

hellgelbe Oxo-säure wird mit Wasser auf der Nutsche gewaschen und noch feucht aus 45 ccm siedendem Eisessig umkrystallisiert. Man erhält 3,2 g (80% d. Th.) strohgelbe, abgeschrägte Stäbchen von gerader Auslöschung, die oft büschelig angeordnet sind. Rasch erhitzt, schmilzt die Substanz bei 214° (k. Th.) unter lebhafter Zersetzung (CO₂-Abspaltung). Die synthetische β-Oxo-säure stimmt in allen Eigenschaften überein mit der Verbindung C₁₂H₁₂N₂O₃, die R. Kuhn und H. Rudy⁸⁾ durch alkalischen Abbau des natürlichen, R. Kuhn, K. Reinemund und F. Weygand²⁾ durch alkalischen Abbau des synthetischen Lumi-lactoflavins erhalten haben. Das aus unserer synthetischen Säure beim Erhitzen sich glatt bildende Decarboxylierungsprodukt C₁₁H₁₂N₂O, das 1-Methyl-2-oxo-6,7-dimethyl-1,2-dihydro-chinoxalin (VIII) schmilzt bei 176°. Es ist mit dem entsprechenden Abbauprodukt des natürlichen und des synthetischen Lumi-lactoflavins nach allen untersuchten Eigenschaften identisch.

4.193 mg Sbst.: 9.52 mg CO₂, 2.02 mg H₂O. — 4.308 mg Sbst.: 9.74 mg CO₂, 2.07 mg H₂O. — 4.090 mg Sbst.: 0.426 ccm N (21°, 755 mm). — 3.935 mg Sbst.: 0.421 ccm N (21°, 752 mm).

C₁₂H₁₂N₂O₃ (232.1). Ber. C 62.04, H 5.21, N 12.06.

Gef. „ 61.92, 61.66, „ 5.39, 5.38, „ 12.01, 12.03.

Nach den gegebenen Vorschriften⁹⁾ haben wir aus 16.6 g (¹/₁₀ Mol) 1,2-Dimethyl-4-nitro-5-amino-benzol 19.2 g (75% d. Th.) Lumi-lactoflavin erhalten. Die Ausbeuten in den aufeinander folgenden Stufen betragen 92%, 96%, 94%, 96% und 94% d. Th. Aus 1 kg des Nitro-xylidins könnte man daher etwa 1150 g Lumi-lactoflavin darstellen, wozu auf dem früheren Wege die Verarbeitung von etwa 7 Millionen Litern Milch erforderlich wäre.

380. Richard Kuhn und Hermann Rudy: Über die photochemische Bildung von 6,7-Dimethyl-alloxazin aus Lacto-flavin.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für medizin. Forschung, Heidelberg, Institut für Chemie.]
(Eingegangen am 23. Oktober 1934.)

Daß Vitamin B₂ (Lacto-flavin) schon durch sichtbares Licht inaktiviert (zerstört) wird, ist bereits wiederholt mitgeteilt worden¹⁾. Dabei wurde besonders hervorgehoben, daß nicht nur in alkalischer Lösung, in der O. Warburg und W. Christian²⁾ an der Farbstoff-Komponente des gelben Hefe-Fermentes die Bildung eines chloroform-löslichen Farbstoffs zuerst aufgefunden hatten, die Wirksamkeit verlorengelht, sondern daß auch in neutraler und saurer Lösung das Vitamin B₂ schon durch blaues und violettes Licht zerstört wird. B. C. P. Jansen und H. G. K. Westenbrink³⁾ haben dies bestätigt und bestrahlte Hefe-Präparate für die Grundkost von Ratten verwendet, die zur Bestimmung von Vitamin B₂ dienen. In einer

⁸⁾ B. 67, 892 [1934].

⁹⁾ Die Methylierung des Nitro-xylidins ist in Anlehnung an Versuche mit o-Nitranilin von E. H. Usherwood u. M. A. Whiteley, Journ. chem. Soc. London 123, 1069, u. zw. S. 1084, durchgeführt.

¹⁾ R. Kuhn, P. György u. Th. Wagner-Jauregg, B. 66, 317 [1933]; P. György, R. Kuhn u. Th. Wagner-Jauregg, Klin. Wchschr. 12, 1241 [1933]; R. Kuhn, Journ. Soc. chem. Ind. 52, 981 [1933].

²⁾ Naturwiss. 20, 980 [1932].

³⁾ Acta brev. neerl. Physiol. 3, 167 [1933]; Ber. Physiol. 78, 591 [1934].

Abhandlung von R. Kuhn, H. Rudy und Th. Wagner-Jauregg⁴⁾ wurde kurz erwähnt, daß reines Lacto-flavin beim Belichten in neutraler wäßriger Lösung bei Zutritt von Luft-Sauerstoff allmählich nahezu vollständig entfärbt wird, und daß dabei ein krystallisierendes Abbauprodukt erhalten wird, das etwa 10% N mehr enthält als Lacto-flavin und bis 360° nicht schmilzt.

Ohne Erwähnung dieser Befunde haben soeben P. Karrer, H. Salomon, K. Schöpp, E. Schlittler und H. Fritzsche⁵⁾ eine Abhandlung über die Belichtung von Lacto-flavin in neutraler und schwach saurer Lösung bei Zutritt von Luft veröffentlicht. Darin wird das krystallisierende, bis 360° nicht schmelzende Abbauprodukt in reinem Zustande beschrieben, als Lumichrom bezeichnet und ihm die Bruttoformel $C_{12}H_{10}N_4O_2$ zuerteilt. Ferner wird angegeben, daß diese Substanz mit 6.7-Dimethyl-alloxazin identisch ist; man findet aber weder Derivate, noch Abbauprodukte, die dies belegen würden. Es wird lediglich mitgeteilt, daß synthetisches 6.7-Dimethyl-alloxazin dieselbe himmelblaue Fluoreszenz wie das Photo-Derivat zeigt, während 6.8- und 7.8-Dimethyl-alloxazin blaugrün, 5.8-Dimethyl-alloxazin citronengelb (mit einem Stich ins grünliche) fluorescieren. Von einem Konstitutions-Beweis kann danach nicht die Rede sein. Von den 6 im Benzolkern dimethylierten Alloxazinen sind nur 4 zum Vergleich herangezogen worden. Nach dem damaligen Stande der von uns durchgeführten Abbau-Versuche des Lacto-flavins waren überdies auch alle 4 Äthyl-Homologen in Betracht zu ziehen, da aus Luni-lactoflavin maximal 0.90 Mole Essigsäure durch Oxydation mit Chromsäure erhalten waren. Daß unter diesen noch unbekanntenen Substanzen (6) auch solche mit himmelblauer Fluoreszenz sich befinden, konnte man gewiß nicht ausschließen, nachdem, wie R. Kuhn und F. Bär⁶⁾ schon früher gezeigt hatten, auch das 1.3-Dimethyl-alloxazin himmelblau fluoresciert*).

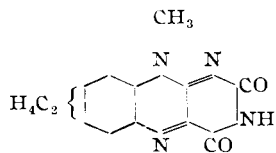
Wir sind nun in der Lage einen eindeutigen, strengen Konstitutions-Beweis für das bei neutraler und schwach saurer Reaktion auftretende Belichtungsprodukt des Lacto-flavins zu erbringen.

⁴⁾ B. **66**, 1950 [1933].

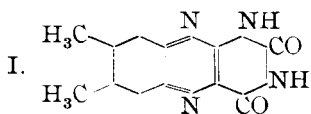
⁵⁾ Helv. chim. Acta **17**, 1010 [1934].

⁶⁾ B. **67**, 898 [1934]; R. Kuhn u. G. Moruzzi, B. **67**, 888 [1934].

*) Was die Formulierung als Alloxazin — unabhängig von Methyl- bzw. Äthylgruppen — betrifft, ist anzuführen, daß Vergleiche des Lacto-flavins und seiner Derivate mit Alloxazin nach den verschiedensten Richtungen aus unserem Institut bereits mitgeteilt waren ^{a)}, und daß bei Veröffentlichung der Abhandlung von P. Karrer, H. Salomon, K. Schöpp, E. Schlittler und H. Fritzsche ^{b)} für ein bei alkalischer Reaktion auftretendes Belichtungsprodukt des Lacto-flavins die nebenstehende Formel durch R. Kuhn u. H. Rudy ^{c)} bereits bekannt war. — ^{a)} Farbe und Zusammensetzung: R. Kuhn u. Th. Wagner-Jauregg, B. **66**, 1577 [1933]; Alkalische Hydrolyse (Reaktions-Gleichung): R. Kuhn, H. Rudy u. Th. Wager-Jauregg, B. **66**, 1950 [1933]; Reduktion in saurer Lösung (Radikal-Bildung): R. Kuhn u. Th. Wagner-Jauregg, B. **67**, 361 [1934]; durchwegs nach Modellversuchen mit F. Bär; pH -Abhängigkeit der Fluoreszenz: R. Kuhn u. G. Moruzzi, B. **67**, 888 [1934]; Silbersalze, Methylierung, Hydrolyse u. a.: R. Kuhn u. F. Bär, B. **67**, 898 [1934]; weitere Modellversuche mit Alloxazinen hatten im Anschluß hieran K. G. Stern u. E. R. Holiday, B. **67**, 1104 [1934] beschrieben. — ^{b)} eingegangen am 12. Juli, erschienen am 1. Oktober 1934. — ^{c)} B. **67**, 1928 [1934]; eingegangen am 20. Juni, erschienen am 4. Juli 1934.



Der von uns beschriebene Weg beruht nicht darauf, alle theoretisch möglichen Isomeren darzustellen, da ein solcher Vergleich in Anbetracht der Tatsache, daß kein bisher bekanntes Alloxazin einen charakteristischen Schmelzpunkt besitzt, von vorn herein keine scharfe Entscheidung erwarten ließ. Wir haben vielmehr versucht, ein einfaches, charakteristisches Derivat mit scharfem Schmelzpunkt zu erhalten. Dies ist uns schwer gelungen durch Einwirkung



H. Rudy⁷⁾ identisch ist. Damit ist bewiesen, daß dem fraglichen Belichtungsprodukt des Lacto-flavins die Formel des 6,7-Dimethyl-alloxazins (I) zukommt.

Die Umwandlung des Lacto-flavins in Lumi-lactoflavin geht, wie R. Kuhn, Th. Wagner-Jauregg und H. Kaltschmitt⁸⁾ gezeigt haben, mit sehr guter Ausbeute (bis 87 %) vor sich und ist von dem Reinheitsgrad des angewandten Lacto-flavins unabhängig. Die Entstehung des 6,7-Dimethyl-alloxazins beim Belichten in neutraler oder schwach saurer Lösung ist ein wesentlich komplizierterer Vorgang. So beobachteten wir einerseits beim Belichten konzentrierter Lösungen (Mutterlaugen der Tl- und Ag-Salze), daß trotz 10-stdg. intensiver Bestrahlung im unfiltrierten Licht der Quarzlampe nur ungefähr 15 % des vorhandenen Lacto-flavins in das 6,7-Dimethyl-alloxazin umgewandelt wurden (der Rest konnte anschließend innerhalb 1 Stde. bei alkalischer Belichtung in Lumi-flavin übergeführt werden). Andererseits haben wir beobachtet, daß verdünntere Lösungen schon im diffusen Tageslicht nach 2 Tagen unter Bildung des Alloxazins zu 60 % ausgebleicht wurden. Auf Grund dieser Unsicherheit ist somit für die analytische Erfassung der natürlichen Flavine die Umwandlung in das Lumi-flavin vorzuziehen.

Die Möglichkeit, daß 6,7-Dimethyl-alloxazin als Zersetzungs-(Belichtungs-)produkt des Lacto-flavins auch in Naturprodukten angetroffen wird, ist gewiß gegeben. P. Karrer, H. Salomon, K. Schöpp, E. Schlittler und H. Fritzsche⁹⁾ haben bereits in dieser Beziehung auf einen blau fluoreszierenden Stoff hingewiesen, den H. v. Euler und E. Adler⁹⁾ im Corpus luteum und in der Retina beobachtet haben. Wir sind der Ansicht, daß es sich gerade in diesen Fällen sicherlich nicht um 6,7-Dimethyl-alloxazin handeln kann. Wie nämlich R. Kuhn und H. Rudy⁷⁾ nachgewiesen haben, ist das 6,7-Dimethyl-alloxazin¹⁰⁾ sehr leicht durch Natriumhydrosulfit reversibel reduzierbar (vor der Quarzlampe verschwindet die blaue Fluoreszenz auf Zusatz von Na₂S₂O₄, beim Schütteln mit Luft kehrt sie zurück), während H. v. Euler und E. Adler⁹⁾ von ihrer blau fluoreszierenden Substanz ausdrücklich angeben, daß sie durch Hydrosulfit nicht reduziert werden kann.

Nach Beobachtungen von Hrn. F. W. van Klaveren kommen in der Natur sehr weit verbreitet (Milch, Hefe, Zuckerrübe, Malz, grüne Blätter u. a. sind daran besonders reich) auch blau fluoreszierende Verbindungen

⁷⁾ B. **67**, 1826 [1934].

⁸⁾ B. **67**, 1452 [1934].

⁹⁾ Ztschr. physiol. Chem. **223**, 110 [1934].

¹⁰⁾ Andere Alloxazine verhalten sich gleichartig.

vor, die sich durch Hydrosulfit wie Alloxazine reversibel reduzieren lassen. Die bisher gewonnenen Einblicke in die chemische Eigenart dieser Naturstoffe machen es aber nicht wahrscheinlich, daß es sich um Alloxazine handelt. Dasselbe gilt nach Beobachtungen von Hrn. F. Giral für blau fluoreszierende Bakterien-Farbstoffe, deren Fluoreszenz auf Zusatz von Hydrosulfit verschwindet und beim Schütteln mit Luft zurückkehrt.

Beschreibung der Versuche.

Durch Belichten schwach essigsaurer Lösungen von Lacto-flavin und Ausschütteln mit Chloroform wurden gelb-grünliche Lösungen erhalten, die intensiv blau fluorescierten. Zur Reinigung wurde das Chloroform mit $n/1$ -Natriumcarbonat-Lösung durchgeschüttelt, die alkalische Lösung mit Eisessig angesäuert und wiederum in Chloroform aufgenommen. Der Rückstand der Chloroform-Lösung wurde 3-mal aus Eisessig umkristallisiert. Wir erhielten so citronengelbe Nadeln, die sich von 330° ab langsam zersetzten, ohne bis 360° zu schmelzen. 15 mg eines solchen Präparates wurden fein verrieben, mit 10 ccm ätherischer Diazo-methan-Lösung stehen gelassen, abzentrifugiert und 2-mal aus konz. Essigsäure umkristallisiert. Das Methylierungsprodukt stellte feine, seidenglänzende, hellgelbe Nadeln dar, die bei 250° (korr.) schmolzen.

3.670 mg Subst.: 8.415 mg CO_2 , 1.75 mg H_2O . — 1.987 mg Subst.: 0.356 ccm N (22° , 759 mm).

$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$. Ber. C 62.20, H 5.22, N 20.73.

Gef. „ 62.53, „ 5.34, „ 20.71.

Der Misch-Schmelzpunkt mit 1.3.6.7-Tetramethyl-alloxazin⁷⁾ vom Schmp. 252° (korr.) lag bei 251° (korr.). Beide Präparate waren auch nach Kristallform und p_{H} -Abhängigkeit der Fluoreszenz identisch.

381. Richard Kuhn und Friedrich Weygand: Synthetische Verbindungen der Lacto-flavin-Gruppe (Vorläuf. Mitteil.).

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für medizin. Forschung, Heidelberg, Institut für Chemie.]
(Eingegangen am 23. Oktober 1934.)

Anlässlich der Synthese des Lumi-lactoflavins haben wir bereits zum Ausdruck gebracht¹⁾, daß es natürlich unser Bestreben sein wird, durch Einführung hydroxyl-haltiger Seitenketten, wofür besonders die 9-Stellung der Flavine in Betracht kommt, Farbstoffe mit Vitamin-B₂-Wirkung und das Lacto-flavin selbst künstlich darzustellen, wozu die von uns aufgefundene Flavin-Synthese²⁾, die auf Kondensation von *N*-monosubstituierten aromatischen *o*-Diaminen mit Alloxan beruht, Anwendung finden sollte. Wir haben nun gefunden, daß es auf dem vorgezeichneten Wege in der Tat gelingt, synthetische Verbindungen zu erhalten, die in allen chemischen Eigenschaften dem Lacto-flavin außerordentlich gleichen, und unter denen sich, wenn nicht das Lacto-flavin selbst, so doch Isomere dieses natürlichen Farbstoffs finden.

1) B. 67, 1460 [1934], und zwar S. 1462.

2) B. 67, 1409, 1459 [1934].