

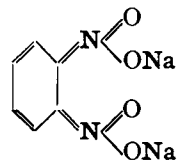
357. Richard Kuhn und Friedrich Weygand: *o*- und *p*-Nitro-phenylhydroxylamin.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizin. Forschung, Heidelberg, Institut für Chemie.]
(Eingegangen am 20. Juli 1936.)

Bei der Einwirkung von Fructose auf *m*-Dinitro-benzol in alkalischer Lösung beobachteten Chavassieu und Morel¹⁾ die Bildung eines violetten Farbstoffes. Diese Reaktion wird nach M. Peronnet und R. Truhaut²⁾ auch von Harnsäure gegeben. P. K. Bose³⁾ stellte fest, daß reines *m*-Dinitro-benzol keine Spur des Farbstoffes liefert und daß ein geringer Gehalt an *o*-Dinitro-benzol dafür verantwortlich ist⁴⁾. Reines *o*-Dinitro-benzol gibt eine äußerst intensive Violettfärbung nicht nur mit Aldosen und Ketosen, sondern auch mit mehrwertigen aromatischen Phenolen, die mindestens 2 Hydroxylgruppen in *o*- oder *p*-Stellung besitzen⁵⁾. M. Peronnet und R. Truhaut⁶⁾ haben die sehr empfindliche Reaktion zum Nachweis von Benzolspuren in der Luft, im Blut und in Organen herangezogen. P. K. Bose und S. Ram³⁾ beschrieben 26 aromatische *o*-Dinitro-Körper, die alle mit Harnsäure in alkalischer Lösung violette, mitunter auch gelbe, rote und blaue Farben liefern.

Die chemische Konstitution all dieser Farbstoffe, die noch in keinem Falle krystallisiert erhalten wurden, ist unbekannt geblieben. Am eingehendsten beschäftigte sich mit dem Farbstoff aus *o*-Dinitro-benzol J. Meisenheimer⁷⁾, der als Reduktionsmittel Hydroxylamin bzw. Stannit verwandte. Er erhielt ein tiefbraunes Dinatriumsalz, das sich mit schön blauer Farbe in Wasser löste und dem er die Zusammensetzung $C_6H_4N_2O_4Na_2$ zuschrieb. J. Meisenheimer nahm an, daß die Dinitro-Verbindung als Trien in 1.6-Stellung 2 H- bzw. Metall-Atome addiert:

In entsprechender Weise formulierte er das aus *p*-Dinitro-benzol in gleicher Weise erhältliche rote Dikaliumsalz. Im Gegensatz zu dieser Formulierung, die sich in der späteren Literatur immer wieder findet, stand das Verhalten gegenüber Oxydationsmitteln: „daß durch das Brom Nitro-nitrosobenzol gebildet wird, ist überraschend“. Man hatte mit der Rückbildung der Dinitro-Verbindung zu rechnen.



Es ist nun gelungen, die Reduktionsprodukte des *o*- und *p*-Dinitro-benzols, von denen sich die tief farbigen Alkalisalze ableiten, in schön krystallisierte Form zu gewinnen und damit auch die Konstitution der blauen bzw. roten Alkalisalze endgültig zu klären. Entscheidend hierfür war die Wahl eines Reduktionsmittels, das schon bei gewöhnlicher Temperatur und in kurzer Zeit spezifisch wirkt und das sich leicht von den empfindlichen Farbstoffen quantitativ abtrennen läßt. All diesen Anforderungen entspricht das Vitamin C.

¹⁾ Compt. rend. Acad. Sciences **143**, 966 [1906].

²⁾ Journ. Pharmac. Chim. [8] **18**, 339 [1933].

³⁾ Ztschr. analyt. Chem. **87**, 110 [1932]; Current Science **2**, 427 [1934]; P. K. Bose u. S. Ram, Journ. Indian. chem. Soc. **12**, 687 [1935].

⁴⁾ vergl. auch L. v. Szécsényi-Nagy, Biochem. Ztschr. **281**, 175, 178 [1935].

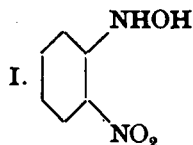
⁵⁾ P. K. Bose, Journ. Indian chem. Soc., Sir P. C. Ray Vol., 65 [1933].

⁶⁾ Bull. Soc. chim. France [4] **53**, 146 [1933].

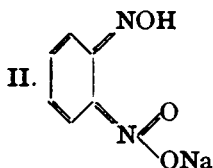
⁷⁾ B. **86**, 4174 [1903]; J. Meisenheimer u. E. Patzig, B. **89**, 2526 [1906].

Versetzt man eine soda-alkalische Lösung von Ascorbinsäure unter Stickstoff mit fein gepulvertem *o*-Dinitro-benzol, so geht dieses in wenigen Min. mit tief violettblauer Farbe vollständig in Lösung⁸⁾. Beim Ansäuern mit Eisessig schlägt die Farbe nach Orangegelb um, und man kann der wäßrigen Lösung mit Essigester den gebildeten Farbstoff entziehen. Dieser krystallisiert aus Benzol in braunorangefarbenen Säulen (Ausbeute 80—85% d. Th.) vom Schmp. 74°. Nach den Elementaranalysen und allen sonstigen Eigenschaften liegt das *o*-Nitro-phenylhydroxylamin (I, *N*-[2-Nitro-phenyl]-hydroxylamin) vor. Die Substanz ist also um 1 Sauerstoffatom ärmer als J. Meisenheimer angenommen hatte und die Bildung von *o*-Nitroso-nitrobenzol bei der Oxydation mit Brom ohne weiteres verständlich.

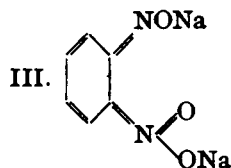
Das *o*-Nitro-phenylhydroxylamin (I) löst sich in Wasser und Alkohol mit gelber Farbe; auf Zusatz von verd. Sodalösung schlägt die Farbe in ein violettstichiges, tiefes Blau um unter Bildung des Mono-natrium-salzes II. In konz. Natronlauge löst es sich mit intensiv rotbrauner Farbe, wobei sich das Dinatriumsalz III bildet. Verdünnt man die rotbraune Lösung mit Wasser, so wird sie wieder violettstichig blau (Hydrolyse).



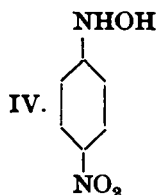
braunorange
(Schmp. 74°)



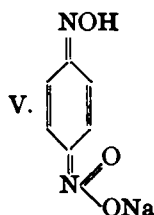
violettblau
(primäres Salz)



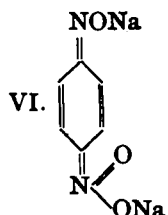
rotbraun
(sekundäres Salz)



citronengelb
(Schmp. 107°)



kirschrot
(primäres Salz)



gelb
(sekundäres Salz)

Für die präparative Darstellung des *o*-Nitro-phenylhydroxylamins empfiehlt es sich, an Stelle des *o*-Dinitro-benzols *o*-Nitroso-nitrobenzol mit Ascorbinsäure zu reduzieren. Da die Nitroso-nitro-Verbindung Zwischenprodukt bei der Synthese des Dinitrokörpers ist, wird die Oxydation der Nitroso- zur Nitrogruppe entbehrlich, und man benötigt auch zur anschließenden Reduktion weniger Ascorbinsäure. Überdies zeigte es sich, daß *o*-Nitroso-nitrobenzol durch das Vitamin schon in saurer Lösung glatt zur Stufe des Hydroxylamins reduzierbar ist, während die Reduktion der *o*-Dinitro-Verbindung durch Ascorbinsäure nur in alkalischer Lösung gelingt.

⁸⁾ Reduziert man mit Hexosen, so muß man erhitzen. Vermutlich stellt in diesem Falle das Reduktion von H. v. Euler und C. Martius (A. 505, 73 [1933]) das eigentliche Reduktionsmittel dar. Mit verd. Natronlauge erhitzte Glucose gibt nach dem Abkühlen auf Zusatz von *o*-Dinitro-benzol schon in der Kälte Blaufärbung.

Die Bildung von *o*-Nitro-phenylhydroxylamin wurde bereits angenommen von W. Lipschitz⁹⁾, der auf *o*-Dinitro-benzol frische Muskulatur einwirken ließ (Nitro-Atmung). Die Eigenschaften der krystallisierten Substanz beweisen die Richtigkeit der von W. Lipschitz gemachten Annahme. Wie schon J. Meisenheimer feststellte, gibt *o*-Nitroso-nitrobenzol mit alkoholischer Natronlauge Blaufärbung. Dies stützt aber nicht die frühere Formel, sondern beruht auf Reduktion zum *o*-Nitro-phenylhydroxylamin. Verwendet man zum Lösen des *o*-Nitroso-nitrobenzols Pyridin, so bildet sich auf Zusatz von Natronlauge der blaue Farbstoff nicht, sondern es tritt erst nach einiger Zeit Braunfärbung ein.

Aus *p*-Dinitro-benzol bzw. aus *p*-Nitroso-nitrobenzol gelang es, durch Reduktion mit Ascorbinsäure das *p*-Nitro-phenylhydroxylamin (IV, *N*-[4-Nitro-phenyl]-hydroxylamin) in citronengelben, feinen Nadeln vom Schmp. 107° darzustellen.

Es löst sich in verd. Sodalösung mit lebhaft kirschroter Farbe, die dem Mono-natriumsalz (V) zuzuschreiben ist. Durch verd. Natronlauge hellt sich die Farbe nach braunstichig gelb auf (Di-natriumsalz VI), beim vorsichtigen Ansäuern bildet sich zunächst das kirschrote Mononatriumsalz, dann das citronengelbe, freie *p*-Nitro-phenylhydroxylamin zurück. Die braunstichig gelbe Lösung des Dinatriumsalzes ist luftempfindlich. Sie verblaßt nach einiger Zeit unter Ausscheidung von Flocken. Offenbar liegt eine Katalyse durch Metallspuren vor, da nach Zusatz einer geringen Menge von Kaliumcyanid die gelbe Farbe sehr lange bestehen bleibt.

Das *o*-Nitro-phenylhydroxylamin ist eine äußerst empfindliche Substanz, die auch im krystallisierten Zustand schon wenige Std. nach der Darstellung in eine schwarzbraune, zähe Masse übergehen kann. Sorgfältig unter Stickstoff aus Benzol umkrystallisierte Präparate sind im Eisschrank (hoch evakuierter Röhren-Exsiccator) viele Wochen unverändert haltbar. Die *p*-Verbindung ist erheblich stabiler als die *o*-Verbindung.

Es ist zu erwarten, daß die Anwendung von Vitamin C die Darstellung sehr empfindlicher bisher unbekannter organischer Verbindungen noch in weiteren Fällen ermöglichen wird.

Beschreibung der Versuche.

Durch alle Lösungsmittel wird vor der Verwendung Stickstoff geleitet und es werden alle Operationen unter Stickstoff ausgeführt. Mit Ausnahme des Umkrystallisierens aus Benzol sind jedoch Spuren von Luft zulässig.

1) *o*-Nitro-phenylhydroxylamin.

a) Aus *o*-Nitroso-nitrobenzol in saurer Lösung: 0.40 g Ascorbinsäure¹⁰⁾ und 0.20 g fein gepulvertes *o*-Nitroso-nitrobenzol¹¹⁾ werden mit 10 ccm Wasser und 40 ccm Aceton übergossen. Beim Schütteln geht alles mit orangegelber Farbe in Lösung. Nach 10 Min. verdünnt man mit 300 ccm Wasser, schüttelt 3-mal mit Essigester (etwa 80, 50, 30 ccm) aus

⁹⁾ Zusammenfassung von W. Lipschitz bei C. Oppenheimer, Die Fermente. 5. Aufl., Bd. 3, S. 1135.

¹⁰⁾ F. Hoffmann-La Roche & Co. A.-G., Berlin.

¹¹⁾ Aus *o*-Nitrilanilin mit Sulfomonopersäure nach E. Bamberger u. R. Hübner, B. 86, 3803 [1903]; ohne Wasserdampfdestillation aus Alkohol krystallisiert. Schmp. 126—127°.

und wäscht mit 100 ccm Wasser. Den in dieses gehenden Farbstoff nimmt man wieder in 30 ccm Essigester auf. Die vereinigten Essigester-Auszüge werden über Natriumsulfat getrocknet, im Vakuum verdampft und der Rückstand aus wenig heißem Benzol umkrystallisiert. Ausbeute 0.16 g (80% d. Th.).

b) Aus *o*-Nitroso-nitrobenzol in alkalischer Lösung: 0.30 g fein gepulvertes *o*-Nitroso-nitrobenzol werden in eine Lösung von 0.50 g Ascorbinsäure in 30 ccm Wasser + 10 ccm Aceton + 10 ccm 2-n. Natronlauge eingetragen. Die Flüssigkeit färbt sich sofort tief violett, und die Nitroso-nitro-Verbindung geht im Laufe weniger Min. in Lösung. Die Isolierung des *o*-Nitro-phenylhydroxylamins erfolgt nach den unter c) gemachten Angaben. Ausbeute nach dem Umkrystallisieren aus Benzol 0.18 g (59% d. Th.).

c) Aus *o*-Dinitro-benzol: 0.20 g *o*-Dinitro-benzol werden in 20 ccm Aceton gelöst. Hierauf gibt man 20 ccm Wasser, 4 ccm 2-n. Natronlauge und zuletzt 0.60 g Ascorbinsäure zu. Nach 10 Min. verdünnt man die tief violette Lösung mit 200 ccm Wasser und 10 ccm 2-n. Natronlauge und schüttelt mit 50 ccm Essigester durch. Dieser nimmt nicht salzbildende Stoffe aber auch einen Teil des durch Hydrolyse entstehenden freien *o*-Nitro-phenylhydroxylamins mit gelber Farbe auf, das man dem Essigester mit etwas verd. Natronlauge wieder entzieht.

Die vereinigten tief violetten alkalischen Lösungen versetzt man tropfenweise mit Eisessig bis zum Umschlag nach gelb und schüttelt 1-mal mit 100 ccm dann noch 2-mal mit je 50 ccm Essigester durch. Die vereinigten Essigester-Auszüge wäscht man mit 100 ccm Wasser und schüttelt den in Wasser gehenden Farbstoff wieder mit 20 ccm Essigester aus. Hierauf trocknet man über Natriumsulfat, verdampft im Vakuum und krystallisiert den Rückstand aus wenig siedendem Benzol um. Man erhält 0.153 g (83% d. Th.) *o*-Nitro-phenylhydroxylamin vom Schmp. 74° (k. Th., unt. Zers.).

Zur Analyse wurde bei 20° über Paraffin (0.01 mm) getrocknet.

4.097 mg Sbst.: 7.06 mg CO₂, 1.47 mg H₂O. ··· 2.134 mg Sbst.: 0.342 ccm N (23°, 750 mm).

C₆H₆O₃N₂ (154.06). Ber. C 46.73, H 3.92, N 18.18.

Gef. „ 47.00, „ 4.02, „ 18.24.

Die Substanz stellt unter dem Mikroskop bernsteingelbe, lange, 6-kantige Säulen dar, die an den Enden gerade abgeschnitten sind und zwischen gekreuzten Nicols gerade Auslöschung zeigen. Makroskopisch betrachtet ist die Farbe: Krystalle braunorange, konzentrierte Lösungen orangegelb, verdünnte Lösungen gelb. In Alkohol, Essigester, Chloroform ist das *o*-Nitro-phenylhydroxylamin sehr leicht, in Wasser gut, in Benzin sehr schwerlöslich. In konz. Schwefelsäure löst es sich unter Erwärmung mit braungelber Farbe. Sein Geschmack ist brennend. Der Geruch erinnert ein klein wenig an den des Phenylhydroxylamins, überwiegend aber an den des Nitrobenzols. Er ist von dem des *o*-Nitroso-nitrobenzols, das als Produkt der Autoxydation für den Geruch verantwortlich sein könnte, erheblich verschieden. In kleinen Mengen läßt sich die Substanz im Hochvakuum (0.001 mm) unzersetzt sublimieren, wenn man mit der Temperatur unter dem Schmp. (74°) bleibt (siedendes Chloroform = 61°).

Titration: Man läßt die Lösung des *o*-Nitro-phenylhydroxylamins in 50-proz. Alkohol aus einer Bürette zu einer gemessenen Menge Kalium-

ferricyanid in 2-n. Sodalösung fließen bis die Blaufärbung bestehen bleibt. Die Titration wird unter Stickstoff ausgeführt, der Umschlag ist scharf.

10 ccm Kaliumferricyanid ($893.5 \text{ mg } K_3Fe(CN)_6$ in 250 ccm 2-n. Na_2CO_3) verbrauchten bei 20° $5.35 \text{ ccm } o\text{-Nitro-phenylhydroxylamin}$ (15.625 mg Sbst. in 5 ccm Alkohol + 5 ccm Wasser). Der Verbrauch entsprach $0.1086:0.05426 = 2.00 \text{ Mol.}$ Ferricyanid in genauer Übereinstimmung mit der für die Bildung von *o*-Nitroso-nitrobenzol berechneten Menge. In einem präparativen Versuch wurde das Oxydationsprodukt mit Benzol ausgeschüttelt (grüne Lösung) und in Substanz isoliert.

Läßt man bei der Titration die Ferricyanid-Lösung zum Nitro-phenylhydroxylamin fließen, so findet man zu tiefe Werte (z. B. 1.57 und 1.64 Mol.), da sich das gebildete *o*-Nitroso-nitrobenzol offenbar mit dem Hydroxylamin kondensiert¹²).

Katalytische Hydrierung: 0.015 g Platinoxid wurden in 5 ccm absol. Alkohol mit Wasserstoff reduziert und hierauf $0.0245 \text{ g } o\text{-Nitro-phenylhydroxylamin}$ zugegeben. Der H_2 -Verbrauch kam nach schneller Entfärbung bei 14.8 ccm (752 mm , 16°) nach 20 Min. zum Stillstand. Gef. $3.88 \text{ Mol. } H_2$; Ber. 4.00 Mol. für die Bildung von *o*-Phenylendiamin. Die vom Katalysator abfiltrierte Lösung wurde mit der berechneten Menge (0.034 g) Phenanthrenchinon in Eisessig zum Sieden erhitzt. Im Eisschrank krystallisierte das Phenantrophenzazin (75% d. Th.) aus. Schmp. 226° , Vergleichspräparat 225° , Mischprobe 225° (k. Th.).

Absorptions-Spektrum. Die violettstichig blaue Lösung von *o*-Nitro-phenylhydroxylamin in verd. Sodalösung zeigt im Gitter-Meßspektroskop (Löwe-Schumm, ohne Lichtfilter) 3 Absorptionsbanden, deren Schwerpunkte bei 587, 546 und etwa $500 \text{ m}\mu$ liegen.

2) *p*-Nitro-phenylhydroxylamin.

0.40 g fein gepulvertes *p*-Dinitro-benzol werden in eine Lösung von 1.2 g Ascorbinsäure in 20 ccm Wasser + 20 ccm Alkohol + 10 ccm 2-n. Sodalösung eingetragen. Das Reaktionsgemisch färbt sich sofort tief kirschrot. Die Isolierung erfolgt in der für die *o*-Verbindung unter c) beschriebenen Weise. Aus siedendem Benzol unter Stickstoff erhält man 0.24 g (65% d. Th.) *p*-Nitro-phenylhydroxylamin vom Schmp. 107° (k. Th., unt. Zers.).

Zur Analyse wurde über Paraffin (0.001 mm) getrocknet.

4.438 mg Sbst.: $7.65 \text{ mg } CO_2$, $1.63 \text{ mg } H_2O$. -- 2.691 mg Sbst.: 0.435 ccm N (751 mm , 25°).

$C_6H_6O_3N_2$ (154.06). Ber. C 46.73 , H 3.92 , N 18.18 .

Gef. „ 47.01 , „ 4.11 , „ 18.30 .

Die *p*-Verbindung scheidet sich aus Methanol in citronengelben, haarfeinen Nadelchen, aus Benzol in schmetterlingförmig angeordneten Tetradern aus. Die Substanz ist gut löslich in Methanol, Alkohol und Essigester, schwerer in Chloroform, mäßig in Wasser, unlöslich in Benzin. Die Farbe der Lösungen ist citronengelb. Konz. Schwefelsäure löst unter Erwärmung ohne

¹²) vergl. die Titration von Phenylhydroxylamin u. a. mit Jod nach K. Brand u. J. Mahr, Journ. prakt. Chem. [2] **131**, 97 [1931] 115.

Halochromie. Die Substanz schmeckt im ersten Augenblicke schwach süßlich, dann äußerst brennend (viel stärker als die *o*-Verbindung). Das Einatmen des Staubes verursacht schwachen Nießreiz. In kleinen Mengen läßt sich die Verbindung unter 10^{-3} mm unzersetzt sublimieren, wenn die Temperatur 100° nicht überschreitet. Die Sublimation gelingt nicht so leicht wie bei der *o*-Verbindung.

Der Justus-Liebig-Gesellschaft danken wir für die Gewährung eines Stipendiums.

**358. Richard Kuhn und Hermann Rudy:
Katalytische Wirkung der Lactoflavin-5'-phosphorsäure; Synthese
des gelben Ferments.**

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

(Eingegangen am 22. Juli 1936.)

Die ausgehend von synthetischem Lactoflavin¹⁾ über die 5'-Trityl-2'.3'.4'-Triacetyl-5'-trityl- und 2'.3'.4'-Triacetyl-Verbindung gewonnene Lactoflavin-5'-phosphorsäure²⁾ reagiert bei neutraler Reaktion mit dem nach H. Theorell³⁾ dargestellten kolloiden Träger des gelben Ferments von O. Warburg und W. Christian⁴⁾ unter Bildung eines nicht fluoreszierenden, nicht dialysierbaren Chromoproteids, das sich wie das natürlich vorkommende Ferment durch verd. Säure wieder in seine Komponenten zerlegen läßt.

Die Verbindung der Lactoflavin-5'-phosphorsäure mit dem kolloiden Träger vermag in den von O. Warburg und W. Christian angegebenen Systemen Neuberg-Ester sowie Robison-Ester katalytisch zu oxydieren. Die Reaktionsgeschwindigkeiten haben wir sowohl nach T. Thunbergs Methode (Entfärbung von Methylenblau) wie manometrisch nach O. Warburg (Sauerstoff-Verbrauch) gemessen. Zum Vergleich diene das aus demselben kolloiden Träger und der natürlichen Flavinphosphorsäure nach H. Theorell unter genau gleichen Bedingungen dargestellte Chromoproteid, welches wie Theorell gezeigt hat und wir bestätigen können, mit dem natürlichen gelben Ferment identisch ist.

Das Ergebnis des Vergleichs ist, daß aus der natürlichen Flavinphosphorsäure und der synthetischen Lactoflavin-5'-phosphorsäure durch Kupplung mit dem kolloiden Träger Verbindungen entstehen, deren katalytische Wirksamkeiten unter allen geprüften Bedingungen quantitativ übereinstimmen.

¹⁾ Aus 1.2-Dimethyl-4.5-dinitro-benzol; R. Kuhn, H. Rudy u. F. Weygand, B. **68**, 625 [1935]; B. **68**, 1765 [1935].

²⁾ R. Kuhn, H. Rudy u. F. Weygand, B. **69**, 1543 [1936].

³⁾ Biochem. Ztschr. **278**, 263 [1935].

⁴⁾ Naturwiss. **20**, 688, 980 [1932]; Biochem. Ztschr. **254**, 438 [1932]; **257**, 492 [1933].