

Das Sublimat $C_{11}H_{12}N_2O$ wurde aus der mit Natronlauge in der früher beschriebenen Weise⁷⁾ dargestellten Carbonsäure $C_{12}H_{12}N_2O_3$ durch Sublimation bei 0.4 mm und 170–190° dargestellt. Schmp. 175° (korr.).

3.545 mg Sbst.: 9.12 mg CO_2 , 1.98 mg H_2O . — 2.667 mg Sbst.: 0.328 ccm N (18°, 750 mm).

$C_{11}H_{12}N_2O$. Ber. C 70.17, H 6.42, N 14.89.

Gef. „ 70.16, „ 6.25, „ 14.24.

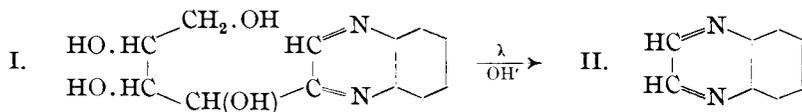
Der Deutschen Forschungs-Gemeinschaft haben wir für die Überlassung von Apparaten zu danken.

172. Richard Kuhn und Fritz Bär: Zum photochemischen Verhalten des Lacto-flavins; Modell-Versuche in der Chinoxalin-Reihe.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für medizin. Forschung, Institut für Chemie, Heidelberg.]
(Eingegangen am 4. April 1934.)

Die Inaktivierung von Vitamin B_2 durch Licht in alkalischer Lösung stellt einen eigenartigen photochemischen Vorgang dar, für den sich unseres Wissens keine Analogien anführen lassen¹⁾. Es werden nämlich, wie R. Kuhn, H. Rudy und Th. Wagner-Jauregg²⁾ gezeigt haben, aus dem Lacto-flavin, $C_{17}H_{20}N_4O_6$, durch die Bestrahlung 4 Kohlenstoffatome zusammen mit 4 acetylierbaren Hydroxylgruppen abgespalten, und es entsteht ein chloroform-lösliches Derivat $C_{13}H_{12}N_4O_2$, das im Absorptionsspektrum mit dem angewandten Lacto-flavin praktisch übereinstimmt. Es wurde wahrscheinlich gemacht, daß dabei eine Tetraoxy-butyl-Gruppe $-CH(OH).CH(OH).CH(OH).CH_2.OH$ durch 1 H-Atom ersetzt wird. Daß die zucker-ähnliche Seitenkette im Vitamin nicht glucosidisch gebunden ist, wurde aus der Resistenz gegen Mineralsäuren in der Siedehitze geschlossen.

Im 2-Tetraoxy-butyl-chinoxalin (I), das P. Griess und G. Harrow durch Kondensation von *d*-Glucose mit *o*-Phenylendiamin bereits vor 47 Jahren dargestellt haben³⁾, liegt nun eine Verbindung vor, die sich, wie wir gefunden haben, photochemisch gleichartig wie das Vitamin B_2 verhält. Bestrahlt man sie bei alkalischer Reaktion, so wird der am Kohlenstoff haftende Tetraoxy-butyl-Rest durch 1 H-Atom ersetzt, und man erhält das chloroform-lösliche Chinoxalin (II).

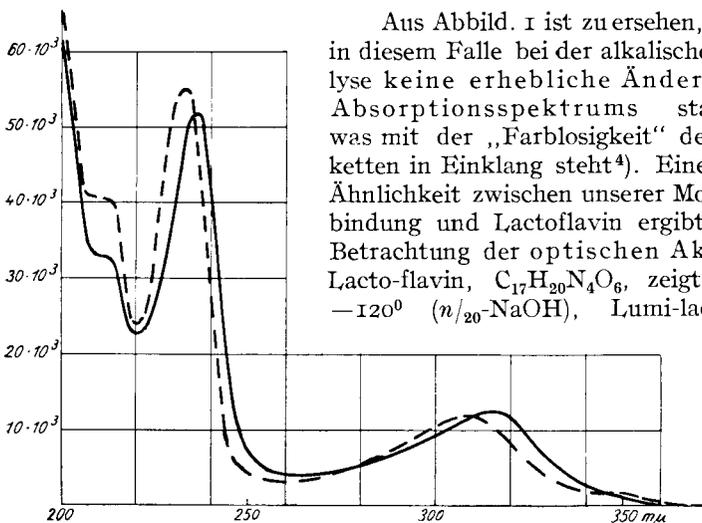


¹⁾ vergl. die zusammenfassende Darstellung über Reaktionen organischer Verbindungen im Lichte von F. Bachér, Abderhaldens Hdb. biolog. Arbeitsmethoden, Abt. I, Teil 2/II, 1 (Berlin und Wien, 1929).

²⁾ R. Kuhn u. Th. Wagner-Jauregg, B. **66**, 1677 [1933]; R. Kuhn, H. Rudy u. Th. Wagner-Jauregg, B. **66**, 1950 [1933].

³⁾ P. Griess u. G. Harrow, B. **20**, 2207 [1887]; dieselbe Verbindung wird nach E. Fischer, B. **22**, 92 [1889], auch aus *d*-Glucoson, nach H. Ohle, B. **67**, 155 [1934], auch aus *d*-Fructose und *o*-Phenylendiamin erhalten.

Da 2-Tetraoxybutyl-chinoxalin — im Gegensatz zum gelben Lacto-flavin — vollkommen farblos ist, wird für die Reaktion I → II ultraviolettes Licht benötigt. Bei Anwendung von Quarzgefäßen gelingt der Versuch auch im Sonnenlicht, das unter 300 m μ keine nennenswerte Energie mehr besitzt. Es genügt somit wie beim Vitamin B₂ in die langwelligste Absorptionsbande (Maximum bei 315 m μ ; Abbild. 1) einzustrahlen.



Abbild. 1.

————— 2-Tetraoxybutyl-chinoxalin

----- Chinoxalin

Lösungsmittel: absol. Alkohol.

Ordinaten: $x = \frac{2.30}{c \cdot d} \log_{10} \frac{I_0}{I}$.

C₁₃H₁₂N₄O₂, ist optisch inaktiv. Für 2-Tetraoxybutyl-chinoxalin, C₁₂H₁₄N₂O₄, fanden wir $[\alpha]_D^{21} = -156^\circ$ (Pyridin), Chinoxalin, C₈H₆N₂, dreht nicht. Es geht somit bei beiden photochemischen Reaktionen mit der Abspaltung der zuckerähnlichen Seitenkette auch das optische Drehungsvermögen verloren. Die Tatsache, daß 2-Tetraoxybutyl-chinoxalin und Lacto-flavin annähernd gleich stark linksdrehend sind⁵⁾, läßt vermuten, daß auch im Vitamin B₂ die zuckerähnliche Seitenkette in stereochemischer Hinsicht der *d*-Glucose entspricht.

Beim Lacto-flavin erhält man nicht nur durch alkalische Photolyse, sondern auch durch Acetylieren der Hydroxylgruppen ein in Chloroform lösliches Derivat (Tetraacetyl-lactoflavin)⁶⁾. Dasselbe ist bei dem in Chloroform unlöslichen 2-Tetraoxybutyl-chinoxalin der Fall, das eine bei 120° schmelzende Tetraacetyl-Verbindung⁷⁾ liefert, für die wir $[\alpha]_D^{19} = -29.3^\circ$ (Pyridin, $c = 0.298$) fanden.

4) Die nahe Übereinstimmung der Absorptionsspektren (Abbild. 1) kann als neuer Beweis für die Chinoxalin-Struktur von I angesehen werden.

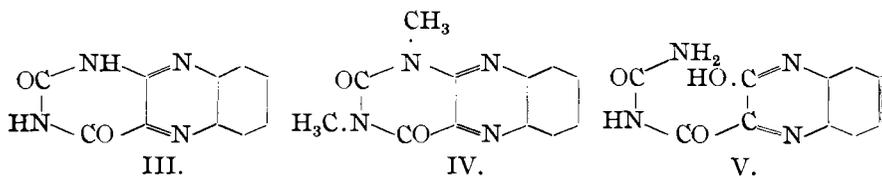
5) Das molare Drehungsvermögen $[M]_D = [\alpha]_D \cdot M/100$ von 2-Tetraoxybutyl-chinoxalin ist $[M]_D^{21} = -391^\circ$ (Pyridin), dasjenige von Lacto-flavin $[M]_D^{20} = -452^\circ$ ($n/_{20}$ -NaOH).

6) R. Kuhn u. Th. Wagner-Jauregg, B. **66**, 1677 [1933]; R. Kuhn, H. Rudy u. Th. Wagner-Jauregg, B. **66**, 1950 [1933]. 7) H. Ohle, B. **67**, 155 [1933/34].

Die photochemische Bildung von Chinoxalin aus 2-Tetraoxybutyl-chinoxalin, die wir aufgefunden haben, erscheint als bemerkenswertes Gegenstück zu einer Reaktion, die H. Ohle⁷⁾ vor kurzem für das nahe verwandte 3-Tetraoxybutyl-2-oxy-chinoxalin beschrieben hat. Diese Verbindung spaltet bei der Einwirkung von Phenyl-hydrazin nicht 4, sondern nur 3 Kohlenstoffatome der Seitenkette (in Form von Glycerin) ab und geht gleichzeitig in den 2-Oxy-chinoxalin-3-aldehyd über, der als Phenyl-hydrazon auskristallisiert. Es ist nicht ausgeschlossen, daß bei unserer Photo-reaktion zunächst ebenfalls nur 3 Kohlenstoffatome abgespalten werden und die Bildung des Chinoxalins durch Decarboxylierung der etwa nach Cannizzaro aus dem Aldehyd entstehenden Chinoxalin-2-carbonsäure zu erklären sein wird. Diese und andere Fragen des photochemischen Reaktions-Verlaufs bedürfen weiterer Versuche.

Bei der außerordentlichen Ähnlichkeit, die Lacto-flavin und 2-Tetraoxybutyl-chinoxalin in allen bisher betrachteten Eigenschaften zeigen, ist es wichtig, auch auf vorhandene Unterschiede hinzuweisen. Diese treten vor allem im Verhalten gegen Säuren und gegen Oxydationsmittel zutage. Vitamin B₂ ist gegen verd. Mineralsäuren auch in der Hitze sehr beständig. Das Chinoxalin-Derivat dagegen verändert sich in Eisessig-Lösung schon bei Zimmer-Temperatur langsam unter Gelbfärbung. Erhitzt man es mit 2-n. Salzsäure zum Sieden, so färbt sich die Lösung sehr rasch gelb. Nach dem Abstumpfen mit Natriumacetat läßt sich dann durch Chloroform eine Substanz ausschütteln, die vor der Quarzlampe intensiv himmelblau fluoresciert. 2-Tetraoxybutyl-chinoxalin reduziert, wie schon P. Griess und G. Harrow beobachtet haben, Fehlingsche Lösung in der Hitze sehr leicht. Reines Lacto-flavin reduziert auch bei längerem Kochen nur sehr schwach, wobei die anfangs vorhandene grüne Mischfarbe in das reine Blau der Fehlingschen Lösung übergeht.

Wie bereits vorläufig mitgeteilt wurde⁸⁾, lassen sich an synthetischen Verbindungen der Chinoxalin-Reihe noch weitere Eigenschaften beobachten, die am Vitamin B₂ entdeckt worden sind. Dies gilt besonders von der leuchtend roten, radikal-artigen Zwischenstufe, die bei Reduktion mit Zink, Zinn, Natrium-amalgam u. a. in stark saurer Lösung auftritt⁹⁾. Diese Reaktion des Vitamins wird, wie wir gefunden haben, in gleicher Schönheit, Intensität und Farbnuance auch vom gelben Alloxazin (III), sowie vom Dimethyl-alloxazin (IV) gegeben¹⁰⁾. Sie tritt dagegen nicht ein beim



⁸⁾ R. Kuhn u. Th. Wagner-Jauregg, B. **66**, 1677 [1933]; R. Kuhn, H. Rudy u. Th. Wagner-Jauregg, B. **66**, 1950 [1933].

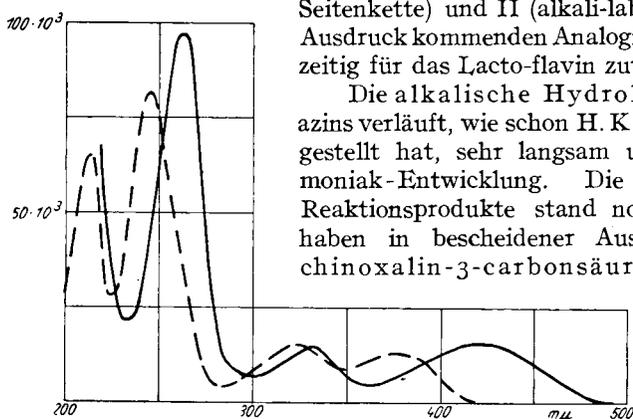
⁹⁾ R. Kuhn u. Th. Wagner-Jauregg, B. **67**, 361 [1934].

¹⁰⁾ Die gelbe alkalische Lösung von Alloxazin wird jedoch durch Natriumhydro-sulfit nicht entfärbt. Die Murexid-Probe fällt mit Alloxazin ebenso wie mit Lacto-flavin negativ aus.

Chinoxalin, *p*-(6-)Oxy-chinoxalin, 2-Oxy-chinoxalin u. a. Auch die gelbe Ureido-säure (V), die sich durch hydrolytische Aufspaltung des Pyrimidin-Ringes von III ableitet, wird unter den angeführten Bedingungen reaktiv entfärbt, ohne daß sich das Auftreten einer roten Zwischenstufe erkennen läßt. Die Reaktion ist somit bei diesen Verbindungen an die Unversehrtheit des alkali-labilen Pyrimidin-Ringes geknüpft, der jedoch keineswegs allgemein für das Auftreten der radikal-artigen Zwischenstufen verantwortlich gemacht werden darf, da auch α -Oxy-phenazin, Pyocyanin, Naphthophenazin u. a. gleichartige Radikale, wenn auch von anderer Farbe, geben.

Sehr weitgehend und auffallend ist die Ähnlichkeit in den Absorptionsspektren des Alloxazins (Abbild. 2) und des Lacto-flavins¹¹⁾, die sich durch eine geringe Parallel-verschiebung fast zur Deckung bringen lassen. Es ist natürlich zu erwarten, daß beim Ersatz des Cinoxalin-Kernes durch andere zweikernige, stickstoff-haltige Basen, die ein ähnliches Gefüge konjugierter Doppelbindungen aufweisen, sich eine gleich gute oder noch bessere spektroskopische Übereinstimmung ergeben kann. Es ist ferner selbstverständlich, daß die in den Formeln I (zucker-ähnliche Seitenkette) und II (alkali-labiler Ring) zum Ausdruck kommenden Analogien nicht gleichzeitig für das Lacto-flavin zutreffen können.

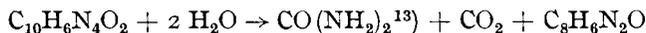
Die alkalische Hydrolyse des Alloxazins verläuft, wie schon H. Kühling¹²⁾ festgestellt hat, sehr langsam und unter Ammoniak-Entwicklung. Die Isolierung der Reaktionsprodukte stand noch aus. Wir haben in bescheidener Ausbeute 2-Oxy-chinoxalin-3-carbonsäure erhalten, die



Abbild. 2.

———— Alloxazin in 2-n. Natronlauge.
 - - - - - Dimethyl-alloxazin in Alkohol.

beim raschen Erhitzen auf 265° unter Abspaltung von Kohlensäure in das ebenfalls bei 265° schmelzende 2-Oxy-chinoxalin übergang. Die Brutto-gleichung dieser Reaktion:

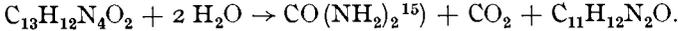


¹¹⁾ vergl. die Abbild. 1 bei R. Kuhn, P. György u. Th. Wagner-Jauregg, B. **66**, 1035 [1933].

¹²⁾ B. **24**, 2362 [1891].

¹³⁾ Unter den Reaktions-Bedingungen wird der Harnstoff hier weiter in Ammoniak und Kohlensäure zerlegt.

entspricht durchaus derjenigen, die R. Kuhn, H. Rudy und Th. Wagner-Jauregg¹⁴⁾ für die alkalische Spaltung des Lumi-lactoflavins aufgestellt haben:



Ein wichtiger Unterschied besteht aber darin, daß das Sauerstoffatom der Verbindung $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$ nicht in Form einer Hydroxylgruppe vorliegt (Analyse nach Th. Zerewitinoff¹⁴⁾).

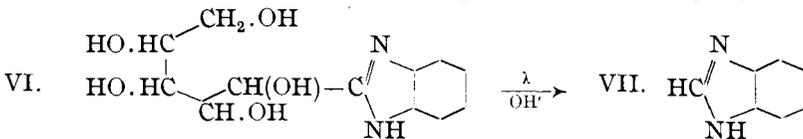
Das Dimethyl-alloxazin (IV), das zuerst aus Dimethyl-alloxan und *o*-Phenylendiamin von H. Kühling¹⁶⁾ gewonnen wurde, läßt sich auch durch Einwirkung von Jodmethyl auf das Silbersalz des Alloxazins erhalten. Diese Reaktion ist wichtig, weil sie das Vorliegen von 2 aktiven H-Atomen im Alloxazin anzeigt, die sich mit Rücksicht auf die außerordentlich geringe Löslichkeit in Anisol und Pyridin nicht nach Th. Zerewitinoff bestimmen ließen.

Dimethyl-alloxazin ist sehr viel leichter löslich als Alloxazin, es ist frei von aktiven H-Atomen. Die alkohol. Lösung fluoresciert prächtig blau. Durch Mineralsäuren wird die Fluorescenz reversibel zum Verschwinden gebracht, in alkalischer Lösung geht sie schon bei 15–20° durch hydrolytische Aufspaltung des Pyrimidin-Ringes langsam irreversibel verloren.

Reines Chinoxalin fluoresciert in wäßriger Lösung nicht. Dagegen zeigt 2,3-Dioxy-chinoxalin in verd. Soda vor der Analysen-Quarzlampe stark blaue Fluorescenz, die auf Zusatz von Natriumhydrosulfit verschwindet und unter der Einwirkung des Luft-Sauerstoffs zurückkehrt. Reines Benzimidazol fluoresciert nicht.

Aus Galaktose und *o*-Phenylendiamin erhält man nach P. Griess¹⁷⁾ in der Hauptsache Pentaoxy-*n*-amyl-benzimidazol (VI). Aus dieser

bei 246° schmelzenden Verbindung haben wir beim Belichten der alkalischen Lösung nur in sehr geringer Menge Benzimidazol (VII) erhalten:

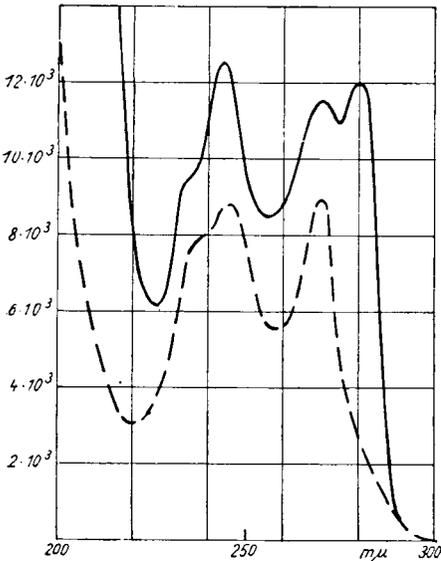


¹⁴⁾ B. 66, 1950 [1933].

¹⁵⁾ Die Harnstoff-Bildung wurde an dem Photoderivat $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_2$ des gelben Fermentes aus Hefe von O. Warburg u. W. Christian entdeckt.

¹⁶⁾ B. 24, 2362 [1891].

¹⁷⁾ B. 20, 3111 [1887].



Abbild. 3.

————— Pentaoxy-*n*-amyl-benzimidazol
 - - - - - Benzimidazol

Lösungsmittel: Wasser

Ordinaten: $x = \frac{2.30}{c \times d} \log_{10} \frac{I_0}{I}$

Die in überwiegender Menge auftretenden photochemischen Zersetzungsprodukte sind noch nicht identifiziert. Eine Konstitution entsprechend (VI) käme für Lacto-flavin nur in Betracht, wenn an Stelle einer Hexose eine Pentose am Aufbau des Vitamins beteiligt wäre. Dann sollte aber neben dem Tetraoxybutyl-Rest noch eine acetylierbare Iminogruppe vorliegen, da das Pentaoxy-*n*-amyl-benzimidazol mit Essigsäure-anhydrid in Pyridin eine Hexaacetyl-Verbindung vom Schmp. 179⁰ liefert, in der 5 Essigsäure-Reste an Sauerstoff und 1 Essigsäure-Rest an Stickstoff gebunden sind. Da im Lacto-flavin unter gleichen Bedingungen nur die photochemisch abspaltbaren Hydroxyle acetyliert werden können, ist eine Imidazol-Struktur entsprechend VI nicht wahrscheinlich.

Beschreibung der Versuche.

1) Photochemischer Abbau des 2-Tetraoxybutyl-chinoxalins.

Je 0.2 g 2-Tetraoxybutyl-chinoxalin¹⁸⁾ (Schmp. 187–188⁰) wurden mit 800 ccm 0.5-*n*. Natronlauge übergossen und in einer Entwickler-Schale aus Glas (20:25 cm) 5 Stdn. mit dem ungefilterten Licht einer Analysen-Quarzlampe (Heraeus) aus etwa 30 cm Entfernung bestrahlt. Die Substanz ging dabei allmählich in Lösung. Die Lösung färbte sich mit zunehmender Belichtungs-Dauer immer stärker gelb und nahm gelbgrüne Fluoreszenz an. Der Fortschritt der Reaktion läßt sich auch dadurch verfolgen, daß man von Zeit zu Zeit Proben entnimmt, diese mit Essigsäure eben ansäuert und mit Chloroform durchschüttelt. Nach 5 Min. zeigte das Chloroform im gefilterten Hg-Licht bereits schwache Fluoreszenz, nach 1 Stde. fluorescierten die Chloroform-Proben sehr stark gelb. Nach 5 Stdn. wurde alles mit Eisessig schwach angesäuert und wiederholt mit Äther ausgeschüttelt. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels hinterblieb ein rötlich braunes Öl, das den charakteristischen Geruch des Chinoxalins zeigte und im Vakuum über Calciumchlorid zum Teil kristallin erstarrte. Zur Reinigung wurde im Hochvakuum (0.02 bis 0.03 mm) bei 30–35⁰ destilliert. Das Destillat erstarrte zu langen, vollkommen farblosen Prismen, die bei 30⁰ schmolzen und mit synthetischem¹⁹⁾ Chinoxalin (Schmp. 30.5⁰) keine Erniedrigung des Schmelzpunktes zeigten. Die Ausbeuten betragen 10–20 % d. Th.

2) Alkalischer Abbau des Alloxazins.

1 g Alloxazin wurde mit 50 ccm 2-*n*. NaOH 24 Stdn. im Bombenrohr auf 120⁰ erhitzt. Nach dem Öffnen der Bombe machte sich deutlicher Ammoniak-Geruch bemerkbar. Die abfiltrierte Lösung wurde mit 2-*n*. HCl angesäuert und das ausgefallene Produkt (welches erhebliche Mengen, bei der Reaktion aus dem Glase herausgelöster, Kieselsäure enthielt) mit Alkohol ausgezogen. Die goldgelbe alkohol. Lösung wurde eingengt und schied nach kurzem Stehen bei 15–20⁰ gelbe Nadelchen ab, die nochmals aus Alkohol umkristallisiert wurden (0.2 g).

Der erhaltene Körper war identisch mit der von H. Kühling¹⁹⁾ und von O. Hinsberg²⁰⁾ auf anderem Wege gewonnenen 2-Oxy-chinoxalin-1-carbonsäure. Beim schnellen Erhitzen bzw. Sublimieren im Vakuum

¹⁸⁾ P. Griess u. G. Harrow, B. **20**, 2207 [1887]; H. Ohle, B. **67**, 155 [1934].

¹⁹⁾ B. **24**, 2368 [1891].

²⁰⁾ A. **292**, 245 [1896].

ging er bei 265° unter Kohlensäure-Abspaltung in das 2-Oxy-chinoxalin über, welches nach dem Umkrystallisieren des Sublimationsproduktes aus Eisessig + Wasser bei 265° schmolz und mit einem nach O. Hinsberg dargestellten Präparat identifiziert wurde.

3) Methylierung des Alloxazins.

3.3 g Alloxazin wurden in 50 ccm konz. Ammoniak + 150 ccm Wasser heiß gelöst und mit 5.2 g Silbernitrat in 20 ccm Wasser versetzt, wobei ein gallert-artiger, orange-roter Niederschlag ausfiel. Das Silbersalz wurde wiederholt mit Wasser und Alkohol gewaschen, bei 120° getrocknet und fein gepulvert. 5.7 g des roten Silbersalzes wurden mit 8 g Jodmethyl im Bombenrohr 20 Stdn. auf 100° erhitzt. Der gelbe Rückstand wurde zunächst mit Äther gewaschen, dann mit Eisessig ausgezogen, aus dem nach dem Einengen ein gelbes Krystallpulver ausfiel. Nach Umkrystallisieren aus Alkohol lagen 0.5 g schöne, goldgelbe Prismen vor, die übereinstimmend mit dem aus Dimethyl-alloxan und *o*-Phenylendiamin von H. Kühling erhaltenen Dimethyl-alloxazin bei 238° (korr.) schmolzen.

4.253 mg Sbst.: 9.36 mg CO₂, 1.58 mg H₂O. — 4.524 mg Sbst.: 9.91 mg CO₂, 1.69 mg H₂O. — 2.154 mg Sbst.: 0.429 ccm N (19°, 748 mm). — 1.860 mg Sbst.: 0.378 ccm N (21°, 744 mm). — 4.555 mg Sbst.: 6.352 mg AgJ. — Kein aktives H nach Th. Zerewitinoff-H. Roth.

C₁₂H₁₀N₄O₂ (242). Ber. C 59.50, H 4.13, N 23.14, -(N).CH₃ 12.39.
Gef. „ 60.02, 59.74, „ 4.16, 4.18, „ 22.92, 23.10, „ 8.91.

Dieselbe Dimethylverbindung wird in fast quantitativer Ausbeute erhalten, wenn man auf die ätherische Suspension von sehr fein gepulvertem Alloxazin Diazo-methan einwirken läßt.

4) Hexaacetyl-pentaoxy-*n*-amyl-2-benzimidazol.

Das als Ausgangsmaterial dienende Kondensationsprodukt von *d*-Galaktose und *o*-Phenylendiamin, C₁₂H₁₆N₂O₅ (VI), schmolz bei 246° (unt. Zers.) und zeigte:

$$[\alpha]_D^{20} = (+0.40^\circ \times 100) : (0.200 \times 4) = +50^\circ \text{ (Pyridin),}$$

$$[\alpha]_D^{20} = (+0.50^\circ \times 100) : (0.238 \times 4) = +52.5^\circ \text{ (Eisessig).}$$

0.36 g Substanz wurden mit 30 ccm Pyridin und 3.6 g Essigsäureanhydrid kurze Zeit erwärmt, wobei alles in Lösung ging. Die erhaltene Hexaacetyl-Verbindung krystallisiert aus Alkohol-Petroläther in langen, weißen, glänzenden Nadeln vom Schmp. 179°. Ausbeute: 0.53 g = 76 % d. Th.

$$[\alpha]_D^{20} = (+2.25^\circ \times 100) : (0.75 \times 4) = +75^\circ \text{ (Pyridin).}$$

4.030 mg Sbst.: 8.22 mg CO₂, 1.94 mg H₂O. — 4.209 mg Sbst.: 8.60 mg CO₂, 2.01 mg H₂O. — 7.184 mg Sbst.: 0.340 ccm N (18°, 760 mm). — 6.851 mg Sbst.: 0.327 ccm N (20°, 760 mm). — 6.686 mg Sbst.: 7.78 ccm *n*/₁₀₀-NaOH. — 6.822 mg Sbst.: 7.80 ccm *n*/₁₀₀-NaOH.

C₂₄H₂₈N₂O₄ (520). Ber. C 55.38, H 5.38, N 5.38, CO.CH₃ 49.61.
Gef. „ 55.63, 55.72, „ 5.39, 5.34, „ 5.55, 5.56, „ 50.06, 49.19.

Der Deutschen Forschungs-Gemeinschaft danken wir für die Überlassung von Apparaten.