

230. Richard Kuhn, Hellmuth Vetter und Hans Werner Rzeppa: Zur Spezifität des Lactoflavins; Ersatz der Methylgruppen durch den Tetramethylen- und Trimethylen-Ring.

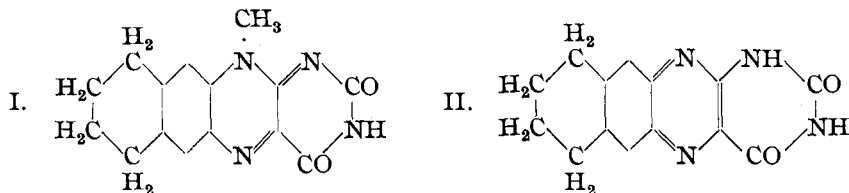
[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizin. Forschung, Heidelberg, Institut für Chemie.]

(Eingegangen am 21. April 1937.)

Während die Umstellung der Methylgruppen im Lactoflavin nach 5.7 und 6.8 die biologische Wirksamkeit verschwinden läßt¹⁾, bleibt, wie im folgenden gezeigt wird, die Fähigkeit zur Bildung einer katalytisch wirksamen Eiweiß-Verbindung noch erhalten, wenn man die 6.7-ständigen Methylgruppen durch den Tetramethylen- oder Trimethylen-Ring ersetzt.

Die Anregung zur Synthese solcher Flavine entstammt Beobachtungen von P. Kränzlein²⁾, der nach dem Vorbild des Lactoflavins *o*-ständige Methylgruppen in verschiedene organische Farbstoffe eingeführt hat und feststellte, daß die dadurch bedingten Effekte³⁾ den durch Angliederung von Trimethylen- und Tetramethylen-Ringen erzielbaren vergleichbar sind.

Das 6.7-Tetramethylen-9-methyl-iso-alloxazin (I) wurde nach dem mit K. Reinemund⁴⁾ ausgearbeiteten Verfahren zur Synthese des Lumi-lactoflavins erhalten, das 6.7-Tetramethylen-alloxazin (II) nach O. Kühling⁵⁾ aus dem 2.3-Diamino-5.6.7.8-tetrahydro-naphthalin.



Das 6.7-Tetramethylen-9-*l*-araboflavin (III) und 6.7-Tetramethylen-9-*d*-riboflavin (IV) gewannen wir ebenso wie das 6.7-Trimethylen-9-*l*-araboflavin (V) und das 6.7-Trimethylen-9-*d*-riboflavin (VI) über die entsprechend substituierten *o*-Nitranilin-*N*-glucoside⁶⁾.

Die *l*-Araboflavine III und V konnten sehr schön krystallisiert erhalten werden, die *d*-Riboflavine IV und VI leider nicht, obwohl zur Darstellung auch die Umsetzung der *o*-Dinitro-Verbindungen⁷⁾ mit *d*-Ribamin vorgenommen wurde und die Zwischenprodukte gut krystallisierten.

1) R. Kuhn, P. Desnuelle u. F. Weygand, B. **70**, 1293 [1937].

2) Dissertat., Universität Würzburg 1937. Hrn. Direktor Dr. G. Kränzlein, I.-G. Farbenindustrie A.-G., Höchst a. M., verdanken wir die als Ausgangsmaterial benutzten Nitro-amino-Derivate des Tetralins und Hydrindens.

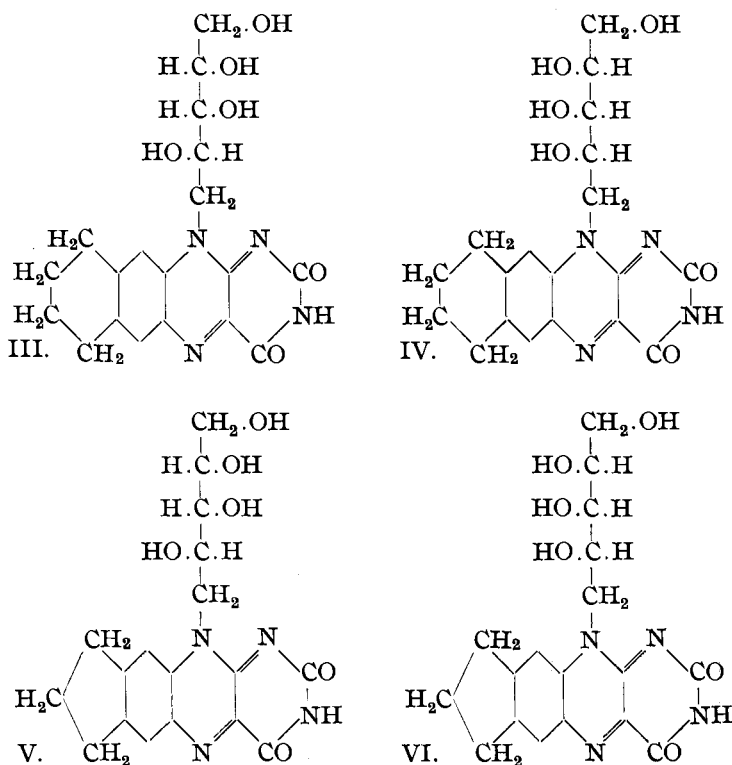
3) Auch die entgiftende Wirkung der 6.7-ständigen Methylgruppen, die R. Kuhn u. P. Boulanger, Ztschr. physiol. Chem. **241**, 233 [1936], an den Flavinen fanden, ist von P. Kränzlein noch in vielen weiteren Beispielen aus der Acridinreihe u. a. festgestellt worden. 4) R. Kuhn u. K. Reinemund, B. **67**, 1932 [1934].

5) B. **24**, 2363 [1891].

6) R. Kuhn u. R. Ströbele, B. **70**, 773 [1937].

7) Über 2.3-Dinitro-5.6.7.8-tetrahydro-naphthalin und 5.6-Dinitro-hydrindens vergl. R. Kuhn, H. Vetter u. P. Desnuelle, B. **70**, 1314 [1937].

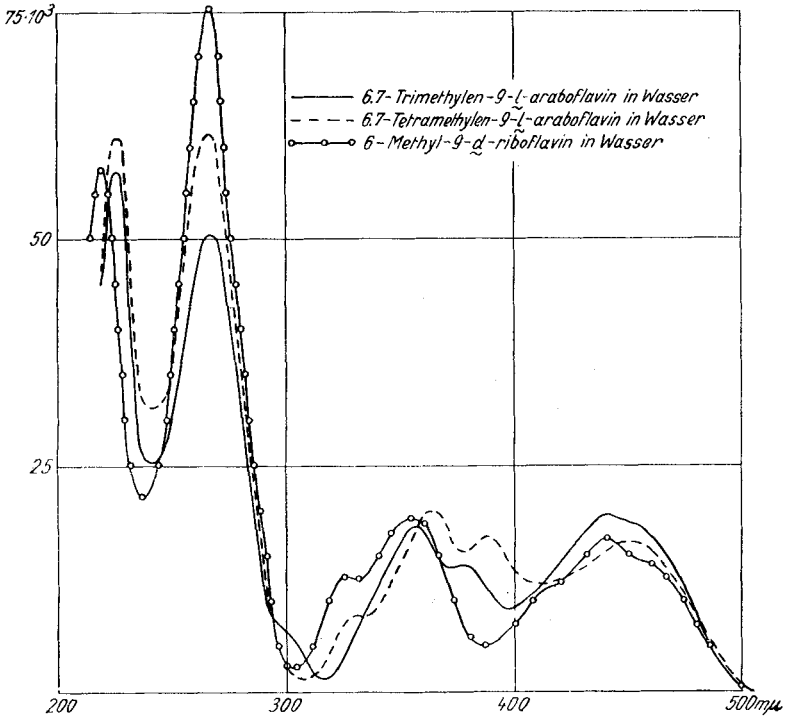
Die 6,7-Tetramethylen-flavine fluorescieren in wäbr. Lösung olive-gelb, die 6,7-Trimethylen-flavine grün. Die Absorptionsspektren sind in Abbild. 1 dargestellt.



Der Einfluß, den Substituenten am Benzolkern auf die Farbe des Fluorescenzlichtes und auf die Lage der Absorptionsbanden der Flavine ausüben, ist aus der folgenden Zusammenstellung ersichtlich. Die Zahlen sind unabhängig davon, ob sich in 9-Stellung eine Methylgruppe oder eine *d*-Ribityl- bzw. *l*-Arabityl-Kette befindet.

Substituenten am Benzolkern	Lit.	Lage der Haupt-Maxima in mμ				Fluorescenz
		1.	2.	3.	4.	
Keine	8)	440	335	268	—	blaugrün
6,7-Trimethylen ...	9)	440	357	267	226	grün
5,7-Dimethyl	11)	~	392	266	222	hellgrün
6-Methyl	9)	440	356	267	226	grüngelb
6,7-Dimethyl	10)	445	(365)	270	221	grüngelb
6,7-Tetramethylen .	9)	450	363	266	226	olive-gelb
6,8-Dimethyl	11)	450	372	270	222	gelb

Die Lagen der Nebenbanden und die Absorptionsstärken (Höhen) sind den Abbildungen^{8) 9) 10) 11)} zu entnehmen. Die spiegelbildliche Beziehung zwischen Absorptions- und Fluoreszenzbanden, die bei den Diphenylpolyenen festgestellt wurde¹²⁾, ist auch hier schon mit freiem Auge wahr-



Abbild. 1.

Abszissen: Wellenlängen in μ . Ordinaten: $\alpha = \frac{2.30}{c \times d} \cdot \log \frac{J_0}{J}$

$d = 0.114$ cm, für alle Messungen.

$c = 2.52 \times 10^{-4}$ Mol/Liter

$c = 2.71 \times 10^{-4}$ Mol/Liter

$c = 2.99 \times 10^{-4}$ Mol/Liter

nehmbar, obwohl die maximalen Verschiebungen der Banden nur etwa 10μ betragen. Dem kurzwelligsten 1. Hauptmaximum der Absorption (440μ) entspricht ein schwach bläustichiges Grün, dem langwelligsten (450μ) ein stumpfes Gelb des Fluoreszenzlichtes.

⁸⁾ R. Kuhn u. F. Weygand, B. **67**, 1409 [1934].

⁹⁾ Diese Arbeit.

¹⁰⁾ R. Kuhn, P. György u. Th. Wagner-Jauregg, B. **66**, 1034 [1933]; R. Kuhn, H. Rudy u. Th. Wagner-Jauregg, B. **66**, 1950 [1933].

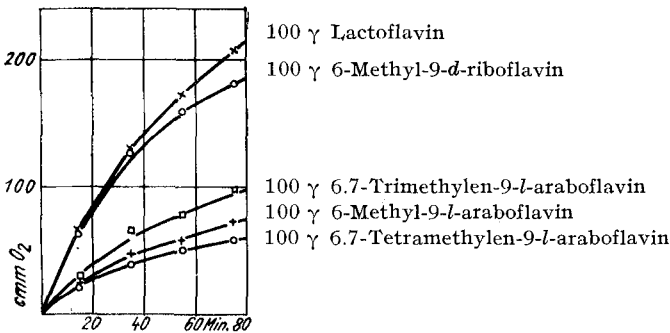
¹¹⁾ R. Kuhn, P. Desnuelle u. F. Weygand, B. **70**, 1293 [1937].

¹²⁾ K. W. Hausser, R. Kuhn u. Mitarbeiter, Ztschr. physik. Chem. (B) **29**, 363 [1935].

Neben die Eigenschaften von 6.7-Tetramethylen-(III) und 6.7-Trimethylen-9-*l*-araboflavin (V) stellen wir diejenigen von 6-Methyl-9-*l*-araboflavin und von 6-Methyl-9-*d*-riboflavin¹³⁾:

Flavin	Schmp. (Zers.)	$[\alpha]_D^{20}$ in 0.1-n. NaOH	$[\alpha]_D^{19}$ in 0.05-n. NaOH ¹⁴⁾ + ges. $\frac{1}{2}$ Borax
6.7-Tetramethylen-9- <i>l</i> -arabo-	286°	-45.8° (c = 0.27)	+320° (c = 0.14)
6.7-Trimethylen-9- <i>l</i> -arabo...	300°	-61.0° (c = 0.27)	+326° (c = 0.14)
6-Methyl-9- <i>l</i> -arabo-	276°	-67.5° (c = 0.25)	+277° (c = 0.13)
6-Methyl-9- <i>d</i> -ribo-	277°	-62.5° (c = 0.21)	+275° (c = 0.11)

Die Co-Ferment-Wirkung der 4 angeführten Farbstoffe (Abbild. 2) läßt einen nur geringen Unterschied des 6.7-Tetramethylen- und 6.7-Trimethylen-flavins gegenüber der 6-Methyl-Verbindung erkennen. Die drei *l*-Araboflavine sind jedoch erheblich weniger wirksam als das 6-Methyl-9-*d*-riboflavin, dessen katalytische Wirkung in Gegenwart des kolloiden Trägers derjenigen des Lactoflavins nahe kommt.



Abbild. 2.

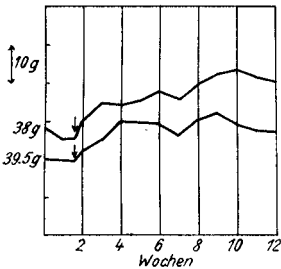
Co-Ferment-Wirkung: 0.5 ccm Zwischenferment, 0.5 ccm Co-Ferment aus Pferdeblut, 1 ccm m_{10} -Neuberg-Ester, 0.2 ccm $m_{\frac{1}{2}}$ -Phosphat pH 7, Anhang: 0.5 ccm Träger und 0.2 ccm Flavin (1 ccm = 0.50 mg). Einsatz: 0.2 ccm 2 *n*-KOH; O₂, 37°. Nach Abzug der Leerwerte für Träger ohne Flavin.

In bezug auf die Wachstumswirkung fanden wir das 6-Methyl-9-*d*-riboflavin mit 10 γ je Tag und Ratte ungenügend (alle Tiere starben nach 2 bis 6 Wochen), mit 20 γ wurde jedoch die Einheit (Gewichtszunahme von

¹³⁾ Diesen Farbstoff haben bereits P. Karrer u. F. M. Strong, Hely. chim. Acta 18, 1343 [1935], beschrieben, die Schmp. 282°, $[\alpha]_D^{20}$: -84.6° (0.05-n. NaOH) und nach Versuchen H. v. Eulers gute Wachstumswirkung mit 10-20 γ je Tag und Ratte angeben.

¹⁴⁾ +1 Tropfen konz. NaOH, um die durch die Pufferwirkung des Boraxes entstandene schwache Fluoreszenz der alkalischen Flavinlösung wieder ganz zum Verschwinden zu bringen.

40 g in 30 Tagen) nahezu erreicht. Mit 20 γ 6.7-Tetramethylen- und 6.7-Trimethylen-9-*l*-araboflavin blieben die Tiere bei nur geringem Anstieg des Gewichts (2 Beispiele in Abbild. 3) über 10 Wochen am Leben, während sie mit 10 γ nach 2—5 Wochen gestorben waren.



Abbild. 3.

Bei \downarrow Zugabe von 20 γ 6.7-Tetramethylen-9-*l*-araboflavin pro Tag und Ratte.

Das Ergebnis der Tierversuche mit den drei *l*-Arabo-flavinen erinnert an zahlreiche Befunde mit dem 6.7-Dimethyl-9-*l*-araboflavin, das auch im katalytischen Test¹⁵⁾ ganz ähnliche Wirksamkeit zeigt.

Die Unwirksamkeit von 6.8-Dimethyl-9-*d*-riboflavin¹⁾, sowohl im katalytischen wie im Wachstumstest, ist in Anbetracht der starken Aktivität des 6-Methyl-9-*d*-riboflavins erstaunlich. Die 6.8-Dimethyl-Verbindung ist nicht deshalb unwirksam, weil die 7-ständige Methylgruppe des Naturprodukts fehlt, sondern

weil die 8-ständige Methylgruppe die noch sehr hohe Wirksamkeit der 6-Methyl-Verbindung vernichtet.

Beschreibung der Versuche.

6.7-Tetramethylen-9-methyl-isoalloxazin.

a) 2-Nitro-3-toluolsulfamino-5.6.7.8-tetrahydro-naphthalin.

Als Ausgangsprodukt dient 2-Nitro-3-amino-5.6.7.8-tetrahydro-naphthalin. Zur Reinigung werden 100 g in 500 ccm Benzol heiß gelöst und chromatographisch an Aluminiumoxyd adsorbiert. Hierbei bleibt eine beträchtliche, dunkle Zone als oberste Schicht zurück, während die Hauptmenge mit orangegelber Farbe ins Filtrat wandert. Beim Einengen bilden sich rhombische Platten; Schmp. 125—126° (k. Th.). Nach Umkrystallisation aus siedendem Benzol wird die Farbe wohl etwas heller, Krystallhabitus und Schmp. bleiben jedoch unverändert. 28.8 g (0.15 Mol) Nitro-amino-tetrahydro-naphthalin werden mit 28.6 g (0.15 Mol) *p*-Toluol-sulfochlorid in 60 ccm trockenem Pyridin 6 Stdn. auf dem Dampfbade erhitzt. Die noch warme Lösung wird in 1 l Wasser eingegossen, wobei das ausfallende Öl bald erstarrt. Nach dem Verreiben wäscht man oftmals mit Wasser und krystallisiert aus 150 ccm Eisessig um; Gesamtausbeute 41.5 g (80.5%). Zur Reinigung wird noch 3-mal aus Eisessig umkrystallisiert. Man erhält citronengelbe, schräg zugespitzte, prismatische Nadeln, die bei 145.5—146.5° (k. Th.) schmelzen.

4.356 mg Sbst.: 9.430 mg CO₂, 2.055 mg H₂O. — 4.796 mg Sbst.: 0.346 ccm N (22°, 740 mm).

C₁₇H₁₈O₄N₂S (346.2). Ber. C 58.93, H 5.26, N 8.09.

Gef. „ 59.04, „ 5.28, „ 8.13.

b) 2-Nitro-3-*N*-methyl-toluolsulfamino-5.6.7.8-tetrahydro-naphthalin.

Eine Mischung von 5.4 g der Toluolsulfamino-Verbindung mit 50 ccm *n*-Kalilauge wird auf 60° erhitzt und innerhalb von 15 Min. por-

¹⁵⁾ R. Kuhn u. H. Rudy, B. 69, 2557 [1936].

tionsweise mit 17.5 ccm Dimethylsulfat versetzt. Beim Umschlag der rotgelben Farbe in milchig-hellgelb wird jeweils eine geringe Menge 20-proz. KOH zugegeben; außerdem wird darauf geachtet, daß die Reaktionstemperatur 50° nicht unterschreitet. Nach beendeter Umsetzung wird der Niederschlag abgesaugt und aus 500 ccm Methanol umkrystallisiert; Rohausbeute 4.6 g (82.0%); die gelbrote Mutterlauge enthält nicht-methyliertes Produkt (Schmp. 130—150°). Umkrystallisation des Rohprodukts aus Methanol und absol. Alkohol liefert schwach strohfarbene, kurze prismatische Nadeln. Schmp. 198° (k. Th.).

4.237 mg Sbst.: 9.340 mg CO₂, 2.190 mg H₂O. — 4.761 mg Sbst.: 0.338 ccm N (22°, 739 mm).

C₁₈H₂₀O₄N₂S (360.2). Ber. C 59.97, H 5.61, N 7.77.

Gef. „ 60.12, „ 5.78, „ 7.99.

c) 2-Nitro-3-methylamino-5.6.7.8-tetrahydro-naphthalin.

16 g *N*-Methyl-toluolsulfamino-Verbindung werden in einem Gemisch von 10 ccm Eisessig und 25 ccm konz. Schwefelsäure 1 Stde. auf dem Dampfbade erhitzt. Beim Eingießen der klaren dunkelbraunen Lösung in etwa 1 l kaltes Wasser fallen orangefarbene Flocken aus. Sie werden abgesaugt, mit Wasser säurefrei gewaschen und aus absol. Alkohol umkrystallisiert; Ausb. 8 g (86.5%). Bei nochmaliger Krystallisation aus Alkohol wird das Produkt etwas heller, der Schmp. bleibt jedoch unverändert bei 115.5° (k. Th.). Orangegelbe, verfilzte, lange Nadeln.

4.202 mg Sbst.: 9.860 mg CO₂, 2.575 mg H₂O.

C₁₁H₁₄O₂N₂ (206.1). Ber. C 64.05, H 6.84. Gef. C 64.00, H 6.86.

d) 2-Amino-3-methylamino-5.6.7.8-tetrahydro-naphthalin-dichlorhydrat.

7 g Nitro-Verbindung werden in eine Lösung von 37.5 g Zinnchlorür (SnCl₂·2H₂O) in 90 ccm konz. HCl eingetragen, wobei unter Selbsterwärmung und HCl-Entwicklung die Substanz in Lösung geht. Nach kurzem Erwärmen auf dem Dampfbade wird die entfärbte warme Lösung in eine eisgekühlte Lösung von 80 g NaOH in 150 ccm Wasser gegossen und das flockig ausfallende Diamin mit Äther ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen mit Natriumsulfat wird auf 100 ccm eingengt; beim Einleiten von Chlorwasserstoff fällt das Dichlorhydrat flockig aus; Ausbeute 7.95 g (94%). Umkrystallisation aus HCl-haltigem Alkohol liefert Flocken, die aus sternförmig und verfilzt angeordneten Nadel-Aggregaten bestehen; Schmp. 184—186° (schnell erhitzt; unter Zers.).

4.163 mg Sbst.: 8.085 mg CO₂, 2.785 mg H₂O.

C₁₁H₁₆N₂, 2 HCl (249). Ber. C 53.01, H 7.27. Gef. C 52.96, H 7.49.

Die freie Base sublimiert bei 1—2 mm und 110° (Badtemp.) in farblosen langen Nadeln und Nadelbüscheln; Schmp. 83° (k. Th.). Eine alkoholische Lösung der freien Base wird auf Zusatz von stark verd. Eisenchlorid für kurze Zeit grün, dann grünblau, langsam in olive übergehend. Die angesäuerte alkohol. Lösung der Base färbt sich mit FeCl₃ über gelb zu rot, genau wie eine alkohol. Lösung des Dichlorhydrats.

e) 6.7-Tetramethylen-9-methyl-isoalloxazin (I).

Eine Lösung von 7 g Dichlorhydrat in 25 ccm heißem Wasser wird mit einer Lösung von 6.7 g Alloxan-tetrahydrat (10% Überschuß) 15 Min. auf 50—60° erwärmt. Beim Zusammengießen färbt sich die Flüssigkeit sofort gelbbraun, um allmählich immer dunkler zu werden. Gleich zu Beginn fällt ein brauner Niederschlag aus, der nach etwa 3 Min. plötzlich gelbe Farbe annimmt. Nach 1 Stde. wird abgesaugt, mit genügend Wasser gewaschen und auf dem Dampfbade getrocknet; Ausb. 6.35 g (80%). Da die Krystallisation aus Ameisensäure zu dunklen Produkten führt, wird aus Ameisensäure-Methanol (1:1) umkrystallisiert. Man erhält gelbe verfilzte Nadeln, die sich beim Trocknen schwach orange gelb färben; Schmp. über 360° (ab 345° Zers.). Zur Analyse wird 6 Stdn. bei 2 mm und 140° getrocknet.

4.118 mg Sbst.: 9.610 mg CO₂, 1.885 mg H₂O.

C₁₆H₁₄O₂N₄ (282.1). Ber. C 63.81, H 5.00. Gef. C 63.64, H 5.12.

2.3-Diamino-5.6.7.8-tetrahydro-naphthalin-dichlorhydrat.

3 g 2-Nitro-3-amino-5.6.7.8-tetrahydro-naphthalin werden in eine Lösung von 18.5 g Zinnchlorür (SnCl₂·2H₂O) in 37 ccm konz. Salzsäure eingetragen. Die beim Erwärmen zu einem farblosen Brei erstarrende Masse wird in eine eisgekühlte Lösung von 50 g NaOH in 80 ccm Wasser eingeleitet. Nach Zugabe von Eis wird mit etwa 400 ccm Äther ausgeschüttelt (das Diamin ist in Äther nicht sehr gut löslich), die ätherische Lösung wird etwas eingengt und mit Chlorwasserstoff gesättigt, wobei das Dichlorhydrat in farblosen Flocken ausfällt. Ausb. 2.2 g (60%). Zur Reinigung wird aus Alkohol unter Zusatz von wenig Wasser umkrystallisiert. Vielgestaltige Blättchen, z. Tl. mit wohl ausgebildeten Flächen, die in polarisiertem Licht schwach schiefe Auslöschung zeigen; Schmp. 302° (schnell erhitzt, unter Zers. und Braunfärbung).

3.189 mg Sbst.: 0.331 ccm N (22°, 754 mm).

C₁₀H₁₄N₂, 2 HCl (235). Ber. N 11.92. Gef. N 11.92.

Die freie Base sublimiert bei 1—2 mm und 120° (Badtemp.) in farblosen, langen Spießen; Schmp. 134.5° (k. Th.). Die alkohol. Lösung gibt mit sehr verd. Eisenchlorid-Lösung eine beständige Blaufärbung, während sich das Dichlorhydrat auf Zugabe von Eisenchlorid an der Eintropfstelle zunächst grün, dann sofort gelbbraun färbt.

6.7-Tetramethylen-alloxazin (II).

1.5 g Dichlorhydrat werden mit 1.5 g Alloxan-tetrahydrat in 10 ccm Wasser 15 Min. auf 50—60° erwärmt. Es fällt ein gelber Niederschlag, der 2-mal aus Eisessig umkrystallisiert wird. Das gelbe Krystallpulver schmilzt über 360°; Ausb. 1.6 g (93.5%). Zur Analyse wird mehrere Stdn. bei 1—2 mm und 140° getrocknet.

4.208 mg Sbst.: 9.645 mg CO₂, 4.68 mg H₂O. — 2.070 mg Sbst.: 0.376 ccm N (23°, 754 mm).

C₁₄H₁₂O₂N₄ (268.1). Ber. C 62.69, H 4.52, N 20.90.

Gef. „ 62.51, „ 4.68, „ 20.78.

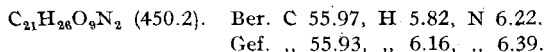
6.7-Tetramethylen-9-*l*-araboflavin.a) 2-Nitro-3-amino-5.6.7.8-tetrahydro-naphthalin-*N-l*-arabinosid.

3.8 g 2-Nitro-3-amino-5.6.7.8-tetrahydro-naphthalin werden mit 3 g *l*-Arabinose (molare Mengen) unter Zusatz von 0.3 g Ammoniumchlorid $\frac{5}{4}$ Stdn. in 100 ccm absol. Alkohol zum Sieden erhitzt. Die gelbrote Lösung wird im Vak. eingedampft, der Rückstand in 100 ccm Benzol heiß gelöst und chromatographisch an Aluminiumoxyd adsorbiert. Beim Entwickeln mit Benzol wandert unveränderte Nitro-amino-Verbindung ins Filtrat, das Arabinosid bleibt als oberste orangefelbe Zone adsorbiert. Nach der Elution mit Pyridin-Methanol-Wasser (1:2:1) wird das Lösungsmittel im Vak. völlig abgedampft; der orangefelbe sirupöse Rückstand wird aus 50 ccm Alkohol umkrystallisiert. Das in goldgelben verfilzten Nadeln krystallisierende Arabinosid besitzt keinen scharfen Schmp. Die Ausbeute an krystallisiertem Produkt beträgt 1.0 g, die Mutterlauge enthält weitere 2 g.

Zur Charakterisierung wird ein Teil des Arabinosids mit Pyridin-Eisessig acetyliert (15-stdg. Einwirkung bei Raumtemp. und $\frac{1}{4}$ -stdg. Erhitzen). Nach der Entfernung der Lösungsmittel wird 3-mal aus Alkohol umkrystallisiert. Das Triacetyl-2-nitro-3-amino-5.6.7.8-tetrahydro-naphthalin-*N-l*-arabinosid krystallisiert in gelben, kurzen Nadeln, welche bei 217° (k. Th.) schmelzen.

$$[\alpha]_D^{21} = (0.652 \times 100) : (0.30 \times 2) = +108.6^\circ \pm 1.5^\circ \text{ (Methylacetat).}$$

4.035 mg Sbst.: 8.275 mg CO₂, 2.22 mg H₂O. — 5.848 mg Sbst.: 0.328 ccm N (24°, 753 mm).

b) 6.7-Tetramethylen-9-*l*-araboflavin-tetracetat.

950 mg krystallisiertes Arabinosid werden in einer Mischung von 7.4 ccm 0.4-*n. prim.* Borat, 195 ccm Alkohol und 47.5 ccm Wasser unter Zusatz von 5 g 1-proz. Pd-Katalysator⁶⁾ 7 Stdn. bei 80° unter einem H₂-Druck von 25 Atm. geschüttelt. Die schwach gelbliche Lösung wird zentrifugiert, im Vak. zur Trockne gedampft und in etwa 15 ccm Eisessig gelöst. Bei Zugabe einer Mischung von 0.7 g Alloxan und 0.7 g Borsäure in 25 ccm Eisessig tritt sofort Dunkelfärbung ein. Nach 12 Stdn. wird der Eisessig abgedampft, der Rückstand unter Schütteln in wenig verd. Natronlauge gelöst, mit Wasser verdünnt und mit Eisessig schwach angesäuert. Die nach 3 Tagen bei 0° ausfallenden gelben Nadeln von 6.7-Tetramethylenalloxazin werden abgetrennt; zur völligen Entfernung des Alloxazins wird die essigsaurer Lösung mehrere Stdn. mit Chloroform extrahiert. Da das Flavin noch Stoffe enthält, welche die Krystallisation störend beeinflussen, wird eingeeengt und der Rückstand (0.58 g) mit Pyridin-Essigsäureanhydrid acetyliert, unter Entfernung des in Pyridin unlöslichen Anteils. Nach der Acetylierung (15 Stdn. bei Raumtemp. und $\frac{1}{4}$ Stde. bei 100°) werden die Lösungsmittel abgedampft; der Rückstand wird in Chloroform gelöst und nach Entfernung wasserlöslicher Begleitsubstanzen chromatographisch an Aluminiumoxyd adsorbiert. Beim Entwickeln mit Chloroform wandert das Acetyl-flavin ins Filtrat, dunkle Nebenprodukte werden

zurückgehalten. Der nach dem Abdampfen des Chloroforms hinterbleibende Rückstand bildet nach 2-maliger Umkrystallisation aus 15-proz. Alkohol orangegelbe, sternförmig angeordnete Krystalle, die bei 243° unter Dunkel-färbung schmelzen.

3.855 mg Sbst.: 7.960 mg CO₂, 1.855 mg H₂O. — 2.552 mg Sbst.: 0.217 ccm N (21°, 756 mm).

C₂₇H₃₀O₁₀N₄ (570.2). Ber. C 56.82, H 5.27, N 9.82.
Gef. „ 56.31, „ 5.38, „ 9.82.

6.7-Tetramethylen-9-*l*-araboflavin (über die Arabitylamino-Verbindung).

a) 2-Nitro-3-[*l*-1'-arabitylamino]-5.6.7.8-tetrahydro-naphthalin.

1.6 g *l*-Arabinamin (aus 2 g Oxim)¹⁾ werden mit 1 g 2.3-Dinitro-5.6.7.8-tetrahydro-naphthalin²⁾ 6 Stdn. in 50 ccm Pyridin gekocht. Nach Entfernung des Pyridins wird mit 70 ccm Alkohol heiß digeriert und der Rückstand aus etwa 1 l Wasser und dann aus Eisessig umkrystallisiert. Das in orangefarbenen, sternförmig angeordneten Nadeln krystallisierende Produkt schmilzt bei 208—209°; Ausb. 0.625 g. Zur Analyse wird 6 Stdn. bei 1—2 mm und 100° getrocknet.

4.101 mg Sbst.: 8.26 mg CO₂, 2.51 mg H₂O. — 4.030 mg Sbst.: 0.304 ccm N (23°, 755 mm).

C₁₈H₂₂O₆N₂ (326.2). Ber. C 55.18, H 6.81, N 8.58.
Gef. „ 54.93, „ 6.85, „ 8.64.

b) 6.7-Tetramethylen-9-*l*-araboflavin.

550 mg Nitro-arabitylamino-Verbindung werden mit 200 mg PtO₂ in 62.5 ccm 80-proz. Alkohol mit Wasserstoff geschüttelt. wobei die Flüssigkeit nach 50 Min. entfärbt ist. Es wird vom Katalysator abfiltriert, mit Alkohol nachgewaschen und im Vak. zur Trockne gedampft (N₂-Atmosphäre). Die Kondensation zum Flavin mit 0.26 g Alloxan und 0.26 g Borsäure erfolgt nach der üblichen Methode. Der Eindampfrückstand der Eisessig-Lösung wird in wenig verd. Lauge aufgenommen und nach Entfernung ungelöster Anteile mit Essigsäure schwach angesäuert. Der bei 0° nach mehreren Tagen ausfallende Niederschlag wird mehrmals aus 2-n. Essigsäure, in welcher er ziemlich schwer löslich ist, umkrystallisiert. Die gelben, langen Nadeln schmelzen scharf bei 285—286° (k. Th.). Zur Analyse wird 3 Stdn. im Vak. bei 140° getrocknet.

2.385 mg Sbst.: 4.94 mg CO₂, 1.205 mg H₂O. — 1.752 mg Sbst.: 0.213 ccm N (21°, 751 mm).

C₁₈H₂₂O₆N₄ (402.2). Ber. C 56.69, H 5.52, N 13.93.
Gef. „ 56.49, „ 5.65, „ 13.95.

$[\alpha]_D^{19} = (-0.123 \times 1) : (0.002686 \times 1) = -45.8^\circ \pm 3^\circ$ (0.1-n. NaOH),

$[\alpha]_D^{19} = (+0.432 \times 1) : (0.001343 \times 1) = +320^\circ \pm 10^\circ$ (0.05-n. NaOH),

¹⁾/₂-ges. mit Borax + 1 Tropfen konz. NaOH).

6.7-Trimethylen-9-*l*-araboflavin (über das Arabinosid).

a) 6-Nitro-5-amino-hydrinden-*N-l*-arabinosid.

Nach 2-stdg. Kochen von 3 g *l*-Arabinose mit 3.6 g 6-Nitro-5-amino-hydrinden und 0.3 g Ammoniumchlorid in 100 ccm absol. Alkohol wird die klare Lösung eingedampft; der Rückstand wird in Benzol unter Zusatz von wenig Alkohol aufgenommen und chromatographisch an

Aluminiumoxyd adsorbiert. Aus dem Filtrat werden 2.4 g unverändertes Nitro-amino-hydrinden zurückgewonnen. Nach der Elution des orangegelben Kondensationsprodukts mit Pyridin-Gemisch wird das Pyridin im Vak. vollständig abgedampft und der Rückstand mit Alkohol angerieben. Im Verlaufe mehrerer Stunden findet hierbei die Umwandlung einer orangefarbenen, in Alkohol leicht löslichen Form des Arabinosids in hellgelbe, lange Nadeln statt. Ausb. 17—22%. Zur Charakterisierung wird mit Pyridin-Essigsäure-anhydrid acetyliert; die Reinigung des Reaktionsproduktes erfolgt durch 3-malige Umkrystallisation aus Alkohol. Die hierbei erhaltenen gelben Nadeln des Triacetyl-6-nitro-5-amino-hydrinden-*N-l*-arabinosids schmelzen bei 220—220.5°.

4.095 mg Sbst.: 8.23 mg CO₂, 2.06 mg H₂O. — 5.021 mg Sbst.: 0.293 ccm N (22° 744 mm).

C₂₀H₂₄O₉N₂ (436.2). Ber. C 55.02, H 5.55, N 6.42.
Gef. „ 54.81, „ 5.63, „ 6.61.

b) 6.7-Trimethylen-9-*l*-araboflavin.

1.0 g Arabinosid wird in einer Lösung von 8 ccm 0.4-*n*. prim. Borat, 390 ccm 96-proz. Alkohol und 102 ccm Wasser unter Zusatz von 5 g 1-proz. Pd-Katalysator 6 Stdn. bei 70—75° und 30 Atm. H₂-Druck geschüttelt. Nach dem Abdampfen der Lösungsmittel wird wie üblich mit 0.75 g Alloxan und 0.75 g Borsäure in Eisessig kondensiert. Die dunkle Lösung wird nach 16 Stdn. von wenig Ungelöstem befreit und zur Trockne gedampft. Der dunkelbraune Rückstand ist sehr leicht löslich in Wasser, erst nach mehrtägigem Stehen im Eisschrank bilden sich orangefarbene Nadeln. Zur Entfernung von geringen Mengen 6.7-Trimethylen-alloxazin wird der Niederschlag einige Stdn. mit Chloroform extrahiert und dann mehrmals aus 2-*n*. Essigsäure, anschließend aus Wasser umkrystallisiert. Die orangegelben Nadeln schmelzen bei 300° (k. Th., unter Zers.); Ausb. 145 mg. Zur Analyse wird 3 Stdn. bei 1—2 mm und 100° getrocknet.

3.733 mg Sbst.: 7.32 mg CO₂, 1.875 mg H₂O. — 3.180 mg Sbst.: 0.390 ccm N (23°, 740 mm).

C₁₆H₂₀O₈N₄+H₂O (406.2). Ber. C 53.18, H 5.47, N 13.79.
Gef. „ 53.48, „ 5.62, „ 13.77.

$[\alpha]_D^{25} = (-0.167^\circ \times 1) : (0.002726 \times 1) = -61^\circ \pm 4^\circ (0.1\text{-}n. \text{NaOH}),$
 $[\alpha]_D^{25} = (+0.444^\circ \times 1) : (0.001363 \times 1) = +326^\circ \pm 10^\circ (0.05\text{-}n. \text{NaOH}),$
 $\frac{1}{2}$ -ges. mit Borax + 1 Tropfen konz. NaOH).

6.7-Trimethylen-9-*l*-araboflavin-tetracetat.

Die Acetylierung erfolgt nach den für die Darstellung des Tetramethylen-araboflavin-acetats angegebenen Bedingungen durch Einwirkung von Pyridin-Acetanhydrid. Reinigung des Acetylierungs-Rohproduktes aus Chloroform-Lösung durch chromatographische Adsorption an Aluminiumoxyd und Krystallisation aus siedendem Wasser. Man gewinnt goldgelbe, mikrokristalline Kügelchen, die am Rand strahlig ausgebildet sind; der Schmp. liegt bei 200.5—201.5° (k. Th., Dunkelfärbung).

4.075 mg Sbst.: 8.395 mg CO₂, 1.905 mg H₂O. — 3.597 mg Sbst.: 0.317 ccm N (23°, 743 mm).

C₂₆H₂₈O₁₀N₄ (556.2). Ber. C 56.09, H 5.07, N 10.07.
Gef. „ 56.18, „ 5.23, „ 9.94.

2-Nitro-3[*d*-1'-ribitylamino]-5.6.7.8-tetrahydro-naphthalin.

1.28 g *d*-Ribamin (durch Hydrierung aus 1.6 g *d*-Ribose-oxim)¹⁾ werden 6 Stdn. mit 1.5 g 2.3-Dinitro-5.6.7.8-tetrahydro-naphthalin in 50 ccm Pyridin gekocht. Nach dem Eindampfen zur Trockne wird der tiefbraune Rückstand zunächst mit Äther digeriert, wobei dieser sich schwach gelb färbt, und dann mehrmals mit Äthylalkohol ausgekocht. Aus der roten alkoholischen Lösung fällt auf Zusatz von Äther ein brauner, flockiger Niederschlag, der sich mit Wasser ausschütteln läßt. Durch Einengen des wäßr. Extrakts und mehrmalige Krystallisation aus etwa 200 ccm Wasser erhält man orangegelbe, gefiederte Nadelbüschel, die bei 138—139° (k. Th.) schmelzen; Ausb. 0.45 g.

3.703 mg Sbst.: 7.530 mg CO₂, 2.280 mg H₂O. — 2.613 mg Sbst.: 0.196 ccm N (20°, 755 mm).

C₁₅H₂₂O₆N₂ (326.2). Ber. C 55.18, H 6.81, N 8.58.
Gef. „ 55.46, „ 6.89, „ 8.68.

6-Methyl-9-*d*-riboflavin.

2 g *d*-Ribose werden 2 Stdn. mit 2 g 3-Nitro-4-amino-toluol in 100 ccm absol. Alkohol gekocht. Nach dem Abdampfen des Alkohols im Vak. wird in Benzol aufgenommen und an Aluminiumoxyd chromatographisch adsorbiert. Beim Entwickeln mit Benzol wandert das nicht umgesetzte Nitro-amino-toluol ins Filtrat, während das 3-Nitro-4-amino-toluol-*N*-*d*-ribosid als oberste orangegelbe Zone adsorbiert bleibt. Nach der Elution mit Pyridin-Methanol-Wasser (2:2:1) wird zur Trockne gedampft; der Rückstand wiegt 2.2 g. Beim Anrühren mit Alkohol krystallisieren gelbe, zu Büscheln vereinigte Nadeln; Ausb. 500 mg. Aus der Mutterlauge werden nach Zusatz von viel Wasser und Extraktion mit Essigester und Äther weitere 100 mg krystallisiert gewonnen.

0.60 g krystallisiertes Ribosid werden 5 Stdn. in einer Lösung von 195 ccm Alkohol, 5 ccm 0.4-*n*.*prim*. Borat und 50 ccm Wasser unter Zusatz von 3 g 1-proz. Pd-Katalysator bei 80° und 25 Atm. H₂-Druck geschüttelt. Nach beendeter Reduktion wird die farblose Lösung vom Katalysator befreit und zur Trockne gedampft. Man löst in etwa 15 ccm Eisessig und gießt zu einer Mischung von 500 mg Alloxan + 500 mg Borsäure in 25 ccm Eisessig, wobei sofort Dunkelfärbung eintritt. Nach kurzem Erwärmen wird der Eisessig im Vak. abgedampft, der dunkle Rückstand wird in verd. Essigsäure aufgenommen. Da sich aus der schwach essigsauren Lösung auch nach mehrtägigem Stehenlassen im Eisschrank nur geringe Mengen orangegelbe Nadeln, vermischt mit schwach gelbem Produkt, abgeschieden haben, wird mit Wasser auf 100 ccm verdünnt und 2-mal 1½ Stdn. mit je 5 g Frankonit KL gerührt. Die Elution erfolgt durch 3-maliges Rühren mit Pyridin-Methanol-Wasser (1.5:4:2). Nach Entfernung des Pyridins, Einengen auf 5 ccm und mehrtägigem Kühlen auf 0° hat sich ein dunkler, mikrokrySTALLINER Niederschlag abgesetzt, der 2-mal aus wenig 2-*n*. Essigsäure umkrystallisiert wird. Goldgelbe, kurze Prismen, z. Tl. zu Klumpen vereinigt; Schmp. 276—277° (k. Th., unter Zers. und Dunkel-färbung). Die Mutterlauge scheidet nach mehreren Wochen größere Mengen Flavin ab, völlig frei von Alloxazin und Lumiflavin.

4.083 mg Sbst.: 8.005 mg CO₂, 1.855 mg H₂O. — 3.056 mg Sbst.: 0.425 ccm N (20°, 742 mm).

C₁₆H₁₈O₆N₄ (362.2). Ber. C 53.01, H 5.03, N 15.46.

Gef. „ 53.47, „ 5.08, „ 15.82.

$[\alpha]_D^{19} = (-0.1315^\circ \times 1) : (0.002111 \times 1) = -62.5^\circ \pm 4^\circ$ (0.1-n. NaOH),

$[\alpha]_D^{19} = (+0.29^\circ \times 1) : (0.00106 \times 1) = +275^\circ \pm 10^\circ$ (0.05-n. NaOH,
1/2-ges. mit Borax + 1 Tropfen konz. NaOH).

6-Methyl-9-*l*-araboflavin.

Die Darstellung des Arabinosids erfolgt durch 2-stdg. Kochen einer Lösung von 4 g *l*-Arabinose und 4 g 2-Nitro-*p*-toluidin in 200 ccm absol. Alkohol. Das chromatographisch gereinigte Rohprodukt wiegt 6 g; beim Anreiben mit Wasser wird die überschüss. Arabinose herausgelöst, der Rückstand (2 g) ist kristallisiert. Zur Hydrierung wird 1 g des Arabinosids in einer Lösung von 195 ccm Alkohol, 8 ccm 0.4-n. *prim.* Borat und 47 ccm Wasser unter Zusatz von 5 g 1-proz. Pd-Katalysator 7 Stdn. bei 70° und 25 Atm. H₂-Druck geschüttelt. Der farblose Eindampfrückstand der vom Katalysator befreiten Lösung wird in etwa 15 ccm Eisessig aufgenommen und zu einer Mischung von 0.7 g Alloxan + 0.7 g Borsäure in 30 ccm Eisessig gegeben. Nach 15 Stdn. wird die Eisessig-Lösung zur Trockne verdampft, der Rückstand wird mit sehr verd. Natronlauge geschüttelt. Nach Entfernung eines braunen voluminösen Niederschlags wird mit Eisessig schwach angesäuert, wobei ein gelbbrauner Niederschlag von 6(7)-Methylalloxazin ausfällt. Das Filtrat wird auf 30 ccm eingengt und auf 0° gekühlt. Bald scheidet sich ein orangefarbener, feinkristalliner Niederschlag ab, der nach 2 Tagen abgesaugt wird. Zur Entfernung von mitgerissenem Methylalloxazin wird 3 Tage mit Chloroform ausgezogen; der Rückstand (95 mg) wird mit absol. Alkohol fraktioniert extrahiert. Die ersten Extrakte werden verworfen, der Rückstand wird mehrmals aus etwa 10 ccm 2-n. Essigsäure umkristallisiert. Die langen, orangegelben Nadeln schmelzen bei 276° (k. Th., schnell erhitzt, unter Zers.). Zur Analyse wird bei 1—2 mm und 140° getrocknet.

4.070 mg Sbst.: 7.650 mg CO₂, 1.960 mg H₂O. — 2.821 mg Sbst.: 0.361 ccm N (22°, 745 mm). — 3.026 mg Sbst.: 0.393 ccm N (20°, 745 mm).

C₁₆H₁₈O₆N₄+H₂O (380.2). Ber. C 50.50, H 5.31, N 14.73.

Gef. „ 51.25, „ 5.39, „ 14.83.

$[\alpha]_D^{19} = (-0.168^\circ \times 1) : (0.002493 \times 1) = -67.5^\circ \pm 4^\circ$ (0.1-n. NaOH),

$[\alpha]_D^{19} = (+0.345^\circ \times 1) : (0.001247 \times 1) = +277^\circ \pm 10^\circ$ (0.05-n. NaOH,
1/2-ges. mit Borax + 1 Tropfen konz. NaOH).

6(7)-Methyl-alloxazin¹⁶⁾.

Der bei der Darstellung von 6-Methyl-9-*l*-araboflavin entstehende gelbbraune Niederschlag wird 3-mal aus siedendem Eisessig umkristallisiert. Man erhält citronengelbe Krystalldrüsen, die sich ab 335° unter Dunkelfärbung zersetzen.

4.097 mg Sbst.: 8.630 mg CO₂, 1.325 mg H₂O. — 1.927 mg Sbst.: 0.417 ccm N (24°, 758 mm).

C₁₁H₈O₂N₄ (228.1). Ber. C 57.87, H 3.55, N 24.55.

Gef. „ 57.45, „ 3.62, „ 24.24.

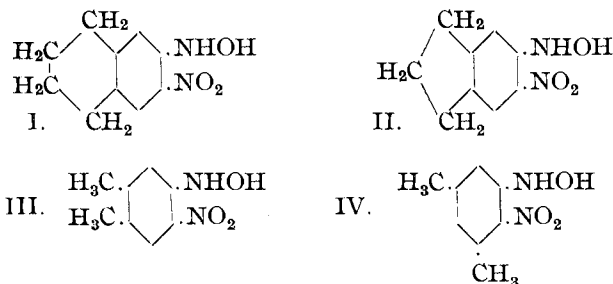
¹⁶⁾ O. Kühling, B. **24**, 2363 [1891].

Die chromatographische Adsorption aus Chloroform-Lösung an Aluminiumoxyd und Entwicklung mit Chloroform-Alkohol, Alkohol-Pyridin und Pyridin läßt keine Aufteilung in 2 Zonen erkennen. Methyl-alloxazin wird sehr stark von Aluminiumoxyd festgehalten, nach dem Entwickeln mit 150 ccm Pyridin ist die gelbe Zone nur 4—5 mm breit.

231. Richard Kuhn, Hellmuth Vetter und Pierre Desnuelle: Homologe des *o*-Nitro-phenyl-hydroxylamins.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizin. Forschung, Heidelberg, Institut für Chemie.]
(Eingegangen am 21. April 1937.)

Durch Reduktion von *o*-Dinitro-benzol und von *o*-Nitro-nitroso-benzol mit Ascorbinsäure gelang es, das in Lösung schon vielfach beobachtete *o*-Nitro-phenyl-hydroxylamin, eine äußerst empfindliche Substanz, krystallisiert zu gewinnen¹⁾. Auf diesem Wege sind jetzt eine Anzahl von Homologen dargestellt worden, nämlich das 3-Nitro-2-hydroxylamino-5.6.7.8-tetrahydro-naphthalin (I), das 6-Nitro-5-hydroxylamino-hydrinden (II), das 3.4-Dimethyl-6-nitro-phenyl-hydroxylamin (III) und das 3.5-Dimethyl-6-nitro-phenyl-hydroxylamin (IV).



Als Ausgangsmaterial dient die *o*-Nitro-amino-Verbindungen, die nach E. Bamberger²⁾ mit Caroscher Säure zu den *o*-Nitro-nitroso-Verbindungen oxydiert wurden. Die Darstellung des Nitro-hydroxylamino-hydrindens erfolgte durch Reduktion von 5.6-Dinitro-hydrinden mit Ascorbinsäure; das 5.6-Dinitro-hydrinden war durch Oxydation der entsprechenden Nitro-nitroso-Verbindung erhalten worden. Die Anwendung von 2.3-Dinitro-5.6.7.8-tetrahydro-naphthalin und von 1.2-Dinitro-4.5-dimethylbenzol an Stelle der entsprechenden Nitro-nitroso-Verbindungen ließ die Nitro-hydroxylamin-Produkte in gleicher guter Ausbeute gewinnen. Das 3.5-Dimethyl-6-nitro-phenyl-hydroxylamin (IV) entstand aus dem unsymmetrischen 1.3-Dimethyl-4.5-dinitro-benzol (V), aber nur in sehr schlechter Ausbeute. Seine Konstitution ergibt sich daraus, daß dieselbe Verbindung in sehr viel besserer Ausbeute aus 1.3-Dimethyl-4-nitro-5-

¹⁾ R. Kuhn u. F. Weygand, B. **69**, 1969 [1936].

²⁾ E. Bamberger u. E. Hübner, B. **36**, 3803 [1903].