und Aceton, praktisch unlöslich in Wasser, Äther und Chloroform. Schmp. 200—202°.

$C_{20}H_{20}BNO_3$ (333,2)	Ber.: C 72,08	H 6,05	N 4,20
	Gef.: C 71,84	H 6,18	N 3,89

Pyridoxol-boroxalat (II)

0,169 g Pyridoxol (0,001 Mol) und 0,062 g Borsäure (0,001 Mol) werden unter Erwärmen in 15 ml Äthanol gelöst und 20 Min. unter Rückfluß erhitzt. Nach Zugabe von 0,125 g Oxalsäure-Dihydrat (etwa 0,001 Mol) wird weitere 20 Min. unter gleichen Bedingungen erwärmt. Der Ansatz wird i. Vak. auf die Hälfte seines Vol. eingeeengt, das nach dem Erkalten angefallene Reaktionsprodukt abgenutscht und intensiv mit Äthanol gewaschen. Ausbeute: 0,21 g (78%). Weißes, körnig-kristallines bis amorphes Pulver, löslich in Wasser und

wäßrigen Mischungen organischer Lösungsmittel, schwer löslich in Äthanol und Aceton, praktisch unlöslich in Äther und Chloroform. Zers. ab 220° unter allmählicher Verkohlung.

$C_{10}H_{10}BNO_7$ (267,0)	Ber.: C 44,98	H 3,78	N 5,25
	Gef.: C 44,62	H 4,18	N 5,55

Bispyridoxol-borat (III)

II wird aus 90proz. Äthanol umkristallisiert. Kleine durchsichtige bis weiße Kristalle, löslich in Wasser und wäßrigem Äthanol, schwer löslich in Äthanol, praktisch unlöslich in Äther und Chloroform. Zers.-P. ab 240° unter allmählicher Verkohlung.

$C_{18}H_{18}BN_2O_6 \cdot 2 H_2O$ (382,2)	Ber.: C 50,28	H 6,06	N 7,33
	Gef.: C 50,44	H 5,87	N 7,38

Bispyridoxol-borat (IIIa)

0,507 g Pyridoxol (0,003 Mol) und 0,186 g Borsäure (0,003 Mol) werden unter Erwärmen in 20 ml Äthanol gelöst und 15 Min. unter Rückfluß erhitzt. Nach erneuter Zugabe von 0,507 g Pyridoxol in 15 ml Äthanol wird weitere 15 Min. erhitzt. Während des Erkaltsens scheidet sich ein weißes Reaktionsprodukt ab, das aus 90proz. Äthanol umkristallisiert wird. Ausbeute: 0,55 g (53%). Die Substanz ist mit III identisch.

$C_{18}H_{18}BN_2O_6 \cdot 2 H_2O$ (382,2)	Ber.: C 50,28	H 6,06	N 7,33
	Gef.: C 50,26	H 5,82	N 7,17

Nachweis von Oxalat-Ionen nach alkalischer Hydrolyse von II und III

Je 50 mg von II und III werden mit je 2 ml 3 n NaOH und 3 ml Wasser versetzt und 5 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Erkalten und Ansäuern mit 6 n CH_3COOH werden beide Lösungen mit je 1 ml Calciumchlorid-Lösung (0,367 g $CaCl_2 \cdot 2 H_2O/100$ ml) versetzt. Die Lösung von II zeigt bereits nach 30 Min. eine deutliche Trübung und später einen Niederschlag von Calciumoxalat, während die von III auch nach 1 Std. noch vollkommen klar ist.

Bispyridoxol-borat-pikrat (IV)

0,085 g Pyridoxol (0,0005 Mol) und 0,031 g Borsäure (0,0005 Mol) werden unter Erwärmen in 20 ml Äthanol gelöst und 15 Min. unter Rückfluß erhitzt. Nach Zugabe von weiteren 0,085 g Base wird nach nochmaligem Kochen mit einer äthanol. Lösung von 0,460 g Pikrinsäure (etwa 0,001 Mol Pikrinsäure wasserfrei) versetzt und abermals 15 Min. erhitzt. Dabei fällt bereits ein kanariengelbes Reaktionsprodukt an, das während des Erkaltsens weiter auskristallisiert. Ausbeute: 0,34 g (59%). Kanariengelbe, körnige Mikrokristalle, löslich in Wasser, schwer löslich in Äthanol und Aceton, praktisch unlöslich in Äther und Chloroform. Schmp. 200—202° (Zers.) (aus Äthanol).

$C_{22}H_{22}BN_5O_{13} \cdot 2 H_2O$ (611,3)	Ber.: C 43,23	H 4,29	N 11,45
	Gef.: C 43,54	H 4,17	N 10,83

Pyridoxol-Borsäure-Curcumin-Komplex (Va)

0,169 g Pyridoxol (0,001 Mol) und 0,0262 g Borsäure (0,001 Mol) werden heiß in 10 ml Eisessig gelöst und durch 15 Min. Erhitzen unter Rückfluß verestert. In die heiße Lösung werden 0,368 g Curcumin (0,001 Mol) eingetragen und weitere 15 Min. erwärmt. Die Ansatzlösung wird i. Vak. auf etwa 5 ml eingengt. Nach zweitägigem Stehen hat sich ein dunkelrot-violettes Reaktionsprodukt abgeschieden, das aus Eisessig umkristallisiert und i. Vak. über Kaliumhydroxid getrocknet wird. Ausbeute: 0,21 g (38%).

Dunkelrot-violettes, mikrokristallines Pulver, gut löslich in DMF, löslich in Äthanol und Aceton, schwer löslich in Wasser und Eisessig, praktisch unlöslich in Äther und Chloroform. Schmp. ab 225° (Zers.).

$C_{29}H_{28}BNO_9 \cdot 3 H_2O$ (599,4)	Ber.: C 58,11	H 5,72	N 2,33
	Gef.: C 57,73	H 5,53	N 2,26

Löst man Va in wenig Dimethylformamid und versetzt die Lösung bis zur auftretenden Trübung mit Äther, so scheidet sich nach kurzem Stehen im Eisschrank ein grün-schwarz schimmerndes, harziges Produkt ab, das nach Abgießen des Lösungsmittels i. Vak. getrocknet wird (Vb). Schwarzgrün schimmerndes, glänzendes, mikrokristallines Pulver. Löslich wie Va in Alkohol, Aceton und DMF mit roter Farbe. Schmp. ab 240° (Zers.).

$C_{29}H_{29}BNO_6 \cdot 3 H_2O \cdot C_3H_7NO$ (672,5) Ber.: C 57,15 H 6,15 N 4,16
Gef.: C 57,38 H 6,30 N 3,95

Alkalischer Veronal-Puffer

Gesättigte Lösung von diäthylbarbitursäurem Natrium in einer Mischung von 20 Vol. T. 25proz. Ammoniak und 80 Vol. T. Isopropanol.

Pyritinol

0,230 g Pyrithioxin® (0,0005 Mol) und 0,040 g NaOH (0,001 Mol) werden in 30 ml siedendem Äthanol gelöst. Die freigesetzte Base ist sowohl in Äthanol als auch in Wasser schwer löslich und fällt beim Erkalten nahezu quantitativ an. Abgeschiedenes Kochsalz und nicht verbrauchtes Natriumhydroxid werden mit Wasser ausgewaschen. Weißes, kristallines Pulver, in allen gebräuchlichen organischen Lösungsmitteln schwer bis praktisch unlöslich. Schmp. 230—232° (Zers.).

Pyritinol-bisdiphenylborat (VIa)

0,184 g Pyritinol (0,0005 Mol) werden in 50 ml siedend heißem Äthanol suspendiert und mit 0,25 g Triphenylbor (etwa 0,001 Mol) versetzt. Beim Vereinigen der beiden Reaktanten in heißem Äthanol geht die Base unter Komplexbildung mit TPB in Lösung. Der gebildete Komplex ist in Äthanol ebenfalls schwer löslich und fällt nach der Umsetzung spontan an. Ausbeute: 0,28 g (80%). Weißes, mikrokristallines Pulver, löslich in DMF, sonst in allen gängigen Lösungsmitteln schwer bis praktisch unlöslich. Schmp. 158—159° (aus Äthanol).

$C_{40}H_{38}B_2N_2O_4S_2 \cdot 2 C_2H_5OH$ (788,7) Ber.: C 67,01 H 6,39 N 3,55
Gef.: C 67,04 H 6,09 N 3,76

Löst man VIa aus Äthanol/DMF (5 : 1) um, so kristallisiert der Komplex mit einem Mol DMF (VIb). Weißes, kristallines Pulver, löslich wie VIa. Schmp. 203—205°.

$C_{40}H_{38}B_2N_2O_4S_2 \cdot C_3H_7NO$ (769,6) Ber.: N 5,46 Gef.: N 5,45

Umsetzung von Pyridoxol, Pyritinol und Saligenin mit 2,6-Dichlorchinonchlorimid

Vorschrift: Entwurf für ein DAB 7 (Monographie: „Pyridoxin-Tabletten“).

Ammonium-Pufferlösung: 16,0 g Ammoniumchlorid und 15,0 ml Ammoniak 25proz. werden in Wasser zu 100 ml gelöst.

Borsäurelösung: 5,0 g Borsäure/100 ml Wasser.

Dichlorchinonchlorimid-Reagens: 10 mg 2,6-Dichlorchinonchlorimid/25 ml Isopropanol.

Je 50 mg Pyridoxol-HCl, Pyrithioxin und Saligenin werden in je einem 250-ml-Meßkolben mit 100 ml Wasser und 12,5 ml n HCl übergossen und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. 5,00 ml der Mischung werden zu 100,00 ml verdünnt. 5,00 ml dieser Verdünnung werden mit 25,00 ml Isopropanol versetzt. 6,00 ml dieser Isopropanol-Lösung werden mit 2,00 ml Ammonium-Pufferlösung und 1,00 ml Wasser versetzt (Lösung I). Anschließend werden 6,00 ml Isopropanol-Lösung mit 2,00 ml Ammonium-Pufferlösung und 1,00 ml Borsäurelösung versetzt (Lösung II). Versetzt man die Lösungen I der 3 Substanzen mit je 1,00 ml 2,6-Dichlorchinonchlorimid-Lösung, so treten bei Pyridoxol und Pyrithioxin Blaufärbungen auf, deren Intensitätsmaxima bei Pyridoxol nach 60—80 Sek., bei Pyriti-

oxin nach 180—210 Sek. erreicht werden. Saligenin liefert keine reine Blaufärbung. Nach etwa 6 Min. hat sich Lösung I blau-grün gefärbt.

Versetzt man jedoch die Lösungen II der 3 Substanzen mit 2,6-Dichlorchinonchlorimid-Reagens, so ist keine Verfärbung zu beobachten.

Gehaltsbestimmung von Pyrithioxin*)

Eine 50 mg Pyrithioxin entsprechende Menge Prüfsubstanz, genau gewogen, wird in einem 250-ml-Meßkolben mit 100 ml Wasser und 12,5 ml n HCl übergossen. Das Gemisch wird öfter umgeschwenkt und nach 10 Min. mit Wasser aufgefüllt. Die ersten 50 ml des Filtrates werden verworfen. 5,00 ml des Filtrates werden zu 100,00 ml verdünnt; 5,00 ml dieser Verdünnung werden mit 25,00 ml Isopropanol versetzt. 6,00 ml dieser Isopropanol-Lösung werden mit 2,00 ml $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ -Pufferlösung und 1,00 ml Wasser versetzt (Lösung I). Anschließend werden 6,00 ml Isopropanol-Lösung mit 2,00 ml $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ -Pufferlösung und 1,00 ml Borsäurelösung versetzt (Lösung II). Lösung I und II werden mit je 1,00 ml 2,6-Dichlorchinonchlorimidlösung versetzt und sofort vermischt. Eine Bildung von Luftbläschen ist möglichst zu vermeiden. 180—210 Sek. nach Zugabe der Dichlorchinonchlorimidlösung wird die Extinktion der Lösung I gegen Lösung II in einer Schichtdicke von 1 cm bei 588 nm gemessen. Die Messung wird fortlaufend wiederholt, bis der höchste Extinktionswert erreicht ist. Gefundene maximale Extinktion: $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 2370$.

Der Gehalt wird einer mit Pyrithioxin-Reinsubstanz aufgestellten Eichkurve entnommen.

Aufstellung der Eichkurve

0,100 g Pyrithioxin, genau gewogen, werden in einem 250-ml-Meßkolben in 100 ml Wasser gelöst; die Lösung wird unter Zusatz von 12,5 ml n HCl mit Wasser aufgefüllt. 5,00 ml dieser Lösung werden zu 100,00 ml verdünnt; 10,00 ml dieser Verdünnung werden mit 50,00 ml Isopropanol versetzt. Jeweils 1,50 ml, 3,00 ml, 4,50 ml, 6,00 ml dieser Isopropanol-Lösung werden mit einer Mischung von 5 T. Isopropanol und 1 T. Wasser zu 6,00 ml verdünnt; jede dieser Verdünnungen (a-d) wird mit 2,00 ml Ammonium-Pufferlösung und 1,00 ml Wasser versetzt (Verdünnungsreihe I). Anschließend werden die oben genannten Mengen Isopropanol-Lösung in gleicher Weise zu 6,00 ml verdünnt. Jede Verdünnung wird mit 2,00 ml $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ -Pufferlösung und 1,00 ml Borsäurelösung versetzt (Verdünnungsreihe II).

Sämtliche Lösungen beider Verdünnungsreihen werden mit je 1,00 ml Dichlorchinonchlorimid-Lösung versetzt und die Extinktion jeder Lösung der Verdünnungsreihe I gegen die entsprechende Lösung der Verdünnungsreihe II gemessen.

Bei der Aufstellung der Eichkurve ist der nach der Gehaltsbestimmung für Pyrithioxin ermittelte Wert zu berücksichtigen. Pyrithioxin wurde vor der Bestimmung nicht getrocknet. Gefundene maximale Extinktionen, 180—210 Sek. nach Reagenz-Zugabe in einer Schichtdicke von 1 cm bei 598 nm gemessen:

Verdünnung a:	Konz.: 0,05 mg/100 ml	E_{max} : 0,135
„ b:	0,10 mg/100 ml	0,233
„ c:	0,15 mg/100 ml	0,315
„ d:	0,20 mg/100 ml	0,405

*) Die Vorschrift ist eine sinngemäße Abänderung der Gehaltsbestimmung für Pyridoxin-Tabletten nach dem Entwurf für ein DAB 7.