

C. Hydrazone

Theophyllin-7-essigsäurehydrazid (XXIII)

5 g IV wurden in einem Gemisch von 10 g Hydrazinhydrat (90%ig) und 60 cm³ Äthanol 2 Std. unter Rückfluß erhitzt. Es entstand ein intensiver kristalliner Niederschlag.

Ausbeute: 4,5 g. Schmp.: ab 330° C Zersetzung.

Aus Wasser kristallisiert es mit Kristallwasser, schwer löslich in Alkohol und den üblichen organischen Lösungsmitteln, am besten löslich in Wasser oder 80%igem Alkohol.

$C_9H_{12}O_3N_6$ (252) Ber.: N 33,3% Gef.: 33,18%

Die Hydrazone wurden erhalten durch Kochen von XXIII mit Aldehyden und Ketonen in 80%igem Alkohol. Aus den Lösungen kristallisierten die Hydrazone in schönen charakteristischen Kristallen, überwiegend farblosen Nadeln.

Nr.	Name der Aldehyde bzw. Ketone	Bruttoformel	Smp.	Ber. N %	Gef. N. %
XXIV	Benzaldehyd	$C_{16}H_{16}O_3N_6$	272—274° C	24,70	24,56
XXV	Anisaldehyd	$C_{17}H_{16}O_4N_6$	248—250° C	22,70	22,68
XXVI	Zimtaldehyd	$C_{18}H_{16}O_3N_6$	238—240° C	22,95	22,85
XXVII	Vanillin	$C_{17}H_{16}O_5N_6$	247—250° C	21,76	21,53
XXVIII	Crotonaldehyd	$C_{13}H_{16}O_5N_6$	255—257° C	25,00	25,21
XXIX	Furfurol	$C_{14}H_{14}O_4N_6$	260° C unter Schwarzfärbung	25,45	25,29
XXX	Antipyrinaldehyd	$C_{21}H_{22}O_4H_8$	267—269° C	24,88	24,71
XXXI	Azeton	$C_{12}H_{15}O_3N_6$	269—271° C	28,86	28,90
XXXII	Azetophenon	$C_{17}H_{17}O_3N_6$	ab 265° C Zers.	23,79	23,58
XXXIII	Synthet. Kampher	$C_{19}H_{25}O_3N_6$	270—272° C	21,76	21,64
XXXIV	4-Acetylantipyrin	$C_{22}H_{26}O_4N_6$	278—280° C	24,19	24,03

1378. M. Rohrlieh

Einfluß der Nikotinsäure und ihrer Derivate auf die Milchsäurebildung des *Lactobac. arabinosus*

Aus der Versuchsanstalt für Getreideverwertung, Berlin

(Eingegangen am 20. August 1954)

Die Konstitutionsspezifität der Nikotinsäure als Wachstoffsstoff für Mikroorganismen ist bereits eingehend untersucht worden. Möller und Birkofer¹⁾ haben die Wirkung einer Reihe von Nikotinsäurederivaten auf das Wachstum von *Proteus vulgaris* und *Streptobact. plantarum* beobachtet und gefunden, daß freie Nikotinsäure und das Nikotinsäureamid in gleicher Konzentration gleich wirksam sind, womit sie die Angaben von Fildes und Lwoff²⁾ und Querido³⁾ bestätigen. Substituierte Nikotinsäure wie 6-Methylnikotinsäureamid oder 2,6-Dimethylnikotinsäureamid u. a. zeigt nur schwache oder hemmende Wirkung. Picolinsäure besitzt nach Möller und Birkofer keinen Wachstoffsstoffcharakter, dagegen vermag die Pyridin- β -sulfo-

¹⁾ E. F. Möller und L. Birkofer, Ber. dtsch. chem. Ges. 75, 1108 (1942).

²⁾ P. Fildes und A. Lwoff, Brit. J. exp. Pathol. 19, 239 (1938).

³⁾ A. Querido, C. R. Séances Soc. Biol. Filial. Associées 130, 1569 (1938).

säure und das Pyridinsulfosäureamid die Nikotinsäure in geringer Konzentration und je nach den p_H -Bedingungen zu ersetzen. Wie die genannten Autoren haben auch *Coté* und *Oleson*⁴⁾ den Wirkstoffcharakter einiger Nikotinsäurederivate für *Lactobac. arabinosus* untersucht. (Nach *Bergeys Manual*⁵⁾ synonym mit *Streptobact. plantarum*.) Der *Lactobac. arabinosus* wird bekanntlich nach der Vorschrift von *Snell* und *Wright*⁶⁾ als Testorgan bei der mikrobiologischen Bestimmung von Nikotinsäure verwendet, indem die erzeugte Milchsäure, die innerhalb bestimmter Grenzkonzentrationen in nahezu linearer Abhängigkeit von der Nikotinsäuremenge steht, ermittelt wird. Auch nach *Snell* und *Wright* sind Nikotinsäure und Nikotinsäureamid gleich wirksam, d. h. sie bedingen die gleiche Milchsäurebildung, während Nikotinsäure und Cozymase mit 74%iger und 17%iger Wirksamkeit eine Abhängigkeit von der Molekulargröße aufweisen. Trigonellin, die N-methylierte Nikotinsäure, ist völlig unwirksam.

Coté und *Oleson* haben vornehmlich die Wirkung N-substituierter Nikotinsäureamidabkömmlinge und die des Thionikotinsäureamids untersucht. Von den N-substituierten Nikotinsäurederivaten haben 13 Verbindungen Werte, die zwischen 40 und 2% der Nikotinsäurewirkung liegen, gezeigt; 11 Verbindungen waren inaktiv. Sehr schwankende Werte sind bei Thionikotinsäureamid festgestellt worden, Schwankungen, die durch hydrolytische Vorgänge beim Erhitzen des Ausgangsmaterials erklärt werden.

Im folgenden wird über Untersuchungen des Einflusses von Pyridin*)- und Nikotinsäurederivaten auf die Milchsäurebildung des *Lactobac. arabinosus* berichtet, die die Konstitutionsspezifität der Nikotinsäure und des Amids gegenüber dem *Lactobac. arabinosus* erhärten. Die Darstellungsmethoden der untersuchten Nikotinsäurederivate, die zum Teil in der Literatur noch nicht beschrieben sind (Nikotinoylanilin, Nikotinursäurehydrazid, Nikotinsäuredextrosehydrazid) werden weiter unten angegeben.

Für die Untersuchung der Wirksamkeit dieser Substanzen ist folgendermaßen verfahren worden:

20 mg Nikotinsäure oder der zu testenden Substanz werden in einen 1000-mm-Meßkolben mit sterilem, destilliertem Wasser gelöst und auf 1000 ml aufgefüllt. Von dieser Lösung werden 10 ml auf 1000 ml aufgefüllt und steigende Mengen (0,25—5,0 ml = 0,05—1,0 γ) in Reagenzgläser gefüllt, jeweils auf eine Menge von 5 ml mit destilliertem Wasser ergänzt und mit 5 ml des nikotinsäurefreien Nährmediums**) versetzt. Die Reagenzgläser werden mit Wattestopfen sorgfältig verschlossen und bei 120° C in 1,1 atü im Autoklaven 15 Min. sterilisiert. Nach dem Abkühlen wird mit einer Aufschwemmung des in einer Vorkultur gezüchteten *Lactobac. arabinosus* beimpft. Die beimpften Lösungen werden dann 72 Std. bei 37° C in den Brutschrank gestellt. Nach 72 Std. wird der Inhalt der Reagenzgläser in einen 100-ml-Erlenmeyer-Kolben übergespült, mit 5 Tropfen Bromthymolblau versetzt und die entstandene Säure gegen n/10-NaOH titriert.

*) Die Pyridinverbindungen sind freundlicherweise von der Firma *Raschig*, Ludwigshafen, zur Verfügung gestellt worden.

**) Bacto Micro Inoculum Broth Dehydrated der *Difco Labor Inc.*, Detroit.

4) *L. Coté*, und *J. J. Oleson*, *J. Bacteriol.* 61, 463 (1951).

5) *Bergeys Manual of determinative Bacteriology*. Baltimore: *Williams & Wilkins* 1948.

6) *E. Snell* und *L. D. Wright*, *J. biol. Chemistry* 139, 675 (1941).

Bei den Nikotinsäureverbindungen, die in dem Konzentrationsbereich von 0,05—1,0 γ keine Wirksamkeit gezeigt haben, sind entsprechend konzentriertere Lösungen und jeweils bis 100 γ angewendet worden.

In diesem Zusammenhang sei eine Beobachtung über die Konzentrationsveränderungen in Nikotinsäurelösungen mitgeteilt. Werden Nikotinsäurelösungen mit gewöhnlichem destilliertem Wasser angesetzt, so sinkt nach einiger Zeit die Konzentration ab, im Tageslicht schneller als im Dunkeln (Abb. 1). Nach etwa 200 Std. ist in der Nikotinsäurelösung sowohl chemisch wie mikrobiologisch keine Nikotinsäure mehr nachweisbar. Schon die in der Nikotinsäurelösung noch im stärkeren Maße als in der Nikotinsäureamidlösung auftretende Trübung läßt das Anwachsen von Mikroorganismen erkennen. In Plattenkulturen sind hauptsächlich Bakterien der Coli-Gruppe nachweisbar gewesen, die offenbar die Nikotinsäure veratmen. In alkoholischen und in sterilen, wäßrigen Nikotinsäurelösungen erfolgt dagegen kein Konzentrationsabfall.

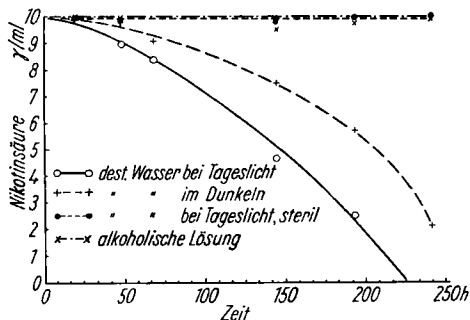


Abb. 1. Konzentrationsabfall in Nikotinsäurelösungen.

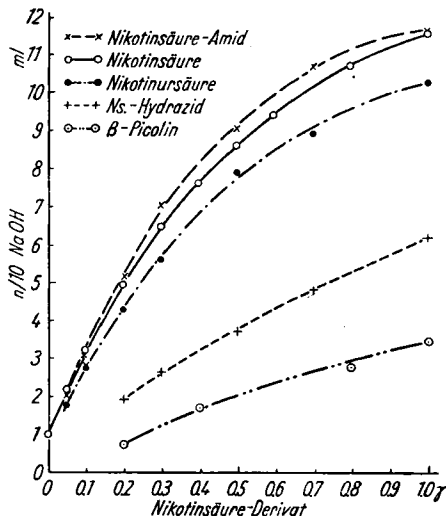


Abb. 2. Milchsäureerzeugung des *Lactobac. arabinosus*.

In Abb. 2 ist die Säureerzeugung des *Lactobac. arabinosus* in Gegenwart von Nikotinsäure, Nikotinsäureamid, Nikotinursäure, Nikotinsäurehydrazid und β -Picolin durch Kurven veranschaulicht. Auf der Abszisse sind die steigenden Mengen der Testsubstanzen und auf der Ordinate die jeweils titrierte Säuremenge eingetragen.

Nikotinsäureamid beeinflusst die Säurebildung etwas stärker als reine Nikotinsäure; Nikotinursäure vermag die Nikotinsäure zu ersetzen, wenngleich die entwickelte Säuremenge merklich niedriger liegt. (In Gegenwart von Nikotinsäurehydrazid ist die Milchsäurebildung stark vermindert, ebenso durch β -Picolin.)

In Tabelle 1 sind die untersuchten Pyridin- und Nikotinsäurederivate zusammengefaßt, die bis zu 2% der Wirksamkeit der Nikotinsäure auf Wachstum und Milchsäureerzeugung des *Lactobac. arabinosus* aufweisen, ohne daß aber eine Relation zur Molekülgröße besteht. Die Nikotinursäure besitzt eine Aktivität von 78% der Nikotinsäurewirkung, was mit den Angaben von *Snell* und *Wright*, die einen Wert von 74% mitteilen, gut übereinstimmt.

Tabelle 1

Einfluß der Nikotinsäurederivate auf die Milchsäureerzeugung des *Lactobac. arabinosus*
Nikotinsäure (123,1) = 100%

Verbindung Molgewicht	Milchsäureerzeugung gegenüber Nikotinsäure in %
Nikotinsäureamid 122,1	107
Nikotinursäure 180,1	78
Nikotinursäurehydrazid 137,1	26
β -Picolin 93,1	13
Nikotinsäure-Dextrosehydrazid 299,3	10
Dinicotinoylhydrazid 241,1	5,5

In der Tabelle 2 sind die Verbindungen zusammengestellt, die nur eine Wirksamkeit unter 1% besitzen, in deren Gegenwart der *Lactobac. arabinosus* keine Milchsäure mehr erzeugt, die also keinen Wirkstoffcharakter mehr besitzen.

Tabelle 2

Pyridin- und Nikotinsäurederivate ohne Wirkstoffaktivität

Verbindung Molgewicht	Milchsäureerzeugung gegenüber Nikotinsäure in %	
	10 γ	100 γ
Pyridin 79,1	1,0	0,0
Pyridin-2-aldehyd 107,1	0,2	0,0
Pyridin-3-aldehyd 107,1	0,6	0,4
Pyridin-4-aldehyd 107,1	0,2	0,1
Pyridin-2-6-Dialdehyd 135,1	0,0	0,0
Pyridin-6-methyl-2-aldehyd 121,1	0,3	0,0
Pyridin-3-carbinol 109,1	0,2	0,0
Nicotinoylanilin 198,2	0,7	0,5
Nikotinsäureamidjodäthylat 278,1	0,5	0,3
Nikotinsäureamidbromid 200,9	0,0	0,0

Pyridin und seine Derivate sind praktisch unwirksam, sie werden von dem *Lactobac. arabinosus* nicht verwertet; nur β -Picolin besitzt noch 19% der Nikotinsäurewirksamkeit (Tabelle 1).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Milchsäurebildung des *Lactobac. arabinosus* durch Nicotinsäureamid um etwa 7% gegenüber Nikotinsäure erhöht ist und die Aktivität der Nikotinsäurederivate im wesentlichen von der Art der Substituierung abhängt.

Beschreibung der Versuche

In früheren Arbeiten⁷⁾ ist eine Darstellungsmethode der Nikotinsäure aus 8-Oxychinolin und die der Nikotinursäure beschrieben worden. Die letztere beruht auf der gut verlaufenden Umsetzung des Nikotinsäureazids mit Glykokoll. Versuche, auf ähnliche Weise höhere Peptide aufzubauen, haben keinen Erfolg gehabt, da schon die Darstellung des Nikotinursäureazids aus dem Nikotinursäurehydrazid auf Schwierigkeiten stößt und nur mit sehr schlechten Ausbeuten durchführbar ist. Die Darstellung des Nikotinursäurehydrazids wird beschrieben. Andere Nikotinsäurepeptide durch Umsetzung des Azids mit Tyrosin, Glutaminsäure oder Alanin haben sich nicht nach der gleichen Methode darstellen lassen. Dagegen verläuft die Umsetzung des Nikotinsäureazids mit basischen Verbindungen, wie Anlin, recht glatt.

1. Nicotinoylanilin

9,3 g (0,1 Mol) Anilin werden in 40 ml Äthanol gelöst und mit 10,6 g Nikotinsäureazid versetzt. Nach etwa 2 Std. wird von Verunreinigungen abfiltriert und die Lösung eingedampft (Vorsicht N_3H !). Der Rückstand ist gelb bis braun gefärbt und schmilzt bei 108° C. Durch mehrfaches Umkristallisieren aus 50%igem Äthanol wird die Substanz rein erhalten.

Ausbeute: 12,8 g = 65% d. Th., Fp.: 123° C, Fp. des Pikrats: 188° C

$C_{12}H_{10}ON_2$ (198)	Ber.: C 72,72%	H 5,55%
	Gef.: » 72,91%	» 5,69%

2. Nikotinursäurehydrazid

a) Nikotinursäureäthylester

14,0 g (0,1 Mol) Glykokolläthylesterchlorhydrat werden in etwa 40 ml Wasser gelöst und mit 100 ml NaOH und 15 g Nikotinsäureazid versetzt. Die bei der Umsetzung freiwerdende N_3H wird innerhalb 3 Std. mit 100 ml n/1-NaOH neutralisiert. Nach 24 Std. ist das Azid vollständig umgesetzt. Das ausgefallene Natriumazid wird abfiltriert und die wäßrige Lösung mit Chloroform zweimal ausgeschüttelt. Die vereinigten Auszüge werden eingedampft. Der Rückstand erstarrt kristallin.

Ausbeute: 15,8 g = 74% d. Th., Fp.: 56° C

b) Nikotinursäurehydrazid

20,8 g (0,1 Mol) Nikotinursäureäthylester werden mit 10 ml 50%iger Hydrazinhydratlösung 30 Min. auf dem Wasserbad bei etwa 65° C unter Schwenken erwärmt. Die Umsetzung erfolgt sofort. Der sich abscheidende Kristallbrei wird mit wenig 96%igem Äthanol aufgenommen, scharf abgesaugt und getrocknet.

Ausbeute: 19,0 g = 97% d. Th., Fp.: 188° C

$C_8H_{10}O_2N_4$ (194,15)	Ber.: N 28,85%	Gef.: N 28,87%
----------------------------	----------------	----------------

3. Nikotinsäuredextrosehydrazid

13,7 g (0,1 Mol) Nikotinsäurehydrazid werden in 100 ml Äthanol mit 18,0 g Dextrose 5 Std. lang unter Rückfluß am Sieden gehalten, dabei geht die Substanz allmählich in

⁷⁾ M. Rohrlisch, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 283/55, 122 (1949); Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 284/56, 6 (1950).

Lösung. Die schwach gefärbte Lösung wird mit Tierkohle entfärbt und filtriert. Die beim Abkühlen sich kristallin ausscheidende farblose Substanz wird mehrmals aus 96%igem Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute: 8,6 g = ca. 30% d. Th., Fp.: 180° C, $\alpha_D^{20} = -65,2$

$C_{12}H_{16}O_6N_3$ (298,23) Ber.: N 14,09% Gef.: N 13,86%

Wird die wäßrige Lösung des Dextrosehydrazids 10 Min. lang gekocht, so geht die Links-drehung entsprechend der Aufspaltung des Hydrazids in die Rechts-drehung der Glukose über.

4. Nikotinsäureamidbromid

12,1 g (0,1 Mol) Nikotinsäureamid werden in 25 ml Wasser gelöst und unter Eiskühlung und Schwenken langsam mit 5 ml Brom versetzt. Nach etwa 16 Std. haben sich in dem wäßrigen, schmierigen Gemisch 2 Schichten gebildet, die im Scheidetrichter abgetrennt werden. Die wäßrige Schicht wird verworfen. Der Rückstand erstarrt in der Kälte zu einem schmierigen Kristallbrei, der sich in Alkohol auflöst. Nach einigen Stunden fallen aus der alkoholischen Lösung feine rote Kristalle aus. Nach Trocknung im Exsikkator beträgt die Ausbeute 3,2 g, der Schmelzpunkt 90° C. Die Substanz wird im Trockenschrank nachgetrocknet, wobei sich die offenbar durch oberflächlich anhaftende Bromreste verursachte rote Färbung verliert. Die Substanz ist gelb gefärbt und schmilzt bei 227° C. Aus der alkoholischen Mutterlauge kristallisieren beim Einengen nochmals 3,9 g mit einem Schmelzpunkt von 224° C aus. Diese Menge wird mit der zuerst erhaltenen vereinigt und aus der 25fachen Menge 96%igen Äthanol's umkristallisiert.

Ausbeute: 5,0 g = 27% d. Th., Fp.: 238° C.

$C_6H_5ON_2Br$ (200,9) Ber.: Br 39,97% Gef.: Br 39,81%

5. Nikotinsäureamidjodäthylat

1,22 g (0,01 Mol) Nikotinsäureamid werden mit 7 ml Äthyljodid versetzt und das Reaktionsgemisch 6 Std. lang unter Rückfluß im leichten Sieden gehalten. Danach wird das überschüssige Äthyljodid in etwa 30 ml heißem Wasser gelöst. Die Lösung wird filtriert und das Jodäthylat durch Zugabe von Äthanol (50—60 ml) ausgefällt. Das Nikotinsäurejodäthylat fällt in hellgelben Kristallen aus.

Ausbeute: 1,2 g = 43% d. Th., Fp.: 200° C.

$C_8H_{11}ON_3J$ (278,06) Ber.: C 34,52% H 3,95%
Gef.: » 34,72% » 4,07%

Bei der Herstellung der Präparate hat Frau I. Lichtenfels, bei den mikrobiologischen Arbeiten Herr K. H. Eisenhuth mitgearbeitet.

1379. A. Silber und W. Bischoff

Die Alkaloidführung von Wildgras-Mutterkorn

Aus dem Institut für Kulturpflanzenforschung der Deutschen Akademie der Wissenschaften,
Gattersleben

(Eingegangen am 23. August 1954)

Seitdem die Mutterkornzüchtung und der Mutterkornanbau größere wirtschaftliche Bedeutung gewonnen haben, sind in den verschiedensten Ländern umfangreiche Untersuchungen über die Variabilität des Mutterkorns durchgeführt worden. Sie haben ergeben, daß das auf Roggen, Weizen, Gerste vorkommende Mutterkorn vom Typ *Claviceps purpurea* Tul. in zahlreiche erblich gut fixierte