

75. Hans Lettré und Marie-Elisabeth Fernholz: Darstellung einiger Flavine.

[Aus d. Chem. Abteil. d. Allgem. Instituts gegen d. Geschwulstkrankheiten im Rudolf-Virchow-Krankenhaus Berlin.]

(Eingegangen am 9. April 1940.)

Die cancerogenen Kohlenwasserstoffe zeigen im Vergleich zu nicht cancerogenen aromatischen Kohlenwasserstoffen eine außerordentlich starke Reaktionsfähigkeit den verschiedensten Agenzien gegenüber. So vermögen sie nach Fieser¹⁾ mit Diazoniumverbindungen zu kuppeln, sie werden leicht nitriert und durch Umsetzung mit N-Methyl-formanilid²⁾ in den Aldehyd übergeführt. Von besonderem Interesse erscheint ihre leichte Oxydierbarkeit durch Bleitetraacetat¹⁾ und nach Befunden aus dem Windausschen Laboratorium durch Benzopersäure³⁾. Bei der Einwirkung von Sauerstoff im Licht bilden sie definierte Peroxyde, denen unter Umständen eine Bedeutung für ihre cancerogene Wirkung zukommt⁴⁾. Diese Reaktionsfähigkeit in vitro macht ihre Einwirkungsmöglichkeit auf die normale Zelle verständlicher. Nach den strukturellen Beziehungen zwischen Methylcholanthren und den Sterinen hat man angenommen, daß cancerogene Substanzen in einer Fehlleitung des normalen Sterin- und Steroid-Stoffwechsels im Organismus entstehen können. Butenandt⁵⁾ hat die cancerogenen Stoffe als „entartete“ Biokatalysatoren angesprochen; vielleicht sind sie ihrer Wirkung nach Redoxkatalysatoren. Eine andere charakteristische Eigenschaft der cancerogenen Kohlenwasserstoffe ist entsprechend ihrer Zusammensetzung die mangelnde Wasserlöslichkeit und einseitige Lipoidlöslichkeit. Eine Einführung von hydrophilen Substituenten führt meistens zum Verlust der cancerogenen Wirkung⁶⁾: Beispielsweise ist Benzopyren wirksam, Oxy- und Aminobenzopyren sind unwirksam; Methylcholanthren ist wirksam, Oxymethylcholanthren unwirksam. Ausnahmen von dieser Regel machen das 9-Amino-1.2.5.6-dibenzo-anthracen und die Maleinsäureaddukte der Methyl-1.2-benzo-anthracene, die aber möglicherweise im Organismus in ihre Komponenten zerfallen. Vielleicht schafft die einseitige Lipoidlöslichkeit und damit verknüpft die geringe Ausscheidungsgeschwindigkeit die Möglichkeit zu einer ausreichend langen Einwirkung auf die normale Zelle und weiterhin die Möglichkeit zum Eindringen in für die Umwandlung wichtige Zellelemente. Die physiologischen Redoxkatalysatoren, Glutathion, Codehydrase, Ascorbinsäure, Lactoflavinphosphorsäure und die Häminfermente sind, zumal in ihrer Bindung an Apofermente, rein hydrophile Substanzen. Man kann die Frage stellen, ob diese Biokatalysatoren nicht auch „entarten“ können, wenn man durch geeignete Substitution ihre hydrophilen Eigenschaften zu hydrophoben verschiebt, sie in einseitig lipoidlösliche Stoffe überführt. Um mit der Bearbeitung dieser Frage zu beginnen, haben wir einseitig lipoidlösliche Flavine und Derivate des Nicotinsäureamids dargestellt. Wir berichten über die Darstellung einiger Flavine.

¹⁾ Journ. Amer. chem. Soc. **60**, 1893, 2542 [1938].

²⁾ Vollmann, A. **531**, 35 [1937].

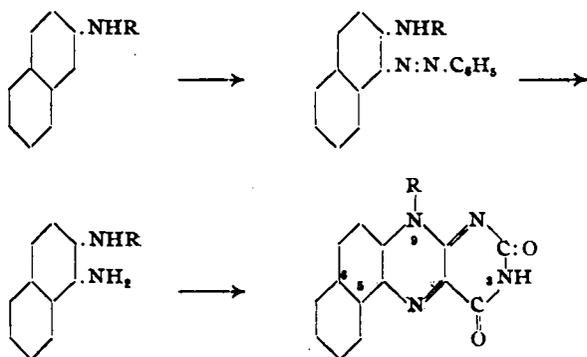
³⁾ Eckhardt, B. **73**, 13 [1940].

⁴⁾ Boyland, Biochem. Journ. **27**, 791 [1933]; Cook, Martin u. Roe, Nature (London) **143**, 1020 [1939].

⁵⁾ Angew. Chem. **51**, 621 [1938].

⁶⁾ Butenandt, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. **190**, 74, 112 [1938].

Nach ihren Löslichkeitseigenschaften kann man die Flavine in drei Gruppen einteilen. Zur ersten Gruppe zählen solche Flavine, die sich in Wasser und in wäbr. Alkali leicht lösen und durch Chloroform nicht aus diesen Lösungen ausgeschüttelt werden können. Hierzu gehören Flavine, die im Molekül, vor allem an der 9-Stellung, hydrophile Substituenten tragen, also Lactoflavin selbst, seine Stereoisomeren, Derivate mit einer oder mehreren Hydroxylgruppen in der Seitenkette und als extreme Vertreter die Flavin-9-essigsäure und 6.7-Dimethyl-flavin-9-essigsäure. Zur zweiten Gruppe gehören Flavine, die sich in Wasser schwerer lösen, von wäbr. Alkali aber leicht gelöst werden und aus diesen Lösungen mit Chloroform bis zu einem Verteilungsgleichgewicht oder vollständig ausgeschüttelt werden können, beispielsweise Lumiflavin, 9-Amyl-flavin. Für die oben erwähnte Fragestellung kam es darauf an, Stoffe der dritten Gruppe darzustellen, die sich in Wasser und wäbr. Alkali nicht lösen und nur von Chloroform (als Lipoid-Modell) gelöst werden. Dieses Ziel kann man auf zwei Wegen erreichen. Wird das Wasserstoffatom der Stellung 3 des Flavinmoleküls durch einen Alkylrest substituiert, so fällt damit die Möglichkeit zur Salzbildung fort und man erhält wasser- und alkaliunlösliche Verbindungen, sofern im Molekül nicht an anderer Stelle saure oder hydrophile Substituenten vorhanden sind. Wir haben als Typen dieser Verbindungen das 3-Methyl-5.6-benzo-9-phenyl-flavin und das 3-Methyl-5.6-benzo-9-cetyl-flavin dargestellt. Die andere Möglichkeit besteht in der Einführung von hydrophoben Substituenten, die den hydrophilen Anteil des Isalloxazins übertreffen. Wir haben einige Glieder der homologen Reihe der 9-Methyl- bis 9-Cetyl-Derivate des 5.6-Benzo-flavins dargestellt. Diese Substanzen sind alle in Wasser schwer löslich, die niedrigen Glieder sind in Alkali leicht löslich, während das 9-Cetyl-Derivat ein schwer lösliches Natriumsalz bildet. Bei der Verteilung zwischen Chloroform und wäbr. Alkali gehen diese Flavine mit zunehmender Kettenlänge mehr und mehr in die Chloroformschicht, das 9-Cetyl-Derivat ausschließlich. Die Darstellung der Flavine⁷⁾ erfolgte nach den von R. Kuhn und von P. Karrer ausgearbeiteten Verfahren durch Kondensation von Alloxan oder Methylalloxan mit an einem Stickstoff monosubstituierten *o*-Diaminen. Die hier verwendeten Diamine wurden durch Kupplung von β -Naphthyl-*N*-monoalkylaminen mit diazotiertem Anilin und durch Reduktion der Azofarbstoffe dargestellt.



⁷⁾ Literatur s. H. Rudy, Flavine. Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe. Bd. 2, S. 61 [1939].

9-Cetyl-5.6-benzo-flavin oder 3-Methyl-5.6-benzo-9-phenyl-flavin wurden in wäbr. Aufschwemmung oder in Lösung in Tributyrin oder Olivenöl Mäusen subcutan injiziert. Die Stoffe bildeten Depots, die noch nach 4, 6 und 10 Wochen zu finden waren. Hier scheinen also die Voraussetzungen für eine langdauernde Einwirkung gegeben zu sein. Flavine, die leicht wasserlöslich sind oder leicht lösliche Alkalisalze bilden, sind bei einmaliger subcutaner Injektion nach wenigen Tagen aus dem Organismus verschwunden; sie erscheinen schon innerhalb einer Stunde nach der Injektion im Harn. Derartige Flavine sind sicher nicht cancerogen. Mäuse, die seit Juni 1939 80-mal mit 9-Phenyl-flavin, 6.9-Dimethyl-flavin und anderen gepinselt wurden, zeigten keinerlei Epithelveränderungen, während zum Vergleich mit Benzopyren gepinselte Mäuse Tumoren entwickelten und inzwischen an den Tumoren gestorben sind. Für eine sichere Beurteilung, ob die einseitig lipidlöslichen Flavine cancerogen sind oder nicht, ist noch eine längere Beobachtungszeit notwendig.

Etwas besser unterrichtet sind wir über die Einwirkung der Flavine auf die Krebszelle. In Untersuchungen, die in Zusammenarbeit mit der Gewebzüchtungsabteilung des Instituts (Leiter Oberstabsarzt Dr. K. Höfer) durchgeführt wurden, zeigte es sich, daß Flavine die in der Gewebekultur wachsende Zelle des Ehrlichschen Mäusecarcinoms in Konzentrationen abtöten, die auf Zellen embryonalen, also nichtcarcinomatösen Gewebes ohne Einfluß sind. Beispielsweise ist Lactoflavin hierbei in Dosen von 100 γ /ccm unwirksam (abgesehen von einer Hemmung der Wachstumsgeschwindigkeit), 5.6-Benzo-9-phenyl-flavin in Dosen von 15 γ /ccm wirksam. Da die Krebszelle in der Gewebekultur schädigenden Einflüssen gegenüber labiler ist als die embryonale Zelle⁸⁾, ist Zurückhaltung geboten, diese Wirkung der Flavine als „krebsspezifisch“ zu bezeichnen. Das 5.6-Benzo-9-butyl-flavin bewirkt bei 25 γ /ccm charakteristische morphologische Veränderungen der Zelle des Mäusecarcinoms, die wir bei der Einwirkung andersartig substituierter Flavine nicht gesehen haben. Diese veränderten, in der Gewebekultur noch lebensfähigen Krebszellen vermögen nach der Transplantation auf die Maus sich nicht mehr zu Tumoren zu entwickeln, während unbehandelte Gewebekulturen des Mäusecarcinoms hierbei praktisch 100-proz. wieder Tumoren bilden. Unsere bisherigen Beobachtungen gestatten die Schlußfolgerung, daß die Giftigkeit der Flavine der Zelle des Mäusecarcinoms gegenüber nicht den Gesetzmäßigkeiten folgt, die R. Kuhn und P. Boulanger⁹⁾ für die Giftwirkung der Flavine auf den Mäuseorganismus in Abhängigkeit von der Konstitution der Flavine gefunden haben. Wir untersuchen, welche Regeln der Giftwirkung der Flavine auf die Zelle des Mäusecarcinoms zugrunde liegen und welche Substitutionen eine Steigerung der bisher beobachteten Wirkungen ermöglichen.

Dem Direktor des Geschwulstinstituts, Hrn. Prof. Dr. H. Cramer, sind wir für sein förderndes Interesse an unseren Arbeiten zu großem Dank verpflichtet.

Beschreibung der Versuche.

9-Phenyl-5.6-benzo-flavin.

5 g *N*-Phenyl- β -naphthylamin werden in 300 ccm Alkohol gelöst und unter Kühlung mit der diazotierten Lösung von 2.5 g Anilin versetzt.

⁸⁾ Ludford, Arch. exper. Zellforsch. **22**, 317 [1939].

⁹⁾ Ztschr. physiol. Chem. **241**, 233 [1936].

Nach 2 Stdn. wird der ausgeschiedene Farbstoff abfiltriert und aus Alkohol umkrystallisiert. Ausb. 6.4 g rote Nadeln vom Schmp. 135—136°. 2 g Azofarbstoff werden in 300 ccm Alkohol heiß gelöst. Zu der siedenden Lösung wird so lange wäßr. Natriumhydrosulfitlösung gegeben, bis Entfärbung eingetreten ist. Die filtrierte Lösung wird im Vakuum vom Alkohol befreit. Hierbei scheidet sich das Reduktionsprodukt aus. Nach dem Umkrystallisieren aus Alkohol-Wasser werden 1.1 g farblose Blättchen erhalten, die sich an der Luft leicht verfärben. Schmp. 124—126°. 3.3 g 1-Amino-2-phenylamino-naphthalin werden in 30 ccm Eisessig heiß gelöst und zu der heißen Lösung von 4.8 g Alloxan und 7.5 g Borsäure in 220 ccm Eisessig gegeben. Nach 1 Stde. wird mit Wasser verdünnt und über Nacht stehen gelassen. Das Krystallisat wird aus Eisessig umkrystallisiert. Es bildet feine orangefarbene Nadeln, die über 365° schmelzen. Ausb. 4.3 g.

1.961 mg Sbst.: 0.269 ccm N₂ (21°, 758 mm).

C₂₀H₁₈O₂N₄. Ber. N 16.47. Gef. N 15.90.

3-Methyl-9-phenyl-5.6-benzo-flavin.

2 g 1-Amino-2-phenylamino-naphthalin werden in 50 ccm Eisessig heiß gelöst und zu einer Lösung von 3 g Methylalloxan (aus Theobromin) und 5 g Borsäure in 300 ccm Eisessig gegeben. Nach 1 Stde. wird mit Wasser verdünnt und nach einer weiteren Stunde abgesaugt. Aus Eisessig umkrystallisiert bildet das Produkt orangefarbene Nadeln, die bis 365° nicht schmelzen, ab 335° Zersetzung zeigen. Ausb. 2.1 g.

2.078 mg Sbst.: 0.280 ccm N₂ (23.5°, 764 mm).

C₂₁H₁₄O₂N₄. Ber. N 15.81. Gef. N 15.61.

9-β-Naphthyl-5.6-benzo-flavin.

β,β'-Dinaphthylamin wird mit diazotiertem Anilin gekuppelt und der Azofarbstoff durch Reduktion mit Hydrosulfit in 1-Amino-2-β-naphthylamino-naphthalin übergeführt¹⁰⁾. 1.6 g dieses Amins werden in 50 ccm Eisessig heiß gelöst und zu der heißen Lösung von 2.1 g Alloxan und 3.4 g Borsäure in 175 ccm Eisessig gegeben. Nach 1 Stde. wird das Reaktionsprodukt mit Wasser ausgefällt. Nach mehrmaligem Umkrystallisieren aus Eisessig werden 0.5 g 9-β-Naphthyl-5.6-benzo-flavin in orangefarbenen Nadeln erhalten, die bei etwa 357° nach vorhergehender Zersetzung schmelzen.

1.959 mg Sbst.: 0.247 ccm N₂ (24.5°, 753 mm).

C₂₄H₁₄O₂N₄. Ber. N 14.36. Gef. N 14.33.

9-Alkyl-5.6-benzo-flavine.

Wie unten in einigen Fällen ausführlicher beschrieben, wurden die N-Alkyl-β-naphthylamine durch Umsetzung von β-Naphthylamin mit den entsprechenden Alkyl-bromiden oder -jodiden erhalten. Diese Umsetzung, die Kupplung mit diazotiertem Anilin, die Reduktion mit Hydrosulfit und die Kondensation mit Alloxan verliefen in allen Fällen gleichartig.

9-Methyl-5.6-benzo-flavin¹¹⁾: Gelbe Nadeln, die bis 365° nicht schmelzen.

1.907 mg Sbst.: 0.335 ccm N₂ (23.5°, 751 mm).

C₁₈H₁₀O₂N₄. Ber. N 20.10. Gef. N 19.97.

¹⁰⁾ O. Fischer u. Eilles, Journ. prakt. Chem. **79**, 567 [1909].

¹¹⁾ Erwähnt bei R. Kuhn u. P. Boulanger, B. **69**, 1557 [1936].

9-Äthyl-5.6-benzo-flavin: Orangegelbe Nadeln vom Schmp. 326°. 1.837 mg Sbst.: 0.305 ccm N₂ (23.5°, 751 mm).

C₁₆H₁₂O₂N₄. Ber. N 19.18. Gef. N 18.88.

9-*n*-Propyl-5.6-benzo-flavin: Gelbe Nadeln vom Schmp. 319—320°. 2.174 mg Sbst.: 0.344 ccm N₂ (22.5°, 759 mm).

C₁₇H₁₄O₂N₄. Ber. N 18.30. Gef. N 18.25.

9-*n*-Butyl-5.6-benzo-flavin: 5 g β-Naphthylamin werden in 15 ccm Alkohol gelöst und mit 7.5 g *n*-Butylbromid 12 Stdn. auf dem Wasserbad erwärmt. Nach dem Erkalten wird das Reaktionsprodukt abgeseugt und aus Alkohol umkrystallisiert. Schmp. 177—178°. Ausbeute an Hydrobromid 3.7 g.

1 g Hydrobromid wird in 25 ccm Alkohol gelöst und mit der Lösung von 0.35 g diazotiertem Anilin versetzt. Der Farbstoff wird aus Alkohol umkrystallisiert. 0.9 g rote Nadeln vom Schmp. 80°. 5 g Azofarbstoff werden in 200 ccm Alkohol gelöst und mit Hydrosulfit in der Hitze reduziert. Nach dem Abdampfen des Alkohols im Vakuum scheidet sich das Amin ab. Aus Alkohol-Wasser umkrystallisiert 3.4 g glänzende Blättchen vom Schmp. 72—74°. 3.4 g Amin werden in 25 ccm Eisessig heiß gelöst und zu der heißen Lösung von 5 g Alloxan und 7 g Borsäure in Eisessig gegeben. Das nach 1 Stde. mit Wasser ausgefällte Flavin wird aus Eisessig umkrystallisiert. 9-*n*-Butyl-5.6-benzo-flavin bildet gelbe Nadeln, die bei 297—298° schmelzen. Ausb. 3.3 g.

2.321 mg Sbst.: 0.354 ccm N₂ (22°, 767 mm).

C₁₈H₁₆O₂N₄. Ber. N 17.50. Gef. N 17.80.

9-Isoamyl-5.6-benzo-flavin: Gelbe Nadeln vom Schmp. 273°.

1.628 mg Sbst.: 0.237 ccm N₂ (21.5°, 763 mm).

C₁₉H₁₈O₂N₄. Ber. N 16.77. Gef. N 16.93.

9-*n*-Hexyl-5.6-benzo-flavin: Orangegelbe Nadeln vom Schmp. 274—275°.

1.913 mg Sbst.: 0.265 ccm N₂ (20°, 752 mm).

C₂₀H₂₀O₂N₄. Ber. N 16.09. Gef. N 15.79.

9-*n*-Octyl-5.6-benzo-flavin: Orangegelbe Nadeln vom Schmp. 248—249°.

2.458 mg Sbst.: 0.323 ccm N₂ (25°, 755 mm).

C₂₂H₂₄O₂N₄. Ber. N 14.89. Gef. N 14.96.

9-*n*-Decyl-5.6-benzo-flavin: Orangegelbe Nadeln vom Schmp. 230°.

1.961 mg Sbst.: 0.233 ccm N₂ (20.5°, 761 mm).

C₂₄H₂₈O₂N₄. Ber. N 13.86. Gef. N 13.84.

9-*n*-Dodecyl-5.6-benzo-flavin: Orangegelbe Nadeln vom Schmp. 236°.

2.933 mg Sbst.: 0.325 ccm N₂ (25.5°, 763 mm).

C₂₆H₃₂O₂N₄. Ber. N 12.96. Gef. N 12.73.

9-Cetyl-5.6-benzo-flavin: 10 g β-Naphthylamin werden in 15 ccm Alkohol mit 24 g Cetyl bromid 19 Stdn. auf dem Wasserbad gekocht. Das ausgeschiedene Hydrobromid wird aus Alkohol umkrystallisiert. Es bildet glänzende Blättchen vom Schmp. 143—145°. Ausb. 17.4 g. 5.4 g Hydrobromid werden in 900 ccm Alkohol gelöst und mit der Lösung von 1.6 g diazotiertem Anilin versetzt. Der aus Alkohol umkrystallisierte Azofarbstoff bildet orangefarbene Nadeln vom Schmp. 61°. Ausb. 3.8 g. 7.4 g

Azofarbstoff werden in siedender alkohol. Lösung mit Hydrosulfit reduziert. Das aus dem Amin dargestellte Hydrochlorid schmilzt bei 144°. Ausb. 3.3 g. 3.3 g Hydrochlorid werden in 90 ccm heißem Eisessig gelöst und zu der heißen Lösung von 4.5 g Alloxan und 6 g Borsäure in 450 ccm Eisessig gegeben. Nach 1 Stde. wird das Flavin mit Wasser ausgefällt und aus Eisessig umkrystallisiert. Aus Aceton krystallisiert es in schönen, orangegelben glänzenden Blättchen vom Schmp. 221—222°. Ausb. 1.75 g.

2.611 mg Sbst.: 0.262 ccm N₂ (22°, 769 mm).

C₃₀H₄₀O₄N₄. Ber. N 11.47. Gef. N 11.74.

3-Methyl-9-cetyl-5.6-benzo-flavin: 2.4 g 1-Amino-2-cetyl-amino-naphthalin-hydrochlorid werden in 75 ccm Eisessig gelöst und zu der heißen Lösung von 1.2 g Methylalloxan und 2 g Borsäure in 150 ccm Eisessig gegeben. Nach 1 Stde. wird das Flavin mit Wasser ausgefällt und aus Aceton umkrystallisiert. Orangefarbene Nadeln vom Schmp. 187—188°. Ausb. 0.55 g.

1.919 mg Sbst.: 0.185 ccm N₂ (20°, 759 mm).

C₃₁H₄₈O₄N₄. Ber. N 11.15. Gef. N 11.21.

76. Karl Freudenberg, Helmut Eich, Claudia Knoevenagel und Wilhelm Westphal: Versuche über Glucosid- und Disaccharid-Synthesen.

[Aus d. Chem. Institut d. Universität, Heidelberg.]

(Eingegangen am 3. April 1940.)

Wir berichten im folgenden über einige Vorarbeiten zu Glucosid- und Disaccharid-Synthesen.

I.

Das Natriumalkoholat der Diacetonglucose ist bereits früher¹⁾ durch unmittelbare Wechselwirkung zwischen der Zuckerverbindung und dem Metall in Gegenwart indifferenten Lösungsmittel bereitet worden. Es läßt sich auch ebenso wie die Kaliumverbindung in wasserfreiem Ammoniak nach E. Chablay²⁾ herstellen. Diese Alkoholate sind in Äther, Petroläther, Benzol usw. leicht löslich. Das Kaliumalkoholat der Diacetonglucose schmilzt nahezu ohne Zersetzung bei 150°. Die Lösung dieser Alkoholate in Ammoniak scheidet mit der Lösung von Thalliumnitrat in Ammoniak das Thalliumalkoholat der Diacetonglucose ab, das aus Äther krystallinisch gewonnen werden kann. Mit Benzyl-³⁾ und Methylhalogeniden reagieren diese Alkoholate mit zunehmender Geschwindigkeit in der Reihenfolge: Na, K, Tl.

Da mit diesen Alkoholaten der Diacetonglucose einerseits und mit Acetohalogen-glucose sowie mit Diaceton-1-chlor-mannose andererseits die Synthese eines Disaccharidderivates nicht zu erzwingen war, wurde versucht, dieses Ziel über die gemischten Kohlensäureester zu erreichen. Diacetonglucosyl-kohlensäurechlorid (aus Diacetonglucose und Phosgen) ist eine im Hochvakuum destillierbare Flüssigkeit, die sich mit Tetraacetyl- β -glucose leicht umsetzen läßt. Versuche, aus dem gemischten Ester durch Kohlensäure-abspaltung zu einem Disaccharidderivat zu gelangen, schlugen fehl.

¹⁾ K. Freudenberg u. R. M. Hixon, B. 56, 2119 [1923].

²⁾ Ann. Chim. [9] 8, 145 [1917].

³⁾ K. Freudenberg u. H. v. Hochstetter, B. 58, 970 [1939].