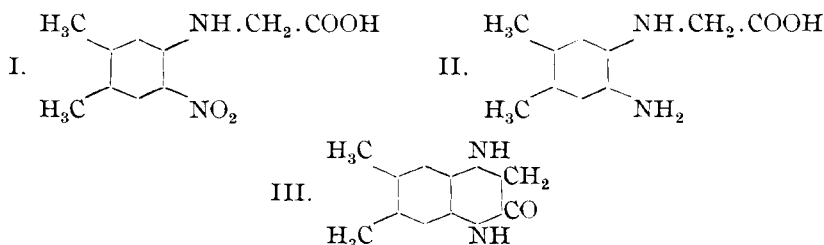


58. Richard Kuhn und Hermann Rudy:  
6.7-Dimethyl-flavin-9-essigsäure.

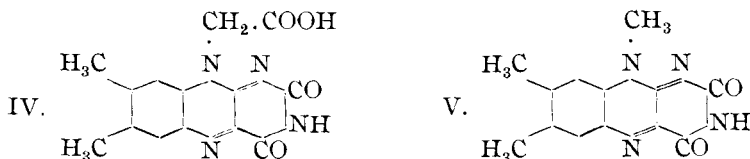
[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizin, Forschung, Heidelberg, Institut für Chemie.]  
(Eingegangen am 24. Dezember 1934.)

Die Synthese von Flavin-carbonsäuren ist nicht nur in präparativer, sondern auch in biologischer Hinsicht von Wichtigkeit. Verbindungen dieser Art, in denen die Carboxylgruppe am Benzolkern haftet, entstehen bei der Oxydation des Lumi-lactoflavins mit Kaliumpermanganat nach R. Kuhn, H. Rudy und Th. Wagner-Jauregg<sup>1)</sup>, und es ist zu vermuten, daß derartige Carbonsäuren auch im Organismus aus Vitamin B<sub>2</sub> durch Oxydation der seitenständigen Methylgruppen gebildet werden. Das von W. Koschara<sup>2)</sup> im Harn aufgefundene Aquo-flavin, dessen Photo-derivat in Chloroform nicht löslich ist, könnte vielleicht in diese Reihe gehören.

In der vorliegenden Mitteilung beschreiben wir eine Carbonsäure, deren Carboxylgruppe sich in der 9-ständigen Seitenkette befindet. Die Flavin-Synthese von R. Kuhn und F. Weygand<sup>3)</sup> hat sich auch im vorliegenden Falle bewährt, doch war es notwendig, eine neue Ausführungsform des Verfahrens zu finden. Die Kondensation von 1.2-Dimethyl-4-nitro-5-amino-benzol mit Brom-essigsäure zur 1.2-Dimethyl-4-nitro-5-anilino-essigsäure (I) bot nach dem Vorbild von J. Plöchl<sup>4)</sup> keine Schwierigkeit. Die Reduktion zur Amino-säure (II), die in schwach-



saurer Lösung mit Alloxan kondensiert werden sollte, ließ sich aber nicht ohne weiteres ausführen, weil die gewünschte Amino-säure (II) in freiem Zustande nicht beständig ist und unter Abspaltung von Wasser sofort in das Lactam III übergeht, das mit Alloxan nicht mehr unter Flavin-Bildung reagieren kann. Wir haben nun gefunden, daß sich diese Schwierigkeit umgehen läßt, wenn man die Nitrogruppe bei alkalischer Reaktion mit Natriumstannit reduziert und die alkalische Lösung in eine essigsäure Lösung von Alloxan einlaufen läßt. Unter diesen Bedingungen tritt die Flavin-Synthese in erfolgreichen Wettbewerb mit der Lactamisierung, und man erhält die gesuchte 6.7-Dimethyl-flavin-9-essigsäure (IV), die wir durch ihren Methylester, der bei 293<sup>0</sup> unter Zers. schmilzt, gekennzeichnet haben.



<sup>1)</sup> B. 66, 1950 [1933].

<sup>2)</sup> Ztschr. physiol. Chem. 229, 103 [1934].

<sup>3)</sup> B. 67, 1410, 1459, 1460 [1934].

<sup>4)</sup> B. 19, 7 [1886].

Die freie Carbonsäure ist in Wasser, nicht aber in Chloroform löslich. Sie spaltet, trocken erhitzt, Kohlendioxyd ab, wobei sie in Lumi-lactoflavin (V) übergeht. Es ist bemerkenswert, daß diese Decarboxylierung sehr leicht auch photo-chemisch erfolgt, wozu diffuses Tageslicht genügt. Die 6.7-Dimethyl-flavin-9-essigsäure ist in neutralen und schwach sauren Lösungen besonders licht-empfindlich. Sie geht dabei teilweise in Lumi-lactoflavin, zum größeren Teil aber in 6.7-Dimethyl-alloxazin über. In alkalischer Lösung ist die 6.7-Dimethyl-flavin-9-essigsäure gegen Licht verhältnismäßig beständig. Daraus folgt, daß diese Carbonsäure kein Zwischenprodukt bei der photo-chemischen Bildung von Lumi-lactoflavin aus Lactoflavin sein kann, was, auf Grund der Versuche von H. Ohle<sup>5)</sup> (primäre Abspaltung von C<sub>3</sub> aus dem Tetraoxy-butyl-Rest), R. Kuhn und F. Bär<sup>6)</sup> zur Diskussion gestellt hatten.

Die wasser-lösliche 6.7-Dimethyl-flavin-9-essigsäure zeigt in Mengen von 30—90  $\gamma$  je Tag an B<sub>2</sub>-arm ernährten Ratten keine Wachstumswirkung. Dasselbe gilt für ihren Glycerin-ester, der durch Umsetzung des Natriumsalzes mit  $\alpha$ -Chlorhydrin gewonnen und durch eine chloroform-lösliche Diacetylverbindung gekennzeichnet wurde. Man erkennt daraus, daß die biologische Wirksamkeit des Lacto-flavins nicht nur darauf beruht, daß es durch die zucker-ähnliche Seitenkette in 9-Stellung wasserlöslich bzw. unlöslich in Chloroform ist, sondern daß dem Tetraoxy-butyl-Rest ein spezifischer Anteil an der Vitamin-Natur zukommt.

### Beschreibung der Versuche.

1.2-Dimethyl-4-nitro-5-anilino-essigsäure: 15 g Brom-essigsäure und 18 g 1.2-Dimethyl-4-amino-5-nitro-benzol werden — analog der Darstellung von [*o*-Nitro-anilino]-essigsäure nach J. Plöchl — 1 Stde. auf 130° erhitzt. Das aus den ammoniakalischen Auszügen nach dem Erkalten und Ansäuern ausfallende Rohprodukt wird 1-mal aus Alkohol umkrystallisiert. Ausbeute: 11.2 g. Der Schmp. von 204° (korr.) ändert sich bei weiterem Umkrystallisieren aus Alkohol und aus Eisessig nicht.

4.066 mg Sbst.: 8.03 mg CO<sub>2</sub>, 1.97 mg H<sub>2</sub>O. — 3.488 mg Sbst.: 0.388 ccm N (20°, 745 mm).

C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. Ber. C 53.55, H 5.40, N 12.50.

Gef. „ 53.86, „ 5.42, „ 12.70.

6.7-Dimethyl-flavin-9-essigsäure: 11 g der 1.2-Dimethyl-4-nitro-5-anilino-essigsäure werden in 200 ccm 2-n. NaOH gelöst und zu 500 ccm einer 35 g Zinnchlorür (+2 H<sub>2</sub>O) enthaltenden Stannit-Lösung gegeben, wodurch die Farbe im Verlaufe von 15 Min. stark aufgehellt wird. Die alkalische Lösung wird nun in 3 Portionen zu einer Lösung von je 5 g Alloxan in 200 ccm Eisessig und 20 ccm Wasser unter Rühren langsam zufließen lassen, wobei die Temperatur auf 50—60° gehalten wird. Das Ganze wird mit 200 ccm konz. Salzsäure versetzt und mit 110 g Holzkohle (Hiag) 1 Stde. gerührt, bis der gesamte Farbstoff adsorbiert ist. Die Kohle wird zunächst kalt, dann warm mit Wasser gewaschen (8—10-mal) und der Farbstoff mit Pyridin-Methanol-Wasser-Gemisch eluiert. Beim Einengen der Eluate auf 200 ccm krystallisiert das Rohprodukt in feinen Nadeln. Ausbeute 4.4 g (kolorimetrisch sind davon 0.5 g Flavin-Farbstoff).

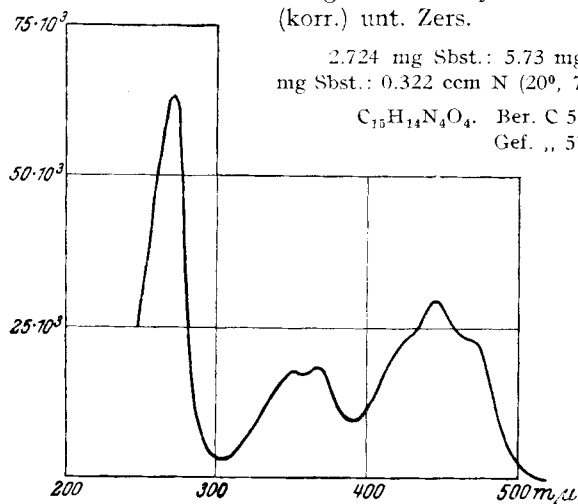
<sup>5)</sup> B. 67, 155 [1934].      <sup>6)</sup> B. 67, 898 [1934].

Das Rohprodukt wird aus Alkohol und konz. Essigsäure umkrystallisiert, dann durch mehrstündiges Schütteln mit salzsäure-haltigem Methylalkohol in den Methylester übergeführt. Die Methanol-Lösung wird in wäßrige Natriumacetat-Lösung gegossen, diese mit Chloroform ausgeschüttelt und die gut getrocknete Chloroform-Lösung an eine Säule von Aluminiumoxyd adsorbiert. Entwickelt wird mit Chloroform, eluiert mit Chloroform + 10% Methanol. Der so chromatographisch gereinigte Methylester wird aus konz. Essigsäure umkrystallisiert (3-mal). Schmp. 293<sup>0</sup> (korr.) unt. Zers.

2.724 mg Sbst.: 5.73 mg CO<sub>2</sub>, 1.15 mg H<sub>2</sub>O. — 2.065 mg Sbst.: 0.322 ccm N (20°, 738 mm).

C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>. Ber. C 57.31, H 4.49, N 17.83.

Gef. „ 57.37, „ 4.72, „ 17.64.



Abbild. 1. 6.7-Dimethyl-flavin-9-essigsäure-methylester.  
Abszissen: Wellenlängen in m $\mu$ .

$$\text{Ordinaten: } x = \frac{2.30}{c \times d} \log \frac{I_0}{I}$$

Lösungsmittel: absol. Alkohol (10%) + Chloroform (90%).

d = 0.114 cm. c = 7.3 · 10<sup>-4</sup> Mol/Liter.

Der Methylester krystallisiert in büschelförmig vereinigten, glänzenden, gelben Nadelchen. Das Absorptionsspektrum ist in Abbild. 1. dargestellt. Die Substanz ist gut löslich in Ameisensäure, Eisessig und Chloroform, weniger in Alkohol, fast gar nicht in Wasser, so daß bei der Verteilungs-Probe zwischen Chloroform und Wasser aller Farbstoff in der unteren Schicht bleibt. Durch verd. Natronlauge, weniger leicht durch Ammoniak erfolgt schon bei 15–20° in kurzer Zeit Verseifung. Nach dem Ansäuern mit Essigsäure läßt sich dann kein Farbstoff mehr mit Chloroform ausschütteln.