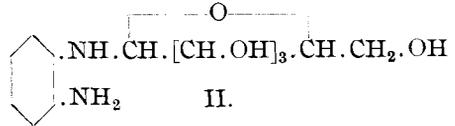
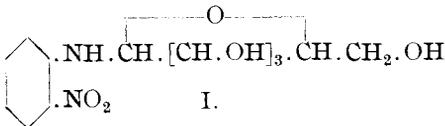


139. Richard Kuhn und Rudolf Ströbele: *Synthese von Flavin-glucosiden.*

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizin. Forschung, Heidelberg, Institut für Chemie.]
(Eingegangen am 10. Februar 1937.)

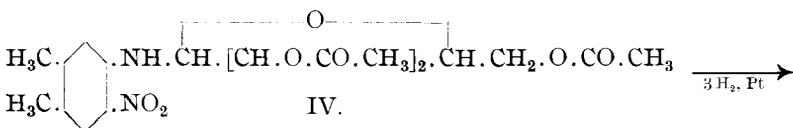
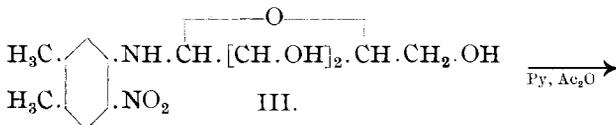
Die katalytische Hydrierung von *o*-Nitranilin-glucosiden¹⁾ (I) läßt sich so leiten, daß nur die Nitrogruppe zur Aminogruppe reduziert wird und man zu *o*-Phenylendiamin-glucosiden (II) gelangt.



Die Darstellung solcher Verbindungen durch Kondensation von *o*-Phenylendiaminen mit reduzierenden Zuckern ist schon wiederholt versucht worden, aber stets ohne Erfolg, weil die Diamine unter den angewandten Bedingungen mit den Zuckern ähnlich wie 2 Mol. Phenylhydrazin bei der Osazonbildung reagieren und man Tetraoxybutyl-chinoxaline sowie andere bicyclische Kondensationsprodukte erhält²⁾.

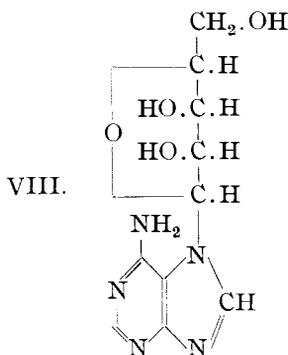
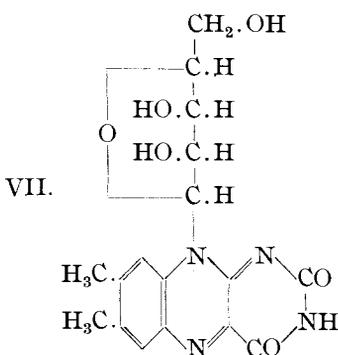
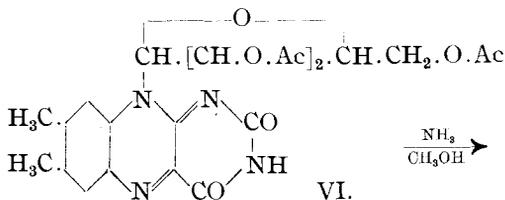
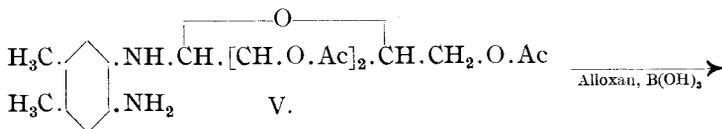
Unsere Absicht, die *o*-Phenylendiamin-glucoside durch Kondensation mit Alloxan unmittelbar in Flavin-9-glucoside überzuführen, konnten wir noch nicht verwirklichen. Wir erhielten im wesentlichen nur die aus den entsprechenden freien *o*-Diaminen und Alloxan entstehenden Alloxazine. Es trat also Abspaltung der Zucker-Reste ein.

Die Lösung der Aufgabe gelang auf dem Umwege über die acetylierten *o*-Nitranilin-glucoside, die sich nach katalytischer Hydrierung der Nitrogruppe mit Alloxan-Borsäure zu den acetylierten Flavin-glucosiden umsetzen ließen (Ausb. 60—65% d. Th.). Aus diesen konnten bei Ausschluß jeder Spur von Feuchtigkeit durch methylalkoholisches Ammoniak alle Acetylgruppen ohne weitere Veränderungen des Moleküls abgespalten werden. Die auf diesem Wege durchgeführte Synthese des 6.7-Dimethyl-9-*d*-ribosido-flavins (VII) ist in ihren Einzelheiten aus folgender Formelreihe ersichtlich:



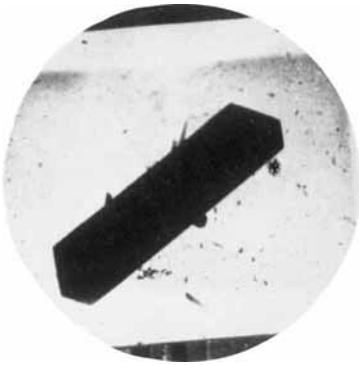
¹⁾ R. Kuhn u. R. Ströbele, B. **70**, 777 [1937].

²⁾ P. Griess u. G. Harrow, B. **20**, 2207 [1887]; R. Kuhn u. F. Bär, B. **67**, 898 [1934].

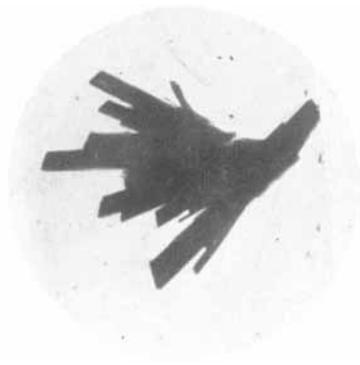


Daß es sich um Derivate der *d*-Ribo-furanose handelt, ist nur für die Ausgangssubstanz, das *d*-Ribose-2-nitro-4.5-dimethyl-anilid (III), durch Bildung einer Trityl-Verbindung nach B. Helferich-H. Brederick als experimentell erwiesen zu erachten. Diese Spannweite der Sauerstoffbrücke dürfte bei der sehr glatt und unter milden Bedingungen verlaufenden Darstellung der Triacetyl-Verbindung (IV) und der anschließenden katalytischen Hydrierung zum Triacetyl-*d*-ribosido-2-amino-4.5-dimethylanilid (V) erhalten bleiben und auch noch im 9-Triacetyl-*d*-ribosido-6.7-dimethyl-flavin (VI) vorliegen. Dieselbe Betrachtung gilt für die im Versuchsteil beschriebenen analogen Derivate der *d*- und *l*-Arabinose. Ob auch bei der letzten Stufe der Synthese (Abspaltung der Acetylene) die furoide Struktur des Ribose-Restes erhalten bleibt, ist ungewiß. Wir halten es jedoch für wahrscheinlich, weil H. Brederick³⁾ aus den der chemischen Konstitution nach äußerst ähnlichen Nucleosiden von der Art des Adenosins (VIII) Trityl-Verbindungen erhalten konnte, deren Existenz für das Vorliegen einer freien, primären Hydroxylgruppe in 5'-Stellung spricht. Unentschieden ist die Frage nach der Anordnung der Substituenten am C-Atom 1', da die theoretisch zu erwartende α , β -Isomerie noch nicht verwirklicht ist. Die von der *d*- und *l*-Arabinose sowie von der *d*-Ribose abgeleiteten 6.7-Dimethyl-flavin-9-glucoside sind uns bisher jeweils nur in 1-Form begegnet. Die isolierten Formen unterscheiden sich von den entsprechenden 9-Tetra-

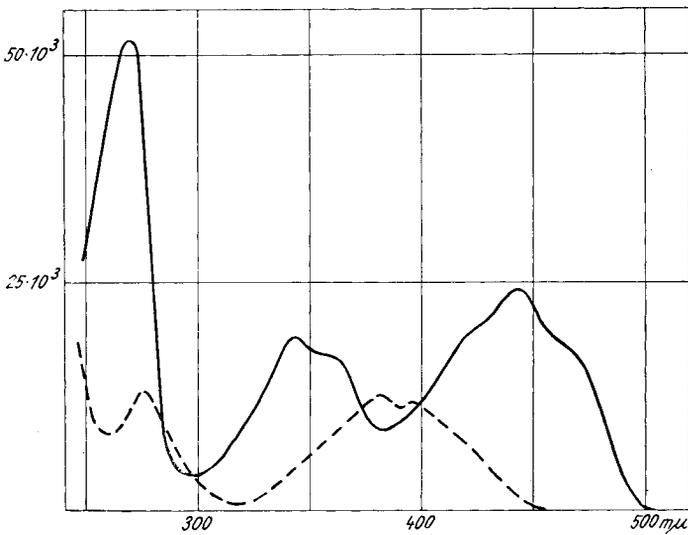
³⁾ B. **66**, 198 [1933].



Abbild. 2. Triacetyl-*d*-ribose-2-nitro-4.5-dimethyl-anilid aus Alkohol.



Abbild. 3. 6.7-Dimethyl-9-*d*-ribosido flavin aus NH_3 -haltigem Methanol.



Abbild. 4. Absorptions-Spektren in Methylacetat.

— 6.7-Dimethyl-9-*l*-triacetyl-arabinosido-flavin

- - - Triacetyl-*l*-arabinose-*o*-nitranilid.

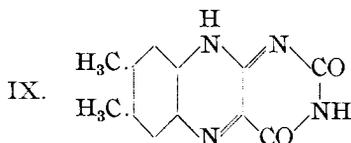
Abzissen: Wellenlängen in $\text{m}\mu$.

Ordinaten: $x = \frac{2,30}{c \times d} \log_{10} \frac{I_0}{I}$ (c in Mol/Liter, d in cm).

oxy-amyflavinen, bei denen das dem Chromophor benachbarte C-Atom 1' symmetrisch ist, durch sehr viel stärkeres Drehungsvermögen, bei entgegengesetztem Vorzeichen:

6.7-Dimethyl-9- <i>l</i> -arabo-flavin	$[\alpha]_D^{20} = - 25^{\circ}$ (Pyridin)
6.7-Dimethyl-9- <i>l</i> -arabinosido-flavin	$[\alpha]_D^{20} = + 420^{\circ}$ „
6.7-Dimethyl-9- <i>d</i> -ribo-flavin	$[\alpha]_D^{20} = - 30^{\circ}$ „
6.7-Dimethyl-9- <i>d</i> -ribosido-flavin	$[\alpha]_D^{20} = + 470^{\circ}$ „

Das 6.7-Dimethyl-9-*d*-ribosido-flavin gleicht dem Lactoflavin in der Farbe und in der Fluorescenz seiner Lösungen. Wesentlich verschieden ist die Krystallform (derbe abgeschrägte Prismen, die meist fächerförmig angeordnet sind, Abbild. 2). Beim Erhitzen tritt gegen 200° Farbaufhellung (Alloxazinbildung) ein. Während Lactoflavin stundenlang mit 2-*n*. Salzsäure gekocht werden kann, erleidet das Flavin-ribosid (VII) schon durch verd. Essigsäure in der Kälte in kürzester Zeit Hydrolyse unter Bildung von *d*-Ribose und 6.7-Dimethyl-alloxazin. Von diesem wurden in einem mit 6.7-Dimethyl-9-*l*-arabinosido-flavin ausgeführten quantitativen Versuch 98 % d. Th. erhalten. Die außerordentliche Säure-Empfindlichkeit der Flavin-9-glucoside macht die Erfolglosigkeit der Versuche, solche Verbindungen aus *o*-Phenylen-diamin-glucosiden und Alloxan in saurer wäßriger Lösung unmittelbar zu gewinnen, verständlich. Da die Hydrolyse der Flavin-9-glucoside unter ungewöhnlich gelinden Bedingungen gelingt, schien es uns nicht ausgeschlossen, daß dabei zunächst das noch unbekannte 6.7-Dimethyl-iso-alloxazin (IX) auftreten würde, das sich erst nachträglich

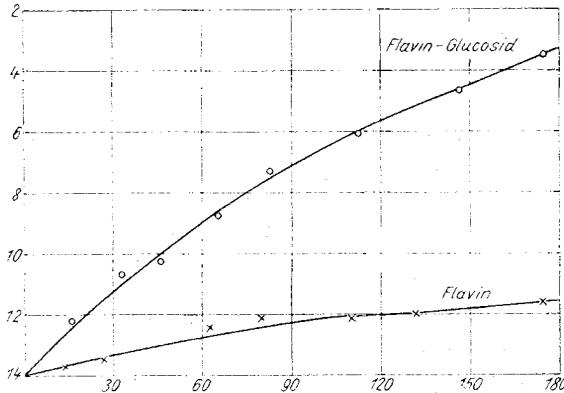


unter Wanderung des H-Atoms von 9- in 1-Stellung zum 6.7-Dimethyl-alloxazin stabilisiert. Hierfür konnten jedoch keine Anhaltspunkte gewonnen werden. Auch bei der höchst auffallenden Spaltung, welche die Flavin-9-glucoside bereits in der Kälte durch $n/_{10}$ -Natronlauge erleiden, tritt das 6.7-Dimethyl-alloxazin offenbar gleich als solches auf, da die frisch bereitete, nicht fluorezierende alkalische Lösung in dem Maße als Zersetzung des Flavinglucosids einsetzt, gleich die gelbgrüne Fluorescenz einer alkalischen Lösung von 6.7-Dimethyl-alloxazin annimmt. Die Aussichten, das Flavin = Iso-alloxazin (IX, ohne Methyl) zu isolieren und damit diese noch immer hypothetische Stammsubstanz des Vitamins B₂ wirklich kennen zu lernen, sind danach äußerst gering. Die Existenz der Iso-alloxazine ist offenbar an den Ersatz des in 9-Stellung haftenden H-Atoms durch geeignete Substituenten geknüpft.

Nicht nur gegen Hitze, Säuren und Alkalien, sondern auch gegen Licht sind die Flavin-9-glucoside sehr empfindlich. Die Lichtempfindlichkeit übertrifft diejenige des Lactoflavins bei weitem (Abbild. 1). Wie bei der thermischen Zersetzung und der Spaltung durch H⁺- und OH⁻-Ionen tritt auch bei der Photolyse 6.7-Dimethyl-alloxazin auf.

Das 6.7-Dimethyl-9-*d*-ribosido-flavin (VII) läßt sich durch Natriumhydrosulfit in neutraler Lösung zu einer farblosen Leuko-Verbindung reduzieren, die beim Schütteln mit Luft den glucosidischen, gelbgrün fluo-

rescierenden Farbstoff zurückbildet. In biologischer Hinsicht vermag es aber Lactoflavin nicht zu ersetzen. Das 6.7-Dimethyl-9-*d*-ribosido-flavin (VII),



Abbild. 1. Photolyse von 6.7-Dimethyl-9-*d*-arabinosido-flavin (O—O—O) und von 6.7-Dimethyl-9-*d*-ribo-flavin (Lactoflavin x—x—x).

Abszissen: Belichtungsdauer in Minuten.

Ordinaten: Flavingehalt in γ pro ccm; nach Ausschütteln mit Chloroform am Stufenphotometer bestimmt.

Lösungsmittel: Wasser, $t = 22^\circ$, Lichtquelle: 500 Watt-Lampe in 30 cm Abstand.

in dem wir eine nucleosidartige Vorstufe des Lactoflavins in den Pflanzen vermuten, ist bis zu 100 γ je Tag an B_2 -frei ernährten Ratten ohne jede Wachstumswirkung und es ist nicht befähigt mit dem kolloiden Träger des gelben Ferments nach Art des Lactoflavins zu einem katalytisch wirksamen Chromoprotein zusammenzutreten. Aus dem Ergebnis der Wachstumsversuche ist zu schließen, daß dem Tierkörper (Ratte) die Fähigkeit abgeht, den *d*-Ribosido-Rest zum *d*-Ribityl-Rest zu reduzieren.

Beschreibung der Versuche.

9-Triacetyl-*d*-arabinosido-6.7-dimethyl-flavin.

0.30 g Triacetyl-*d*-arabinosido-2-nitro-4.5-dimethyl-anilid²⁾ werden in 8 ccm Essigsäure-methylester gelöst, mit 0.50 g Triäthylamin versetzt und mit 0.050 g Platinoxid und Wasserstoff von 1 atü geschüttelt. Nach längstens 60 Min. ist die Lösung entfärbt. Hierauf gießt man durch ein Filter in eine erkaltete Lösung von 0.20 g Alloxan-monohydrat und 0.20 g Borsäure in 30 ccm Eissig. Dabei färbt sich das Reaktionsgemisch zunächst dunkelgrün, im Laufe 1 Stde. geht die Farbe über Braun in reines Gelb mit grüner Fluoreszenz über. Nach weiteren 2 Stdn. (15—20°) wird so rasch als möglich mit Wasser verdünnt und mit Chloroform ausgeschüttelt. Man wäscht die Chloroform-Lösung gründlich mit Wasser (3—4-mal), trocknet über Natriumsulfat, verdampft und krystallisiert den Rückstand aus 200—300 ccm siedendem absol. Alkohol um, den man, wenn alles in Lösung gegangen ist, wieder einengt. Die Ausbeute an 9-Triacetyl-*d*-arabinosido-6.7-dimethyl-flavin beträgt 60—65% d. Th. (0.21—0.23 g). Die Substanz stellt gelbe, feine biegsame Nadeln dar, die zu Büscheln vereinigt sind und unter Zersetzung bei 240° (k. Th.) schmelzen. Die Substanz

²⁾ R. Kuhn u. R. Ströbele, B. 70, 780 [1937].

ist löslich in Chloroform, Essigester und Benzol, auch in heißem Wasser, sie ist nur wenig löslich in Äther; aus Alkohol und Essigester krystallisiert sie besonders gut.

4.343 mg Sbst.: 1.84 mg H₂O, 8.755 mg CO₂. — 3.800 mg Sbst.: 0.368 ccm N (21°, 750 mm).

C₂₃H₂₄O₉N₄ (500.2). Ber. C 55.17, H 4.84, N 11.19.

Gef. ,, 54.98, ,, 4.74, ,, 11.10.

$[\alpha]_D^{18} = (-1.52^\circ \times 100) : (0.1680 \times 2) = -453^\circ \pm 10^\circ$ (Essigsäure-methylester),

$[\alpha]_D^{20} = (-1.00^\circ \times 100) : (0.0980 \times 2) = -510^\circ \pm 15^\circ$ (n/10-NaOH, für t = 0),

$[\alpha]_D^{20} = (-1.00^\circ \times 100) : (0.0732 \times 2) = -684^\circ \pm 20^\circ$ (dass. auf freies Flavin berechn.).

Spaltung durch Alkali: Eine Lösung, die 0.98 mg Triacetyl-9-d-arabinosido-6.7-dimethyl-flavin in 1 ccm n/16-Natronlauge enthielt, wurde im 2-dm-Rohr polarisiert.

t (Min.)...	0	30	60	90	120	180	240	420	1320
α_D	-1.00°	-0.84°	-0.745°	-0.66°	-0.59°	-0.475°	-0.39°	-0.25°	-0.13°

Die Lösung fluorescierte anfangs gar nicht, nahm aber im Laufe der Zeit gelbgrüne Fluoreszenz an.

9-d-Arabinosido-6.7-dimethyl-flavin.

100 mg der Triacetyl-Verbindung wurden in 10 ccm absol. Methanol (mit Mg entwässert) suspendiert und mit 10 ccm absol. Methanol, das bei 0° mit Ammoniakgas gesättigt war, versetzt. Dabei ging sofort aller Farbstoff mit tiefgelber Farbe in Lösung. Nach 1/2-stdg. Stehen bei 20° wurde in den Eisschrank gestellt, wo über Nacht das freie Flavinglucosid praktisch quantitativ in dunkelgelben flachen Prismen auskrystallisierte. Zur Analyse wurde aus Alkohol umkrystallisiert, bei 100° über P₂O₅ (1 mm) getrocknet und 1/2 Stde. an der Luft (18°) aufbewahrt, wonach das Monohydrat vorlag. Das wasserfreie Arabinosidoflavin ist äußerst hygroskopisch.

4.437 mg Sbst.: 2.06 mg H₂O, 8.45 mg CO₂. — 3.535 mg Sbst.: 0.435 ccm N (18°, 743 mm).

C₁₇H₁₈O₆N₄ + 1 H₂O (392.2). Ber. C 52.02, H 5.14, N 14.29.

Gef. ,, 51.94, ,, 5.19, ,, 14.11.

Die Substanz ist mit gelber Farbe und intensiv grüner Fluoreszenz löslich in Wasser, Alkohol, Essigester und Pyridin, unlöslich in Äther und Benzol.

Zur Bestimmung des Drehungsvermögens diente das Monohydrat:

$[\alpha]_D^{20} = (-1.61^\circ \times 100) : (0.192 \times 2) = -418^\circ \pm 5^\circ$ (Pyridin).

9-Triacetyl-l-arabinosido-6.7-dimethyl-flavin.

Dem optischen Antipoden entsprechend dargestellt; aus Alkohol feine gelbe Nadeln vom Schmp. 239° (k. Th.).

2.875 mg Sbst.: 1.29 mg H₂O, 5.75 mg CO₂. — 3.800 mg Sbst.: 0.368 ccm N (21°, 750 mm).

C₂₃H₂₄O₉N₄ (521.2). Ber. C 55.17, H 4.84, N 11.19.

Gef. ,, 54.81, ,, 5.05, ,, 11.10.

$[\alpha]_D^{18} = (+0.98^\circ \times 100) : (0.1170 \times 2) = +440^\circ \pm 10^\circ$ (Essigsäure-methylester),

$[\alpha]_D^{20} = (+0.59^\circ \times 100) : (0.0568 \times 2) = +519^\circ \pm 15^\circ$ (n/10-NaOH, für t = 0),

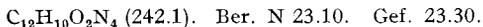
$[\alpha]_D^{20} = (+0.59^\circ \times 100) : (0.0424 \times 2) = +694^\circ \pm 20^\circ$ (n/10-NaOH, für t = 0, auf freies Flavin berechn.),

$[\alpha]_D^{20} = (+0.20^\circ \times 100) : (0.0284 \times 2) = +352^\circ \pm 15^\circ$ (n/10-NaOH + 1 Teil ges.

Borax),

$[\alpha]_D^{20} = (+0.20^\circ \times 100) : (0.0212 \times 2) = +471^\circ \pm 20^\circ$ (dass. auf freies Flavin berechn.).

Saure Hydrolyse. 89.6 mg Triacetyl-9-*d*-arabinosido-6.7-dimethylflavin wurden mit 40 ccm $n/_{10}$ -Salzsäure 4 Stdn. auf 100° erhitzt. Dabei schieden sich 42.7 mg (ber. 43.3 mg) 6.7-Dimethyl-alloxazin aus, die zur Analyse aus Ameisensäure (etwa 50 ccm) umkrystallisiert und 8 Stdn. bei 135°/1 mm getrocknet wurden.



Das salzsaure Filtrat, im Vak. auf 11 ccm eingengt, zeigte $[\alpha]_D^{20} = (+0.48^\circ \times 100) : (0.24 \times 2) = +100^\circ \pm 4^\circ$ auf freie Pentose berechnet, während für *l*-Arabinose $[\alpha]_D^{20} = +105^\circ$ ist.

9-*l*-Arabinosido-6.7-dimethylflavin.

In gleicher Weise wie die *d*-Form aus der Triacetyl-Verbindung durch Verseifung mit methylalkoholischem Ammoniak.

3.014 mg Sbst.: 0.369 ccm N (20°, 749 mm).



racem. Triacetyl-*d,l*-arabinosido-6.7-dimethylflavin.

Schmp. der *l*-Form: 238°, Schmp. der *d*-Form: 240°; Krystallform: gelbe, feine biegsame Nadeln. — Schmp. des Racemates: 260° (k. Th.); Krystallform: feine, glänzende Blättchen.

9-*d*-Ribosido-6.7-dimethylflavin (VII).

Die katalytische Hydrierung des Triacetyl-*d*-ribose-2-nitro-4.5-dimethyl-anilids (0.30 g) und die anschließende Kondensation mit Alloxan-Borsäure wurden nach der für die *d*-Arabinose-Verbindung genau angegebenen Vorschrift vorgenommen. Das erhaltene 9-Triacetyl-*d*-ribosido-6.7-dimethylflavin schied sich aus warmem Benzol beim Erkalten in gelben Flocken aus. Die Verseifung mit absol. methylalkoholischem Ammoniak lieferte das Flavin-ribosid in orangegelben abgeschragten Prismen (Abb. 3), die noch aus absol. Methanol umkrystallisiert wurden.

Das 9-*d*-Ribosido-6.7-dimethylflavin löst sich mit gelber Farbe und intensiv grüner Fluoreszenz in Wasser, Alkohol, Pyridin und Essigester, nur ganz wenig in Chloroform, dem es durch Schütteln mit Wasser sofort quantitativ entzogen wird. In Äther, Hexan und Benzol ist es unlöslich. $n/_{10}$ -Natronlauge löst mit dunkelgelber Farbe (nicht fluoreszierend), beim längeren Stehen der alkalischen Lösung tritt gelbgrüne Fluoreszenz auf (Zersetzung). Beim Neutralisieren der frisch bereiteten Lösung in verd. Alkali bildet sich das Flavinribosid aus seinem Natriumsalz zurück; gibt man überschüssige Säure zu, so erfolgt Hydrolyse in *d*-Ribose und 6.7-Dimethyl-alloxazin.

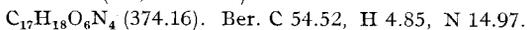
$$[\alpha]_D^{20} = (+0.27^\circ \times 100) : (0.058 \times 1) = +470^\circ \pm 15^\circ \text{ (Pyridin).}$$

Zum Vergleich Lactoflavin in Pyridin:

$$[\alpha]_D^{20} = (-0.02^\circ \times 100) : (0.032 \times 2) = -30^\circ \pm 15^\circ.$$

Wie die C-H-Bestimmung zeigt, enthält die Substanz trotz Trocknung bei 135° noch ungefähr $1/4$ Mol. Wasser.

2.338 mg Sbst.: 1.06 mg H₂O, 4.605 mg CO₂. — 2.195 mg Sbst. (4 Stdn. bei 135°/1 mm getrocknet): 0.287 ccm N (17°, 750 mm).



Gef. „, 53.77, „, 5.07, „, 15.19.