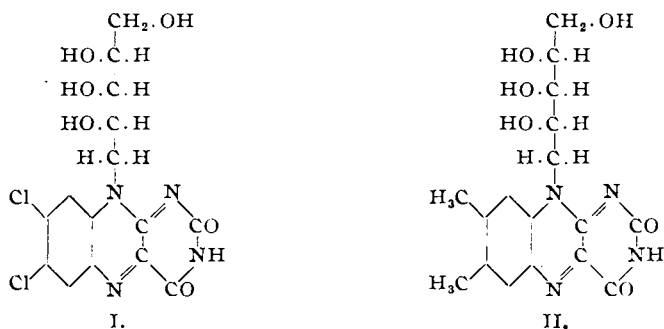


### 165. Richard Kuhn, Friedrich Weygand und Ernst Friedrich Möller: Über einen Antagonisten des Lactoflavins.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizin. Forschung, Heidelberg, Institut für Chemie.]  
(Eingegangen am 18. August 1943.)

Im allgemeinen findet man, daß beim Ersatz von  $\text{CH}_3$  durch Cl am Benzolkern die kristallographischen Eigenschaften sich so wenig ändern, daß lückenlose Reihen von Mischkristallen auftreten<sup>1)</sup>. Unter diesem Gesichtspunkt haben wir das 6.7-Dichlor-9-*d*-riboflavin (I) dargestellt, das sich vom Lactoflavin (II, Vitamin B<sub>2</sub>) nur durch den Ersatz der beiden kerngebundenen Methyl- durch 2 Cl unterscheidet. Als Ausgangsmaterial diente 1.2-Dichlor-4.5-dinitrobenzol, das mit *d*-Ribamin umgesetzt wurde. Nach katalytischer Hydrierung des erhaltenen 1.2-Dichlor-4-nitro-5-*d*-ribitylaminobenzols wurde mit Alloxan in Eisessig-Borsäure zum Flavin kondensiert. Es war zu erwarten, daß das 6.7-Dichlor-9-*d*-riboflavin entweder eine gewisse Wirksamkeit als Vitamin (Wachstumsstoff) besitzen oder aber in den Zellen nur den Platz, nicht dagegen die Funktion des natürlichen Vitamins übernehmen und daher ein Antagonist des Lactoflavins sein werde.



Die Prüfung auf Lactoflavinwirkung bei *Bacterium lactis acidi* (Stamm des Instituts für Gärungsgewerbe, Berlin) und bei einem Milchsäurebakterium (Stuhlstamm St 19)<sup>2)</sup>, die beide ohne Lactoflavin nicht wachsen, fiel im Konzentrationsgebiet  $0.5 \times 10^{-7}$  bis  $2.5 \times 10^{-5}$  g/ccm völlig negativ aus. Auch für Hefe M, *Staphylococcus aureus* (Stamm vR) und *Streptobacterium plantarum* (Stamm 10 S), bei denen Lactoflavin weder zum Wachstum notwendig ist, noch eine zusätzliche Wachstumssteigerung hervorruft, ergab sich keine Begünstigung des Wachstums durch 6.7-Dichlor-9-*d*-riboflavin (Konzentrationsgebiet wie oben). Bei allen angeführten Mikroorganismen, mit Ausnahme der Hefe, hat sich das Dichlorflavin als Hemmstoff erwiesen (Tafel 1).

<sup>1)</sup> P. Groth, Elemente der physikalischen und chemischen Kristallographie, München und Berlin 1921, S. 283; H. G. Grimm, Ztschr. physik. Chem. [B] **14**, 169 [1931]; H. Lettré, H. Barnbelk u. W. Lege, B. **69**, 1151 [1936]; A. Neuhaus, Ztschr. Kristallogr. **101**, 177 [1939]. Über die Bedeutung von Isomorphie und partieller Racemie für die physiologischen Spezifitätserscheinungen vergl. H. Lettré, Ergebn. Enzymforsch. **9**, 1 [1943]; R. Kuhn, Chemie **55**, 1 [1942].

<sup>2)</sup> N. Rucker, Dissertat. Heidelberg 1939.

Tafel 1.

Vollständig wachstumshemmende Konzentrationen von 6.7-Dichlor-9-d-ribo-flavin in 10<sup>-5</sup> g/ccm.

	Hefe M	<i>Staph. aureus</i> (vR)		<i>Sbm. plantarum</i> (10 S)		Stuhlstamm St 19		<i>B. lactis acidi</i> , Berlin
	nach	4 Tagen	2 Tagen	4 Tagen	2 Tagen	4 Tagen	2 Tagen	4 Tagen
in 10 <sup>-5</sup> g/ccm	≥25	1.0 bis 6.6	3.3 bis 13.2	0.8 bis 3.3	1.6 bis 6.6	~0.4	~0.8	>2.5

Daß es sich um einen spezifischen Hemmstoff handelt, ergibt sich aus der praktischen Unwirksamkeit der folgenden Flavine (Tafel 2), soweit sich dies mit Rücksicht auf die meist geringe Löslichkeit der Farbstoffe bisher prüfen ließ.

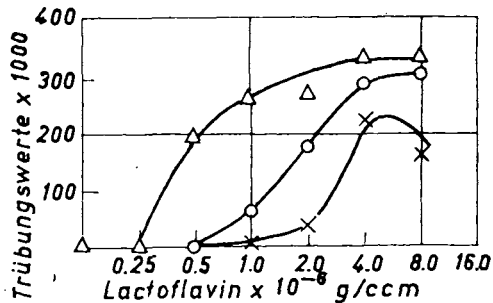
Tafel 2.

Hemm- und Wuchsstoffversuche mit verschiedenen Flavinen (und Zwischenprodukten der Flavinsynthese).

Konz. in 10<sup>-5</sup> g/ccm. ⊖ = unwirksam. ± = schwach wirksam. + = gut wirksam.

Substanz	Hemmung bei		Wuchsstoffwirkung bei	
	<i>B. lactis acidi</i>	St 19	<i>B. lactis acidi</i>	St 19
6.7-Dimethyl-9-d-arabo-flavin	⊖ von 0.08 bis 2.5	± bei 2.5	⊖ von 0.08 bis 2.5	⊖ von 0.08 bis 2.5
6.7-Dimethyl-9-l-arabo-flavin	„	„	„	„
9-d-Arabo-flavin	„	± bei 2.5	„	„
9-l-Arabo-flavin	„	„	„	„
9-Oxyäthyl-flavin	„	„	„	„
9-d-Gluco-flavin	± bei 2.5	„	„	„
3-Methyl-9-d-gluco-flavin	⊖ von 0.08 bis 2.5	„	„	„
6.7-Dimethyl-9-d-gluco-flavin	„	„	„	„
3.6.7-Trimethyl-9-d-gluco-flavin	„	⊖ von 0.08 bis 2.5	„	„
Tetramethylen-9-l-arabo-flavin	„	„	„	„
6.7-Dimethyl-flavin-9-essigsäure	„	„	„	„
Flavin-9-essigsäure	„	„	„	„
5.6-Benzo-9-methyl-flavin	⊖ von 0.02 bis 0.6	„	„	„
9-Phenyl-flavin	⊖ von 0.04 bis 1.2	„	„	„
6-Methyl-9-d-ribo-flavin	„	„	„	+ bei 2.5
6.7-Dimethyl-9-d-xylo-flavin	„	± bei 2.5	„	⊖ von 0.08 bis 2.5
1.2-Dimethyl-4-amino-5-d-ribityl-aminobenzol	⊖ von 1.6 bis 50	⊖ von 0.08 bis 2.5	„	„
1.2-Dimethyl-4-nitro-5-d-ribityl-aminobenzol	⊖ von 0.4 bis 12.5	„	„	„
N-Methyl-keto-chinoxalincarbonsäure	⊖ von 0.08 bis 2.5	⊖ von 0.08 bis 2.5	„	„

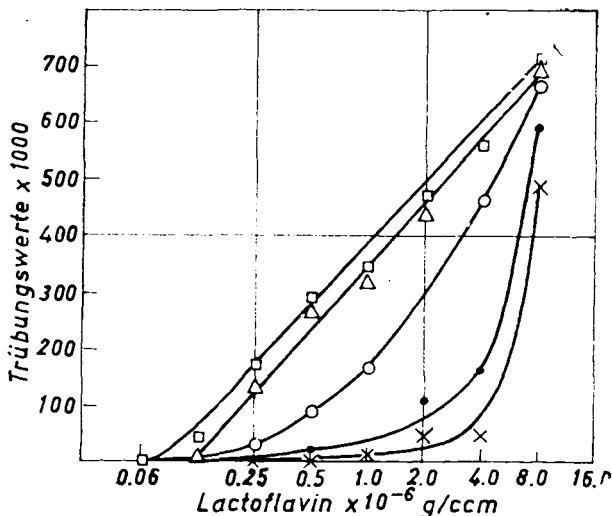
Aus Tafel 2 geht ferner hervor, daß die angeführten Flavine nicht in-  
 stände waren, Lactoflavin bei den lactoflavinbedürftigen Stämmen zu er-  
 setzen, mit Ausnahme von 6-Methyl-9-*d*-ribo-flavin, das nach E. E. Snell  
 und F. M. Strong<sup>3)</sup> auch bei gewissen Stämmen von *Thermobacterium*  
*helveticum* und *Bacterium lactis acidi* Wuchsstoffwirkung zeigt.



Abbild. 1. Enthemmung von  $1.3 \times 10^{-4}$  g/ccm 6,7-Dichlor-9-*d*-ribo-flavin bei *Staph. aureus* vR durch Lactoflavin.  $t = 28^\circ$ .

x—x nach 3 Tagen, o—o nach 4 Tagen,  $\Delta$ — $\Delta$  nach 6 Tagen.

Die hemmende Wirkung des Dichlorflavins (I) ließ sich durch  
 Zusatz von Lactoflavin (II) vollkommen aufheben (Abbild. 1 und 2).  
 6,7-Dichlor-9-*d*-ribo-flavin ist also eine Antagonist des B<sub>2</sub>-Vitamins. Bei



Abbild. 2. Enthemmung von  $1.3 \times 10^{-4}$  g/ccm 6,7-Dichlor-9-*d*-ribo-flavin bei *Streptob. plantarum*, Stamm 10 S.I.G. durch Lactoflavin.  $t = 28^\circ$ .

x—x nach 45 Stdn., •—• nach 53 Stdn., o—o nach 70 Stdn.,  
 $\Delta$ — $\Delta$  nach 95 Stdn.,  $\square$ — $\square$  nach 141 Stdn.

<sup>3)</sup> Journ. biol. Chem. **123**, 112 [1938]; Enzymologia Den Haag, **6**, 186 [1939].

50% des normalen Wachstums beträgt das Verhältnis der Konzentrationen Lactoflavin : Dichlorflavin für

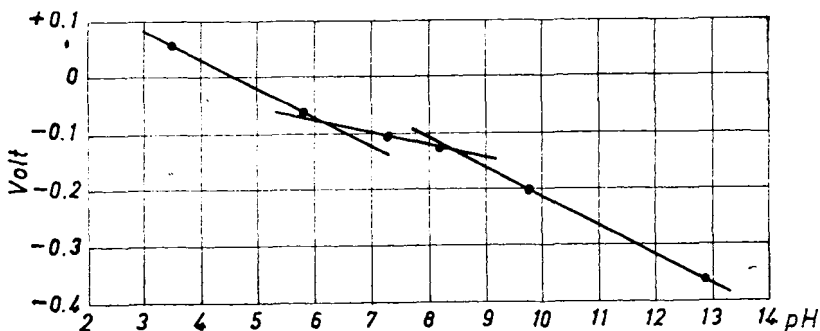
	<i>Staph. aureus</i> (vR)	<i>Sbm. plantarum</i> (10 S. I. G.)
nach 2 Tagen .....	—	1:25
nach 3 Tagen .....	1:50	1:60
nach 4 Tagen .....	1:70	1:130
nach 6 Tagen .....	1:280	1 165

Zum Vergleich sei erwähnt, daß das Verhältnis *p*-Amino-benzoesäure: Sulfapyridin bei 50-proz. Hemmung des normalen Wachstums gewisser Stämme von *Sbm. plantarum* ziemlich unabhängig von der Versuchsdauer 1:35 beträgt. Diese Konstanz scheint dadurch bedingt zu sein, daß derartige Stämme nicht befähigt sind, *p*-Amino-benzoesäure in solchen Mengen zu synthetisieren, wie sie unter den eingehaltenen Bedingungen<sup>4)</sup> für eine Entthemung der Sulfonamide in Frage kommen. Beim Antagonismus Dichlorflavin  $\rightleftharpoons$  Dimethylflavin liegt die zeitliche Verschiebung der Quotienten im Sinne einer Synthese von Lactoflavin durch die Bakterien<sup>5)</sup>.

Die Bestimmung des Redoxpotentials (Abbild. 3) hat ergeben:

6.7-Dichlor-9-*d*-ribo-flavin .....  $E_0 = -0.095$  V ( $p_{\text{H}} = 7$ )

6.7-Dimethyl-9-*d*-ribo-flavin<sup>6)</sup> .....  $E_0 = -0.185$  V ( $p_{\text{H}} = 7$ )



Abbild. 3. Redoxpotentiale von 6.7-Dichlor-9-*d*-riboflavin.

Danach ist das Antivitamin in seiner Dihydrostufe ein erheblich schwächeres Reduktionsmittel als Leukolactoflavin. Vielleicht kann das Dichlorflavin in den Zellen das Lactoflavin deshalb nicht funktionell ersetzen, weil die Dihydrostufe des „gelben Dichlorfermentes“ nicht mehr negativ genug ist, um  $O_2$  zu  $H_2O_2$  zu hydrieren.

<sup>4)</sup> E. F. Möller u. K. Schwarz, B. **74**, 1612 [1941]; R. Kuhn, E. F. Möller u. G. Wendt, B. **76**, 405 [1943].

<sup>5)</sup> Verwendet man ganz geringe Konzentrationen eines Sulfonamids (Sulfanilamid  $10^{-7}$  g/ccm) bei *Sbm. plantarum*, so beobachtet man bei der Entthemung durch *p*-Amino-benzoesäure eine ganz entsprechende Verschiebung der Quotienten im Sinne einer *p*-Amino-benzoesäure-Synthese durch das Bacterium, die schon in etwa 10 Passagen bei fortlaufender Erhöhung der Sulfanilamidkonzentration bis zur Resistenz von *Sbm. plantarum* gegen mindestens  $10^{-4}$  g Sulfanilamid/ccm führen kann (E. F. Möller, unveröffentlicht).

<sup>6)</sup> R. Kuhn u. P. Boulanger, B. **69**, 1557 [1936].

### Beschreibung der Versuche.

1.2-Dichlor-4.5-dinitro-benzol<sup>7)</sup>: 80 ccm Schwefelsäure (d 1.872) wurden vorsichtig unter Eiskühlung in 53 ccm Salpetersäure (d 1.5) gegossen. Dazu gab man 20 g *o*-Dichlor-benzol und erhitzte im Ölbad 15 Stdn. auf 110°. Nach dem Abkühlen goß man auf Eis, saugte ab und wusch mit Wasser. Nach dem Trocknen im Vakuumexsiccator wurde erneut mit einer Mischung aus 80 ccm Schwefelsäure (d 1.872) und 53 ccm Salpetersäure (d 1.5) 6 Stdn. im Ölbad auf 110° erhitzt. Man goß nach dem Abkühlen auf Eis, saugte ab, wusch mit Wasser und krystallisierte aus Alkohol und aus Eisessig um. Ausb. 4.2 g, Schmp. 107° nach Sintern bei 103°.

1.2-Dichlor-4-nitro-5-*d*-ribitylamino-benzol: 0.85 g 1.2-Dichlor-4.5-dinitro-benzol und 2.2 g rohes *d*-Ribamin (etwa 1.2 g reines *d*-Ribamin) wurden in 10 ccm 80-proz. Alkohol im Rohr zunächst 20 Min. im Dampfbad auf 100° und dann noch 4 Stdn. auf 140° erhitzt. Schon beim Erwärmen im Dampfbad erfolgte Rotfärbung. Nach dem Erkalten wurde im Vakuum zur Trockne gebracht, wobei sich ziegelrote Krystalle ausschieden. Diese wurden 2-mal mit je 20 ccm Äther gewaschen. Nach dem Umkrystallisieren aus wäbr. Alkohol (2-mal) Schmp. 183—185°. Bei einem Ansatz von 2.55 g 1.2-Dichlor-4.5-dinitro-benzol und 6.6 g rohem *d*-Ribamin erhielt man 2 g 1.2-Dichlor-4-nitro-5-*d*-ribitylamino-benzol.

$C_{11}H_{14}O_6N_2Cl_2$  (341.1). Ber. N 8.21, Cl 20.79. Gef. N 8.42, Cl 21.11.

6.7-Dichlor-9-*d*-ribo-flavin: a) Hydrierung: 0.4 g Platinoxyd nach Adams wurden in 20 ccm 70-proz. Alkohol vorhydriert. Dann gab man 1 g 1.2-Dichlor-4-nitro-5-*d*-ribitylamino-benzol hinzu und schüttelte mit Wasserstoff. Binnen 1 Stde. wurden 200 ccm Wasserstoff aufgenommen, dann kam die Hydrierung zum Stillstand. Die leicht braune Lösung wurde vom Katalysator befreit und im Vakuum eingedampft.

b) Kondensation: Der ölige Rückstand wurde in 50 ccm Eisessig gelöst. Dann gab man eine etwa 30° warme, klare Lösung von 0.7 g Alloxan-tetrahydrat und 1.2 g Borsäure in 50 ccm Eisessig hinzu. Es trat sofort Flavinbildung ein. Man erwärmte bis auf etwa 50°, ließ über Nacht stehen, verdampfte den Eisessig und dampfte 3-mal je 50 ccm absol. Alkohol zur Entfernung der Borsäure nach. Das letzte Destillat enthielt keinen Borsäureester mehr. Dann erhitzte man mit 50 ccm absol. Alkohol zum Sieden und ließ über Nacht auskrystallisieren. Es wurde abgesaugt und getrocknet: 0.95 g dunkelgelbe Nadeln. Zur Reinigung wurde im Soxhlet-Apparat mit absol. Alkohol extrahiert. Nach 22 Stdn. war noch viel Flavin in der Hülse. Die alkohol. Lösung lieferte nach dem Konzentrieren im Vakuum ein Krystallinat (200 mg) vom Schmp. 271—275°. Der in der Hülse verbliebene Teil wurde aus Wasser umkrystallisiert und lieferte als 1. Fraktion 300 mg Flavin vom Schmp. 273—275° und als 2. Fraktion 50 mg vom Schmp. 273—275°.

Zur Analyse wurde die erste, aus Wasser erhaltene Fraktion nach 2-stgd. Trocknen bei 100°/12 mm verwendet.

$C_{15}H_{14}O_6N_4Cl_2$  (417.2). Ber. C 43.18, H 3.38, N 13.43. Gef. C 43.06, H 3.77, N 13.08.

### Ausführung der Bakterienteste. .

Die Bakterienteste wurden in der üblichen Weise durchgeführt. Das nicht vollsynthetische Nährmedium für die lactoflavinbedürftigen Stämme

<sup>7)</sup> Journ. chem. Soc. London 85, 867 [1904].

(*Bacterium lactis acidi* und Stuhlstamm St 19) hatte folgende Zusammensetzung (Tafel 3):

Tafel 3.

Zusammensetzung der Nährlösung für die lactoflavinbedürftigen Stämme  
(Konz. im Versuch in g/ccm).

Ammoniumsulfat (Merck p. a. 1217) .....	0.5 × 10 <sup>-2</sup>
Natriumacetat + 3H <sub>2</sub> O <sup>a)</sup> .....	1.38 × 10 <sup>-2</sup>
Dinatriumphosphat + 2H <sub>2</sub> O (Merck 6580) .....	1.25 × 10 <sup>-3</sup>
Monokaliumphosphat (nach Sörensen, Merck 4873) .....	0.83 × 10 <sup>-3</sup>
Magnesiumsulfat + 7H <sub>2</sub> O (Merck 5882) .....	0.42 × 10 <sup>-3</sup>
Ferricitrat (Merck Erg. B. 5) .....	4.2 × 10 <sup>-5</sup>
Mangan(II)-chlorid + 4H <sub>2</sub> O (Merck 5926) .....	1.25 × 10 <sup>-5</sup>
Glucose (Merck 8341) <sup>b)</sup> .....	2.0 × 10 <sup>-2</sup>
<i>l</i> -Cystein-hydrochlorid (Hoffmann-La Roche) .....	0.42 × 10 <sup>-4</sup>
<i>d,l</i> -pantothensaures Natrium (Hoffmann-La Roche) .....	4.0 × 10 <sup>-7</sup>
„Peptonphotolysat“ .....	0.6 ccm/6 ccm
Lactoflavin (synth., I. G. Elberfeld) <sup>c)</sup> .....	0.42 × 10 <sup>-7</sup>
Aneurin hydrochlorid (synth., Elberfeld) ..	} wie im Nährmedium für <i>Sbm. plantarum</i> <sup>8)</sup>
Nicotinsäure und Aminosäuren .....	
Natriumhydroxyd p. a. zur Einstellung auf p <sub>H</sub> 6.6.	

<sup>a)</sup> Nach Aufkochen mit 1% Carbo act. sicc. (Merck) in wäßr. Lösung umkrystallisiert und im Vak. über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> bei Zimmertemp. getrocknet.

<sup>b)</sup> Nach Aufkochen mit 1% Carbo act. sicc. (Merck) in wäßr. hochkonz. Lösung durch Zugabe von mit Petroläther vergälltem Alkohol bis zu einem Gehalt von 70 Vol.-% bei -20° umkrystallisiert und erst über H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bei Zimmertemp., dann über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> bei 100° im Vak. getrocknet.

<sup>c)</sup> Nur in den Hemmungstesten anwesend.

Das lactoflavinfreie „Peptonphotolysat“ wurde in Anlehnung an E. E. Snell und F. M. Strong<sup>9)</sup> dargestellt:

Je 40 g Merck- und Witte-Pepton wurden, gelöst in 1 l *n*-NaOH, in einer flachen Schale von einer etwa 30 cm entfernten Nitralampe mit Reflektor 6 Stdn. unter Kühlung durch den Luftstrom eines Ventilators bestrahlt. Dann stand die Lösung noch 18 Stdn. im Dunkeln bei Zimmertemperatur. Sie wurde nun mit Eisessig auf p<sub>H</sub> 6.6 eingestellt und auf 1 l aufgefüllt. Schließlich wurde eine geringe Niederschlagsmenge durch 1/4-stdg. Zentrifugieren (3000 U/Min.) entfernt. Die Lösung behält ihre Aktivität unter Toluol im Eisschrank einige Monate.

Die Beimpfung erfolgte mit einer Öse (Drahtstärke 1 mm, innerer Ösendurchmesser 2 mm) aus einer 2-tägigen Kultur in dem angegebenen Medium. Die Züchtung der Stämme wurde ebenfalls in diesem Medium vorgenommen (Überimpfung alle 2—3 Tage), doch mußte gelegentlich — zur Konstanthaltung der Eigenschaften<sup>10)</sup> — eine Passage in Glucose-Mn-Bouillon eingeschaltet werden. Dies hängt offenbar damit zusammen, daß in dem angegebenen Medium noch eine oder mehrere lebenswichtige Substanzen fehlen. Jedoch hat das von E. E. Snell und F. M. Strong<sup>9)</sup> zur Verbesserung ihres

<sup>8)</sup> R. Kuhn, E. F. Möller u. G. Wendt, B. **76**, 405 [1943].

<sup>9)</sup> Ind. Engng. Chem., analyt. Edit. **11**, 346 [1939].

<sup>10)</sup> Der Berliner Stamm des *Bacterium lactis acidi* kann leicht in der Weise „umschlagen“, daß er Lactoflavin synthetisiert. Eine Zurückzüchtung war bisher nicht möglich. Die später vom Institut für Gärungsgewerbe bezogenen Kulturen benötigten sämtlich kein Lactoflavin mehr.

Lactoflavintestes mit *Thermobacterium helveticum* angegebene „Hefesupplement“ bei unseren Stämmen keine Wirkung.

Bei den übrigen Stämmen wurden die Hemmungs- bzw. Enthemmungsversuche in den bereits veröffentlichten synthetischen Nährmedien<sup>11)12)</sup>, die kein Lactoflavin enthalten, angestellt. Die Art der jeweiligen Beimpfung bzw. Vorzüchtung der Stämme ist aus der folgenden Tafel 4 zu ersehen:

Tafel 4.  
Züchtung und Art der Beimpfung.

Mikroorganismen (Stämme)	Laufende Züchtung		Beimpfung				
	Medium	Überimpfung	Medium	Alter	Behandlung	Konz.	Öse
<i>Sbm. plantarum</i> (10 S. I. G.) .....	synth. a) 11)	2—3 Tage	synth. b) 11)	1½ Tage	—	1/10	1 mm
<i>Staph. aureus</i> (vR) ..	Glucose- Mn- Bouillon	2—3 Tage	Glucose- Mn- Bouillon	1—2 Tage	gewaschen 0.9% NaCl	1/1	2 mm
Hefe (M) .....	synth. <sup>12)</sup>	2—3 Tage	synth. <sup>12)</sup>	2—3 Tage	—	1/1	2 mm

a) mit  $10^{-7}$  g *p*-Amino-benzoesäure/ccm. b) mit  $10^{-9}$  g *p*-Amino-benzoesäure/ccm.

Die synthetische Nährlösung für die Versuche mit Hefe war wie folgt zusammengesetzt:

Nährboden für Hefe M.	g/ccm
Dinatriumphosphat + 2H <sub>2</sub> O (Merck 6580) .....	$0.83 \times 10^{-3}$
Monokaliumphosphat (nach Sörensen, Merck 4873) .....	$3.33 \times 10^{-4}$
Ammoniumsulfat (Merck 1217) .....	$1.0 \times 10^{-3}$
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (Merck 5882) .....	$4.42 \times 10^{-4}$
Ferricitrat (Merck Erg. B. 5) .....	$4.2 \times 10^{-5}$
Mn (II)-chlorid (Merck 5926) .....	$1.25 \times 10^{-5}$
Glucose (Merck 8341) <sup>a)</sup> .....	$2.0 \times 10^{-2}$
<i>l</i> -Cystein-hydrochlorid .....	$0.42 \times 10^{-4}$
<i>d,l</i> -Methionin (synth., Hoffmann-La Roche) <sup>b)</sup> .....	$0.5 \times 10^{-4}$
Glykokoll (synth., H. Stocker) <sup>b)</sup> .....	$5.0 \times 10^{-4}$
<i>d,l</i> -Alanin (synth., H. Stocker) <sup>b)</sup> .....	$5.0 \times 10^{-4}$
<i>d,l</i> -Valin (synth., H. Stocker) <sup>b)</sup> .....	$1.0 \times 10^{-4}$
<i>d,l</i> -Leucin (synth., H. Stocker) <sup>b)</sup> .....	$1.0 \times 10^{-4}$
<i>d,l</i> -Isoleucin (synth., H. Stocker) <sup>b)</sup> .....	$1.0 \times 10^{-4}$
<i>d,l</i> -Phenylalanin (synth., H. Stocker) <sup>b)</sup> .....	$1.0 \times 10^{-4}$
<i>l</i> -Tryptophan (nat., Hoffmann-La Roche) <sup>b)</sup> .....	$0.5 \times 10^{-4}$
<i>d,l</i> -Asparaginsäure (synth., H. Stocker) <sup>b)</sup> .....	$5.0 \times 10^{-4}$
<i>d,l</i> -Glutaminsäure (synth., H. Stocker) <sup>b)</sup> .....	$5.0 \times 10^{-4}$
<i>l</i> -Arginin-nitrat (nat., Hoffmann-La Roche) <sup>b)</sup> .....	$0.5 \times 10^{-4}$
Aneurinchlorid-hydrochlorid (synth., I. G.) .....	$1.0 \times 10^{-7}$
Nicotinsäure (aus Nicotin, Heyl & Co.) <sup>c)</sup> .....	$1.7 \times 10^{-7}$

<sup>11)</sup> R. Kuhn, E. F. Möller u. G. Wendt, B. 76, 405 [1943]. Es sei hier berichtigt, daß dort in der Nährlösung für *Staph. aureus* die Konz. von MgSO<sub>4</sub> + 7H<sub>2</sub>O, Ferricitrat und MnCl<sub>2</sub> + 4H<sub>2</sub>O 5-mal zu hoch angegeben sind.

<sup>12)</sup> R. Kuhn, L. Birkofer u. E. F. Möller, B. 76, 900 [1943].

Adeninsulfat (Hoffmann-La Roche) <sup>b)</sup> .....	4.3 × 10 <sup>-5</sup>
Biotinmethylester (Kögl) .....	2 × 10 <sup>-9</sup>
β-Alanin (synth., H. Stocker) .....	1 × 10 <sup>-5</sup>
<i>m</i> -Inosit (Schuchardt) .....	1 × 10 <sup>-5</sup>

mit NaOH (Merck p. a.) auf gewünschtes  $p_H$  einstellen.

Beimpfung mit Kultur, die bereits in vielen Passagen auf diesem Nährboden ( $p_H$  6.6) laufend gezüchtet wurde. 1 Öse 2 mm Ø.

a) Nach Aufkochen mit 1% Carbo activatus siccus (Merck) in wäbr. hochkonz. Lösung, durch Zugabe von mit Petroläther vergälltem Alkohol bis zu einem Gehalt von 70 Vol.-%, bei  $-20^{\circ}$  umkrystallisiert und erst über  $H_2SO_4$ , dann über  $P_2O_5$  bei Zimmertemp., schließlich über  $P_2O_5$  bei  $100^{\circ}$  im Vak. getrocknet.

b) Nach Aufkochen mit 1% Carbo activatus siccus (Merck) aus wäbr. Lösung umkrystallisiert und im Vak. über  $P_2O_5$  bei Zimmertemp. getrocknet.

c) 2-mal bei 0.1 mm sublimiert, 1-mal mit 1% Carbo act. sicc. (Merck) aus  $H_2O$  umkrystallisiert, über  $P_2O_5$  bei  $100^{\circ}$  im Vak. getrocknet.

## 166. Heinz Ohle, Marianne Hielscher und Gerda Noetzel: Die Spaltung der Tetraoxybutyl-chinoxaline, III. Mittell.\*). Der Reaktionsmechanismus.

[Aus d. Chem. Institut d. Universität Berlin.]

(Eingegangen am 10. Mai 1943.)

In der I. Mittell. dieser Reihe ist gezeigt worden, daß das 2-Oxy-3-[*d*-arabo-tetraoxybutyl]-chinoxalin (I) beim Kochen seiner wäßrigen Lösung mit der äquimolekularen Menge Phenylhydrazin eine Spaltung der Seitenkette erleidet. Von den Bruchstücken war eine in roten Nadeln krystallisierende Verbindung vom Schmp.  $278-279^{\circ}$  (Zers.) gefaßt worden, deren Zusammensetzung dem Phenylhydrazon des 2-Oxy-chinoxalin-3-aldehyds entspricht, die aber — wie vor kurzem<sup>1)</sup> ausgeführt worden ist — die Azostruktur II besitzt, und außerdem ein Stoff, der als unreines Tribenzoylglycerin angesprochen worden war, dessen Schmelzpunkt aber nicht auf den der reinen Verbindung hatte gebracht werden können. Bei der Nacharbeitung dieses Versuchs, der inzwischen wiederholt und in verschiedenen Abwandlungen stets in Schlißapparaturen durchgeführt worden ist, konnte dieser Stoff in keinem Falle wiedergefunden werden.

Unter den oben genannten Bedingungen fällt II stark verunreinigt und in schlechter Ausbeute an. Verwendet man indessen 3 Mol. Phenylhydrazin auf 1 Mol. I oder mehr, so erhält man II nach 40-stdg. Kochen sofort in analysenreinem Zustand und in praktisch quantitativer Ausbeute unter Verbrauch von 3 Mol. Phenylhydrazin und Bildung von je 1 Mol. Ammoniak und Anilin. Das Phenylhydrazin wirkt also auch hier — ähnlich wie bei der Osazon-Bildung — z. Tl. dehydrierend. Das demnach als 2. Spaltstück anzunehmende Glycerinaldehyd-phenylhydrazon (III) konnte nicht isoliert werden. Es wird offenbar weiter verändert. Von den Umwandlungsprodukten wurde in geringer Menge ein schlecht krystallisierter Stoff von der Zusammensetzung  $C_{15}H_{14}N_3$  isoliert, der durch Kondensation von Methylglyoxal mit je 1 Mol. Phenylhydrazin und Anilin entstanden gedacht werden kann. Die chemische Einheitlichkeit und Molekülgröße ist zweifelhaft.

\*) I. Mittell.: B. **67**, 155 [1934]; II. Mittell.: B. **70**, 2148 [1937].

<sup>1)</sup> B. **76**, 624 [1943].