

Tabelle 2.

Säure u. Konzentrat.	Dioxy-aceton		Glucose		Fructose		Galaktose	
	24	120	24	120	48	120	48	120
	Std.	Std.	Std.	Std.	Std.	Std.	Std.	Std.
$n/1$ -Schwefelsäure .....	18%	26%	—	12%	24%	25%	2.8%	9%
$n/10$ -Schwefelsäure .....	10%	23%	—	1.1%	15%	27%	—	0.6%
$n/20$ -Schwefelsäure .....	10%	26%	—	0.5%	13%	30%	—	0.4%
$p_h = 3.8$ (Acetat-Puffer) .....	9%	20%	—	1.7%	1.1%	7%	—	1.2%
$p_h = 6$ (Phosphat-Puffer) .....	11%	30%	—	0.4%	—	2.4%	—	0.1%

## 7) „Lignin-Bestimmung“ mit Methyl-glyoxal.

Von Hilpert<sup>11)</sup> ist darauf hingewiesen worden, daß bei der üblichen Lignin-Bestimmung dadurch Fehler entstehen können, daß unter den hierbei gebräuchlichen Bedingungen der im allgemeinen als Lignin angesehene Rückstand außerdem auch Huminsäuren enthält, wenn das Ausgangsmaterial nicht frei von Hexosen oder Pentosen war. Bei Vornahme einer Lignin-Bestimmung mit reiner Glucose erhielt er 0.9% Huminsäure. Wir führten deshalb auch mit Methyl-glyoxal eine „Lignin-Bestimmung“ durch, um zu sehen, ob auch Drei-Kohlenstoff-Systeme, wenn sie in einer Substanz vorhanden sind, deren Lignin-Gehalt durch Huminsäure-Bildung höher vertauschen, als er tatsächlich ist. Es wurden hierzu 3 g festes, gepulvertes Methyl-glyoxal mit 150 ccm 72-proz. Schwefelsäure versetzt und in einer Stöpselflasche 48 Stdn. bei 15–20° aufbewahrt. Dann wurde mit 1500 ccm Wasser verdünnt, kurz aufgeköcht und filtriert. Es konnten 120 mg Huminsäure (d. s. 4% d. Th.) isoliert werden, womit sich die eingangs ausgesprochene Vermutung bestätigt.

### 359. Richard Kuhn und Hermann Rudy: 6.7-Dimethyl- und 1.3.6.7-Tetramethyl-alloxazin.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für medizin. Forschung, Heidelberg, Institut für Chemie.]  
(Eingegangen am 1. Oktober 1934.)

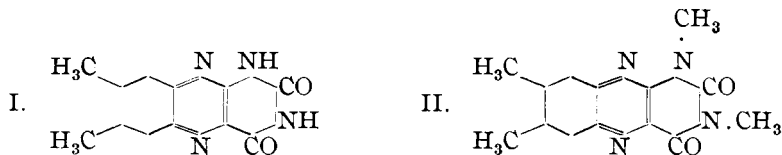
Seit 1 Jahr sind in unserem Institut verschiedene Umwandlungen des Lacto-flavins beobachtet worden, bei denen Verbindungen auftreten, die offenbar der Alloxazin-Reihe angehören. Ihre nähere Untersuchung wurde zunächst zurückgestellt, da es vorerst diejenigen Abbauprodukte aufzuklären galt, die spektroskopisch und in der Harnstoff-Bildung bei der alkalischen Hydrolyse<sup>1)</sup> mit dem Lacto-flavin übereinstimmen, die also noch Flavine darstellen. Nachdem dieses Ziel durch die Konstitutions-Aufklärung und Synthese des Lumi-lactoflavins erreicht ist<sup>2)</sup>, bietet die Aufklärung der anderen Wege des Abbaues keine sonderlichen Schwierigkeiten mehr. Die wichtigsten Umwandlungen des Lacto-flavins, bei denen alloxazin-artigen Verbindungen begegnet wurde, sind: 1) Die Abspaltung der zucker-ähnlichen Seitenkette mit Hilfe von Bleitetracetat<sup>3)</sup> (Perjodsäure), 2) Die Spaltung

<sup>1)</sup> O. Warburg u. W. Christian, Biochem. Ztschr. **258**, 496, **263**, 228 [1933]; R. Kuhn u. Th. Wagner-Jauregg, B. **66**, 1577 [1933].

<sup>2)</sup> R. Kuhn, K. Reinemund u. F. Weygand, B. **67**, 1460 [1934].

<sup>3)</sup> R. Kuhn, H. Rudy u. Th. Wagner-Jauregg, B. **66**, 1950 [1933].

des Lacto-flavins durch Licht bei neutraler oder schwach saurer Reaktion<sup>3)</sup>, 3) Die Einwirkung von Alkaliern auf Lumi-lactoflavin, wobei u. a. ein methylimid-freies „soda-lösliches Reaktionsprodukt“ auftritt<sup>4)</sup>. Die Bildung dieses Reaktionsproduktes haben wir bereits dahin erklärt<sup>2)</sup>, daß es sich um eine alkalische Entmethylierung des Lumi-lactoflavins handelt, die an den bekannten Übergang von Pyocyanin in  $\alpha$ -Oxy-phenazin unter ähnlichen Bedingungen erinnert. Daraus folgt unter Berücksichtigung der von uns aufgeklärten Konstitution des Lumi-lactoflavins (6.7.9-Trimethyl-flavins), daß dem soda-löslichen Reaktionsprodukt die Konstitution eines 6.7-Dimethyl-alloxazins (I) zukommt.



Das 6.7-Dimethyl-alloxazin ist bereits synthetisch nach dem Verfahren von O. Kühling dargestellt worden<sup>5)</sup>, doch wird nur angegeben, daß es „sich im geschlossenen Röhrchen oberhalb 300° dunkel färbt, ohne bis 340° zu schmelzen“, worauf sich natürlich keine Identifizierung gründen läßt, zumal auch eine Beschreibung der Krystallform und Elementaranalysen fehlen. Zur Aufklärung der angeführten Abbauprodukte des Lumi-lactoflavins beschreiben wir daher das synthetische 6.7-Dimethyl-alloxazin genauer: Es stimmt in der Krystallform (gerade auslöschende Nadeln), im Absorptionsspektrum (s. Abbild.<sup>6)</sup>), in den Farbreaktionen (Farbvertiefung mit Alkali, rote Zwischenstufe bei Reduktion in mineralisaurer Lösung), in der blauen Fluoreszenz (auch  $p_H$ -Abhängigkeit) mit dem soda-löslichen Abbauprodukt des Lumi-lactoflavins überein, zeigt aber wie dieses keinen scharfen Schmelzpunkt. Dafür läßt es sich leicht durch Diazo-methan<sup>7)</sup> in seinen *N*-Dimethyläther, das 1.3.6.7-Tetramethyl-alloxazin (II), verwandeln, das einen guten Schmp. (252°, korr.) besitzt. Um die Konstitution dieser Verbindung auf einem unabhängigen Wege zu sichern, haben wir sie auch durch Kondensation von 1.2-Dimethyl-4.5-diamino-benzol mit Dimethyl-alloxan dargestellt und in allen Eigenschaften Übereinstimmung mit dem durch Einwirkung von Diazo-methan auf 6.7-Dimethyl-alloxazin gewonnenen Produkt festgestellt (Misch-Schmp. 252°, korr.). Die Schmelzpunkte und Misch-Schmelzpunkte der in 1.3-Stellung dimethylierten Alloxazine erscheinen für die Identifizierung der Stammsubstanzen besonders geeignet<sup>8)</sup>, auch gelingt infolge der besseren Löslichkeit die Reinigung durch Krystallisation leichter.

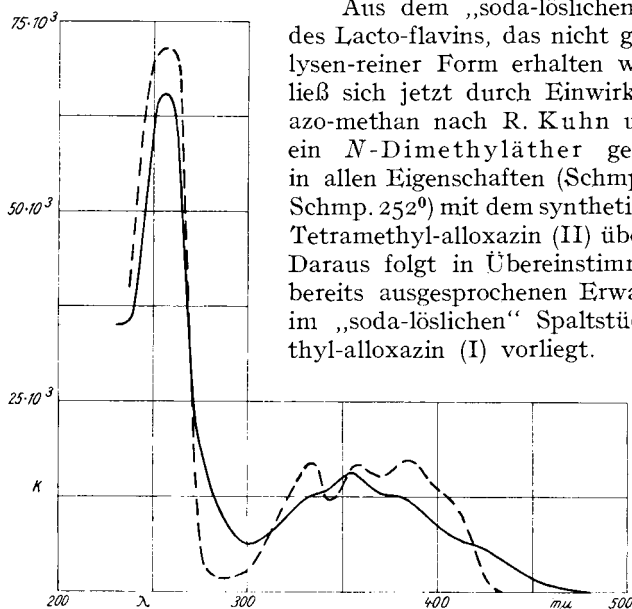
<sup>4)</sup> R. Kuhn u. H. Rudy, B. **67**, 982 [1934].

<sup>5)</sup> K. G. Stern u. E. R. Holiday, B. **67**, 1104, 1442 [1934].

<sup>6)</sup> vergl. R. Kuhn u. H. Rudy, B. **67**, 892 [1934], Abbild. 3, S. 894.

<sup>7)</sup> R. Kuhn u. F. Bär, B. **67**, 898 [1934].

<sup>8)</sup> Beispiel: Ein Gemisch von 1.3-Dimethyl-alloxazin (Schmp. 238°) und 1.3.6.7-Tetramethyl-alloxazin (Schmp. 252°) beginnt bereits bei 218° zu schmelzen und ist schon bei 229° klar.



Abbild. 1: 6.7-Dimethyl-alloxazin,  $C_{12}H_{10}N_4O_2$ .

— in  $n/1$ -Natriumcarbonat-Lösung ( $c = 1.04 \times 10^{-4}$  Mole/Liter,  $d = 0.508$  cm).  
 --- in Chloroform (90% + 10% Alkohol) ( $c = 0.95 \times 10^{-4}$  Mole/Liter,  $d = 0.508$  cm).

### Beschreibung der Versuche.

#### 6.7-Dimethyl-alloxazin.

3.32 g 1.2-Dimethyl-4-nitro-5-amino-benzol werden in eine Lösung von 18 g Zinnchlorür ( $2H_2O$ ) in 40 ccm konz. HCl eingetragen, wobei starke Erwärmung eintritt. Nach 5–10 Min. wird mit Wasser verdünnt, stark alkalisch gemacht und ausgeäthert. In den getrockneten Äther leitet man trocknen Chlorwasserstoff, wodurch das Chlorhydrat des 1.2-Dimethyl-4.5-diamino-benzols quantitativ ausfällt. Nach dem Zentrifugieren und Verjagen des Äthers wird in 50 ccm Wasser gelöst und die Lösung von 4.36 g Alloxan ( $4H_2O$ ) in 50 ccm Wasser eingetragen. Nach kurzem Stehen fällt das Alloxazin citronengelb aus. Aus 500 ccm Eisessig krystallisieren 2.5 g (54%, auf Diamin berechnet) analysen-reine Substanz in langen, dünnen, zu Bündeln vereinigten Nadeln aus; den Rest gewinnt man durch Verdünnen der Mutterlauge mit dem gleichen Volumen Wasser und Stehenlassen im Eisschrank. Die Substanz schmilzt nicht, sondern verfärbt sich ab  $335^0$  langsam und ist bei  $360^0$  stark zersetzt.

4.454 mg Stbst.: 9.73 mg  $CO_2$ , 1.72 mg  $H_2O$ . — 2.131 mg Stbst.: 0.427 ccm N ( $24^0$ , 758 mm).

$C_{12}H_{10}N_4O_2$ . Ber. C 59.48, H 4.17, N 23.13.

Gef. „ 59.57, „ 4.32, „ 22.96.

#### 1.3.6.7-Tetramethyl-alloxazin.

Aus 10 g Coffein wird nach Maly und Andreasch<sup>9)</sup> die Bisulfit-Verbindung des Dimethyl-alloxans dargestellt. Der Niederschlag wird einmal

<sup>9)</sup> Monatsh. Chem. 3, 92 [1882].

mit genügend Wasser gewaschen, in 200 ccm heißem Wasser gelöst und mit dem Chlorhydrat von 2.7 g ( $= \frac{1}{50}$  Mol.) 1.2-Dimethyl-4.5-diaminobenzol in 50 ccm Wasser versetzt. Die Kondensation findet statt, wenn man auf dem Dampfbade stark einengt. Der hellgelbe Niederschlag wird mit Wasser gewaschen und aus Eisessig unter Zusatz von Wasser umkristallisiert. Nach 3-maligem Umlösen schmolz die Substanz bei 252°, weiteres Umkristallisieren änderte den Schmelzpunkt nicht.

4.210 mg Sbst.: 9.64 mg CO<sub>2</sub>, 2.01 mg H<sub>2</sub>O. — 2.068 mg Sbst.: 0.379 ccm N (24°, 755 mm). — 3.706 mg Sbst.: 6.58 mg AgJ<sup>10</sup>).

C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>. Ber. C 62.20, H 5.22, N 20.73, CH<sub>3</sub> 11.11.  
Gef. „ 62.45, „ 5.34, „ 20.92, „ 11.36.

Die Ausbeute kommt der Berechnung nahe. Das 1.3.6.7-Tetramethylalloxazin kristallisiert in strohgelben, nahezu quadratischen, glitzernden Täfelchen, die unter gekreuzten Nicols bunt leuchten und parallel zu den Kanten auslöschen. In der Regel sind kleinere Täfelchen aufgewachsen<sup>11</sup>). Im Gegensatz zur 6.7-Dimethyl-Verbindung gibt die Substanz kein Silbersalz. Die stark verd., neutrale Lösung fluoresciert vor der Quarzlampe himmelblau. Durch Natriumhydrosulfit verschwindet die Fluoreszenz, beim Schütteln mit Luft kehrt sie zurück. Das nicht-methylierte Alloxazin verhält sich in dieser Hinsicht gleichartig. Durch verd. Alkali verschwindet aber die himmelblaue Fluoreszenz nur beim 1.3.6.7-Tetramethyl-Produkt, und zwar irreversibel, während sie bei der 6.7-Dimethyl-Verbindung reversibel nach grüngelb umschlägt.

Das aus dem soda-löslichen Abbauprodukt des Lumi-lactoflavins durch Einwirkung von Diazo-methan gewonnene 1.3.6.7-Tetramethyl-alloxazin gab bei der Analyse:

3.232 mg Sbst.: 7.40 mg CO<sub>2</sub>, 1.55 mg H<sub>2</sub>O. — 1.883 mg Sbst.: 0.339 ccm N (22°, 759 mm).

C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>. Ber. C 62.20, H 5.22, N 20.73.  
Gef. „ 62.44, „ 5.37, „ 20.80.

<sup>10</sup>) Nach R. Kuhn u. H. Roth, B. **67**, 1458 [1934].

<sup>11</sup>) Mitunter erhält man die Substanz aus Essigsäure auch in feinen, gerade auslöschenden Nadeln. Unter 0.2 mm sublimiert die Substanz bei 180—200° in glänzenden, citronengelben Nadeln vom unveränderten Schmp. 252° (korr.).