

16. Friedrich Weygand, Rudolf Löwenfeld und Ernst-Friedrich Möller: Über die Spezifität von 6.7-Dichlor-9-d-ribo-flavin als Antagonist des Lactoflavins

[Aus dem Chemischen Institut der Universität Heidelberg und dem Max Planck-Institut für Medizinische Forschung, Institut für Chemie, Heidelberg]

(Eingegangen am 4. Juli 1950)

Vor 12 neu hergestellten halogenhaltigen Flavinen mit verschiedenartigen Seitenketten in 9-Stellung übertrifft keines die Hemmwirkung von 6.7-Dichlor-9-d-ribo-flavin. Mit Ausnahme des 6.7-Dibrom-9-d-ribo-flavins, das $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{8}$ der Wirksamkeit von 6.7-Dichlor-9-d-ribo-flavin zeigt, sind alle neuen Flavine bedeutend schwächere Hemmstoffe. Als Teststamm diente das lactoflavinbedürftige *Streptobacterium plantarum* P 32. Die Flavinsynthesen wurden nach den üblichen Verfahren durchgeführt. 6.7-Difluor-flavine und „Diflavine“ konnten nicht in kristallisiertem Zustand erhalten werden.

Im 6.7-Dichlor-9-d-ribo-flavin wurde 1943 von R. Kuhn, F. Weygand und E. F. Möller¹⁾ der erste Antagonist des Lactoflavins aufgefunden²⁾. Es hemmte das Wachstum verschiedener lactoflavinbedürftiger oder wenig Lactoflavin synthetisierender Bakterien, während die reichlich synthetisierende Hefe nicht gehemmt wurde. Schon damals zeigte es sich, daß die Wirkung des 6.7-Dichlor-9-d-ribo-flavins recht spezifisch ist, denn Flavine mit oder ohne 6.7-ständige Methylgruppen und mit veränderter Seitenkette in 9-Stellung, ferner deren Zwischenprodukte bei der Synthese waren unwirksam.

Inzwischen wurden Flavine hergestellt (vergl. Tafel 1), die dem 6.7-Dichlor-9-d-ribo-flavin näher verwandt sind, und zwar Verbindungen, in denen

- 1.) die 9-ständige Seitenkette verändert ist, oder
- 2.) die Chloratome durch andere Halogene (Br, F) ersetzt sind und
- 3.) in denen beide Veränderungen vorgenommen sind.

Die neuen Verbindungen wurden im Vergleich zu 6.7-Dichlor-9-d-ribo-flavin bei dem lactoflavinbedürftigen *Streptobacterium plantarum* P 32 geprüft. Als Ersatzstoffe für Lactoflavin (Wuchsstofftest) sind sie praktisch wirkungslos. In sehr kleinen Konzentrationen zeigen einige der Stoffe sehr schwache Wuchsstoffwirkung, die bei weiter ansteigender Konzentration wieder verschwindet. Im Hemmstofftest in Gegenwart einer fast optimalen Lactoflavin-Konzentration (1.7×10^{-8} g/ccm) erreichte keine der neuen Verbindungen die Wirksamkeit

¹⁾ B. 76, 1044 [1943].

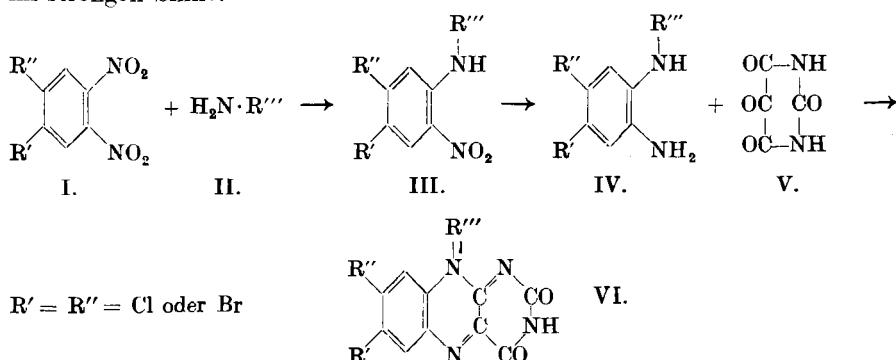
²⁾ Inzwischen sind weitere Antagonisten des Lactoflavins (mikrobiologische Teste) bekannt geworden: 2.4-Diamino-7.8-dimethyl-10-d-ribityl-5.10-dihydro-phenazin (D. W. Woolley, Journ. biol. Chem. 154, 31 [1944]), Lumilactoflavin (H. P. Sarett, Journ. biol. Chem. 162, 87 [1946]), verschiedene Antimalariamittel, wie Atebrin (M. Silvermann, Journ. biol. Chem. 150, 256 [1943]), Pyrimidine und Chinine u.a. (F. H. S. Curd, Journ. chem. Soc. London 1946, 343; R. Hull, B. J. Lowell, H. T. Openshaw, L. C. Payman u. A. R. Todd, Journ. chem. Soc. London 1946, 357; F. H. S. Curd u. F. L. Rose, Journ. chem. Soc. London 1946, 362; F. H. S. Curd, C. G. Raison u. F. L. Rose, Journ. chem. Soc. London 1946, 366; F. H. S. Curd, M. J. Davis, E. C. Owen, F. L. Rose u. G. A. Tucy, Journ. chem. Soc. London 1946, 370).

des 6.7-Dichlor-9-*d*-ribo-flavins. Lediglich das 6.7-Dibrom-9-*d*-ribo-flavin hatte noch eine 4–8 mal geringere Hemmwirkung, während die anderen Verbindungen erst in 30–500 mal größerer Konzentration Bakteriostase zeigten.

Tafel 1. 6.7.9-Substituierte Flavine und ihre Hemmwirkung

Nr.				Bezeichnung der Verbindungen	Konzentration in g/ccm, die das Wachstum von <i>Sbm. plantarum</i> P 32 auf die Hälfte herabsetzt (28°, 24 Std.) bei 1.7×10^{-8} g/ccm Lactoflavin
	R'	R''	R'''		
1	Cl	Cl	<i>d</i> -ribityl	6.7-Dichlor-9- <i>d</i> -ribo-flavin	$0.5\text{--}1.0 \cdot 10^{-6}$
2	Cl	Cl	<i>d</i> -arabityl	6.7-Dichlor-9- <i>d</i> -arabo-flavin	$<32 \cdot 10^{-6}$
3	Cl	Cl	<i>l</i> -arabityl	6.7-Dichlor-9- <i>l</i> -arabo-flavin	$<16 \cdot 10^{-6}$
4	Cl	Cl	<i>d</i> -glucityl	6.7-Dichlor-9- <i>d</i> -gluco-flavin	$64 \cdot 10^{-6}$
5	Cl	Cl	<i>d</i> -galaktityl	6.7-Dichlor-9- <i>d</i> -galakto-flavin	$16\text{--}32 \cdot 10^{-6}$
6	Cl	Cl	<i>l</i> -rhamnityl	6.7-Dichlor-9- <i>l</i> -rhamno-flavin	$8\text{--}16 \cdot 10^{-6}$
7	Cl	Cl	β -oxy-äthyl	6.7-Dichlor-9-[β -oxy-äthyl]-flavin	$32 \cdot 10^{-6}$
8	Br	Br	<i>d</i> -ribityl	6.7-Dibrom-9- <i>d</i> -ribo-flavin	$4 \cdot 10^{-6}$
9	Br	Br	<i>d</i> -galaktityl	6.7-Dibrom-9- <i>d</i> -galakto-flavin	$32 \cdot 10^{-6}$
10	Br	Br	<i>l</i> -arabityl	6.7-Dibrom-9- <i>l</i> -arabo-flavin	$32\text{--}64 \cdot 10^{-6}$
11	F	H	<i>d</i> -ribityl	6-Fluor-9- <i>d</i> -ribo-flavin	$>256 \cdot 10^{-6}$
12	F	H	<i>l</i> -arabityl	6-Fluor-9- <i>l</i> -arabo-flavin	$>>256 \cdot 10^{-6}$
13	F	H	<i>d</i> -galaktityl	6-Fluor-9- <i>d</i> -galakto-flavin	$>>256 \cdot 10^{-6}$

Seinerzeit¹⁾ war bereits gefunden worden, daß so große Konzentrationen von 6.7-Dichlor-9-*d*-ribo-flavin wie 10^{-4} g/ccm bei *Staphylococcus aureus* und Stuhlstamm St 19 von entsprechend höheren Konzentrationen an Lactoflavin enthemmt werden. Wir fanden nun mit *Sbm. plantarum* P 32, daß über ein großes Konzentrationsgebiet kompetitiver Antagonismus vorliegt, wenn auch nicht im strengen Sinne.

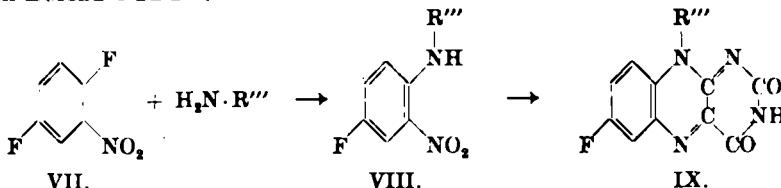


Das 6.7-Dichlor-9-*d*-ribo-flavin hemmte nicht nur bei einer weiteren Reihe lactoflavinbedürftiger Bakterien, sondern auch bei Bakterien mit beträchtlichem Synthesevermögen für Lactoflavin. Eine weitere Arbeit wird dies im einzelnen behandeln.

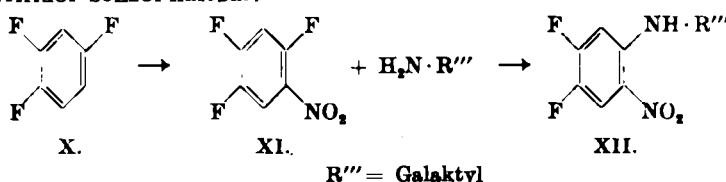
Die Synthese der Flavine Nr. 2–10 (VI) erfolgte durch Kondensation der entsprechenden Diamine (IV) mit Alloxan-Borsäure³⁾. Zu den Diaminen (IV) kam man durch Umsetzung von 4,5-Dichlor- bzw. 4,5-Dibrom-1,2-dinitrobenzol (I) mit Aminen (II) und katalytische Reduktion¹⁾.

Diese Synthesen boten keine Schwierigkeiten.

Zur Synthese der 6-Fluor-9-polyoxyalkyl-flavine (Nr. 11–13) ging man vom 1,4-Difluor-2-nitro-benzol (VII) aus, kondensierte dieses mit den erforderlichen Zuckeraminen zu VIII, reduzierte zu den Diaminen und kondensierte mit Alloxan-Borsäure zu IX.



Wir haben auch Versuche unternommen, um zu einem 6,7-Difluor-9-polyoxyalkyl-flavin zu gelangen. Aus 1,2,4-Trifluor-benzol (X) erhielten wir durch Nitrieren mit Salpeter-Schwefelsäure bei 0° eine Mononitroverbindung, der analog den Ergebnissen der Nitrierung von 1,2,4-Trichlor-benzol zum 1,2,4-Trichlor-5-nitro-benzol⁴⁾ die Konstitution des 1,2,4-Trifluor-5-nitro-benzols (XI) zukommen muß. Es ist im Gegensatz zum 1,2-Difluor-benzol und zum 1,2,4-Trifluor-benzol haltbar.

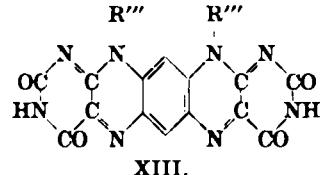


$R''' = \text{Galaktyl}$

Seine Kondensation mit *d*-Galaktamin gelang bereits bei Zimmertemperatur in natriumhydrogencarbonathaltiger Lösung oder bei einem Überschuß des Amins. Ein Fluoratom ist demnach ebenso reaktionsfähig wie im 2,4-Dinitro-fluorbenzol⁵⁾, das unter gleichen Bedingungen mit Zuckeraminen reagiert (vergl. Versuchsteil). Das erhaltene 1,2-Difluor-4-nitro-5-*d*-galaktylamino-benzol (XII) lieferte nach der katalytischen Reduktion zum

Diamin und dessen Kondensation mit Alloxan-Borsäure zwar grün fluorescierende Lösungen, doch konnte kein kristallisiertes Difluorflavin isoliert werden.

Auch Versuche zur Synthese von „Diflavinen“ der Konstitution XIII waren nicht erfolgreich.

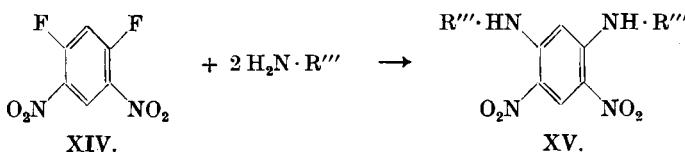


³⁾ R. Kuhn u. F. Weygand, B. **68**, 1282 [1935].

⁴⁾ F. Beilstein u. A. Kurbatow, A. **102**, 236 [1878].

⁵⁾ Umsetzungen mit Aminosäuren und Proteinen: F. Sanger, Biochem. Journ. **39**, 507 [1945], **40**, 261 [1946], **45**, 563 [1949]; R. R. Porter u. F. Sanger, Biochem. Journ. **42**, 287 [1948].

Wiederum gelang die Darstellung der benötigten Zwischenprodukte (XV) durch Kondensation von 1,3-Difluor-4,6-dinitro-benzol (XIV) mit Methylamin,



l-Arabinamin oder *d*-Galaktamin⁶). Nach der Hydrierung zu den Tetraaminen und Kondensation mit Alloxan-Borsäure konnten keine definierten Verbindungen isoliert werden.

Beschreibung der Versuche

1.) Mikrobiologische Versuche

Als Teststamm diente *Streptobacterium plantarum* P 32, das Lactoflavinbedürftig ist und zu optimalem Wachstum $2 \cdot 10^{-8}$ g/cm Lactoflavin benötigt. Als Nährmedium wurde das „Acetat“-Medium⁷) verwendet. Die Beimpfung der Versuchsröhrchen geschah aus einer Vorpassage in demselben Medium mit optimaler Lactoflavinmenge mit einer Öse $\varnothing 2$ mm, 1 mm Stärke. Die Bebrütungstemperatur war 28°, die Versuchsdauer betrug 48 Std., die Messung der Stärke des Wachstums erfolgte mit dem Lange-Photometer.

Die Flavinlösungen wurden bis auf die der Fluorflavine folgendermaßen hergestellt: 10 mg Flavin wurden 15 Min. bei 105° trocken sterilisiert, in 2 ccm steriler $n/10$ NaOH und 5 ccm Wasser kalt gelöst, mit $n/10$ CH₃CO₂H neutralisiert und auf 10 ccm aufgefüllt. Von diesen Lösungen wurde für die Verdünnungsreihen sofort abpipettiert. Bei hohen Konzentrationen fielen einige Verbindungen allmählich wieder aus; solche Versuchsröhrchen wurden nicht ausgewertet. Die Fluorflavine lösen sich leichter in Wasser und brauchen daher nicht über die Natriumsalze in Lösung gebracht zu werden.

Die Sterilisation der halogenhaltigen Flavine kann nur in der Kälte (Filtration durch ein Jenaer Bakterienfilter) oder in trockenem Zustand in der Hitze erfolgen, da sie sich selbst in rein wäßr. Lösung in der Hitze langsam verändern (Verminderung der Hemmwirkung). Erhitzen mit der Nährlösung oder mit β -Resorcylsäure als Lösungsvermittler führt zu sehr erheblichen Verminderungen der Wirksamkeit.

Bei Prüfung auf Wuchsstoffwirkung wurde im lactoflavinfreien Nährmedium gearbeitet, bei Prüfung auf Hemmstoffwirkung enthielt das Nährmedium die fast optimale Konzentration von $1.7 \cdot 10^{-8}$ g/cm Lactoflavin.

2.) Chlorhaltige Verbindungen

1,2-Dichlor-4-nitro-5-*l*-arabitylamino-benzol: 1.3 g *l*-Arabinamin und 1.5 g 1,2-Dichlor-4,5-dinitro-benzol⁸) wurden in 20 ccm 80-proz. Alkohol 1 Stde. unter Rückfluß erhitzt. Ausb. 1 g; aus Alkohol orangegelbe Kristalle vom Schmp. 230°.

C₁₁H₁₄O₆N₂Cl₂ (341.2) Ber. C 38.70 H 4.16 N 8.21 Gef. C 38.85 H 4.18 N 9.33.

6,7-Dichlor-9-*l*-arabo-flavin: 1.0 g 1,2-Dichlor-4-nitro-5-*l*-arabitylamino-benzol wurden in 50 ccm 70-proz. Alkohol mit Platinoxyd + Wasserstoff reduziert, wobei 3.2 Mol. Wasserstoff aufgenommen wurden. Beim Abdampfen des Lösungsmittels i. Vak. hinterblieb das Diamin als feste, weiße Masse. Es wurde in 50 ccm Eisessig aufgenommen und bei 50° mit einer kurz aufgekochten Lösung von 0.7 g Alloxan-tetrahydrat + 1.3 g Borsäure in 50 ccm Eisessig versetzt. Man erhitzte auf 80° und ließ dann abkühlen. Am nächsten Tag wurde mit 100 ccm Wasser verdünnt und i. Vak. zur Trockne

⁶⁾ Auch diese Kondensationen gelingen bereits bei Zimmertemperatur, was den Anlaß zur Verwendung von 1,3-Difluor-4,6-dinitro-benzol in der Protein- und Aminosäurenchemie bot (H. Zahn, Kolloid-Ztschr. im Druck).

⁷⁾ E. F. Möller, F. Weygand u. A. Wacker, Ztschr. Naturforsch. 5b, 18 [1950].

⁸⁾ P. Hartley u. J. B. Cohen, Journ. chem. Soc. London 85, 867 [1904].

verdampft. Zur Beseitigung der Borsäure wurde 3 mal mit je 30 ccm Methanol abgedampft. Das borsäurehaltige Flavin ist in Methanol gut löslich, das borsäurefreie aber nicht; Ausb. etwa 0.8 g. Das Rohprodukt wurde mit 80-proz. Essigsäure ausgekocht, wobei sich nur wenig löste. Den Rückstand kristallisierte man 2 mal aus viel Wasser um, wobei man die währ. Lösungen i. Vak. konzentrierte. Orangegegelbe Nadeln vom Schmp. 284° (Zers.).

$C_{15}H_{14}O_6N_4Cl_2$ (417.2) Ber. C 43.18 H 3.38 N 13.43 Cl 17.00
Gef. C 43.17 H 3.14 N 13.39 Cl 17.05.

1.2-Dichlor-4-nitro-5-d-arabitylamino-benzol: Es wurde analog der l-Verbindung gewonnen. Schmp. 228–230° nach Umkristallisieren aus 50-proz. Alkohol.

$C_{11}H_{14}O_6N_4Cl_2$ (341.2) Ber. C 38.70 H 4.16 Gef. C 39.07 H 4.47.

6.7-Dichlor-9-d-arabo-flavin: Analog der l-Verbindung erhalten. Orangegegelbe Nadeln vom Schmp. 286° (Zers.).

$C_{15}H_{14}O_6N_4Cl_2$ (417.2) Ber. C 43.18 H 3.38 N 13.43 Cl 17.00
Gef. C 43.64 H 3.63 N 12.86 Cl 17.20.

1.2-Dichlor-4-nitro-5-l-rhamnitylamino-benzol: Darstellung aus 1.8 g l-Rhamnamin und 1.3 g 1.2-Dichlor-4.5-dinitro-benzol in 20 ccm 80-proz. Alkohol durch 1-stdg. Kochen unter Rückfluß. Aus 50-proz. Alkohol orangegegelbe Prismen vom Schmp. 208°.

$C_{15}H_{14}O_6N_4Cl_2$ (355.2) Ber. C 40.84 H 4.47 N 7.94 Gef. C 40.81 H 4.22 N 7.86.

6.7-Dichlor-9-l-rhamno-flavin: 0.9 g 1.2-Dichlor-4-nitro-5-l-rhamnitylamino-benzol wurden in 70-proz. Alkohol zum Diamin katalytisch reduziert, das sich nach dem Verdampfen des Lösungsmittels i. Vak. als feste weiße Masse ausschied. Die Kondensation zum Flavin wurde mit 0.5 g Alloxan-tetrahydrat und 0.9 g Borsäure in 100 ccm Eisessig vorgenommen; Ausb. 0.7 g Rohprodukt. Nach 2maligem Umkristallisieren aus viel Wasser gelbe Nadeln vom Schmp. 270° (Zers.).

$C_{16}H_{16}O_6N_4Cl_2$ (431.2) Ber. C 44.56 H 3.74 N 12.99 Cl 16.45
Gef. C 44.30 H 4.19 N 12.91 Cl 16.31.

1.2-Dichlor-4-nitro-5-d-galaktitylamino-benzol: 1.3 g d-Galaktamin und 0.6 g 1.2-Dichlor-4.5-dinitro-benzol in 20 ccm 80-proz. Alkohol wurden 4 Stdn. unter Rückfluß gekocht. 0.6 g orangegegelbe Plättchen vom Schmp. 234° nach Umkristallisieren aus Alkohol.

$C_{12}H_{16}O_6N_4Cl_2$ (371.2) Ber. C 38.84 H 4.31 N 7.55 Gef. C 38.92 H 4.61 N 7.23.

6.7-Dichlor-9-d-galakto-flavin: 1.0 g 1.2-Dichlor-4-nitro-5-d-galaktitylamino-benzol wurde in 70-proz. Alkohol zum Diamin hydriert und dieses mit Alloxan-Borsäure in Eisessig bei 50° zum Flavin kondensiert; Ausb. 0.9 g Rohprodukt. Aus ganz verd. Essigsäure gelbe Nadeln vom Schmp. 258° (Zers.); bei langsamem Erhitzen liegt der Zersetzungspunkt tiefer.

$C_{16}H_{16}O_7N_4Cl_2$ (447.2) Ber. C 42.97 H 3.60 N 12.53 Cl 15.96
Gef. C 42.84 H 4.02 N 12.18 Cl 15.80.

1.2-Dichlor-4-nitro-5-d-glucitylamino-benzol: 3 g d-Glucamin in 10 ccm Alkohol + 4 ccm Wasser + 1.5 g 1.2-Dichlor-4.5-dinitro-benzol wurden 3 Stdn. unter Rückfluß gekocht. 1.5 g feine orange Nadeln (aus Alkohol) vom Schmp. 189°.

$C_{12}H_{16}O_6N_4Cl_2$ (371.2) Ber. C 38.84 H 4.31 N 7.55 Gef. C 39.02 H 4.62 N 7.55.

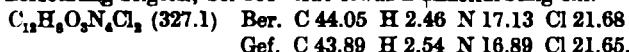
6.7-Dichlor-9-d-gluco-flavin: Nach Hydrierung von 1 g 1.2-Dichlor-4-nitro-5-d-glucitylamino-benzol zum Diamin wurde mit 0.55 g Alloxan-tetrahydrat + 1 g Borsäure in 100 ccm Eisessig zum Flavin kondensiert; Ausb. 1 g. Nach 2maligem Umkristallisieren aus verd. Essigsäure orangegegelbe Nadeln vom Schmp. 240° (Zers.).

$C_{14}H_{16}O_7N_4Cl_2$ (447.2) Ber. N 12.53 Cl 15.86 Gef. N 12.33 Cl 15.71.

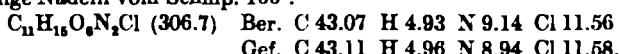
1.2-Dichlor-4-nitro-5-[β -oxy-äthylamino]-benzol: Entsteht aus 0.7 g β -Oxy-äthylamin und 1.2 g 1.2-Dichlor-4.5-dinitro-benzol durch 2-stdg. Kochen in 10 ccm Alkohol. Aus Alkohol rotorange Prismen vom Schmp. 145°.

$C_8H_8O_7N_4Cl_2$ (251.2) Ber. C 38.25 H 5.15 N 11.15 Gef. C 38.75 H 3.27 N 11.27.

6.7-Dichlor-9-[β -oxy-äthyl]-flavin: Bildet sich aus 0.8 g 1.2-Dichlor-4-nitro-5-[β -oxy-äthylamino]-benzol durch Hydrieren zum Diamin und Kondensation mit 0.75 g Alloxan-tetrahydrat + 1.2 g Borsäure in Eisessig. Das rohe Flavin wurde nach Abdampfen mit Methanol zunächst 3 mal durch Lösen in eiskalter verd. Natronlauge und Zugabe von Eisessig umgefällt. Durch Lösen in 90-proz. Essigsäure und Zugabe von Wasser wurde es kristallisiert erhalten. Zu Büscheln vereinigte gelbe Nadeln, die bis auf 480° erhitzt keine Zersetzung zeigten; bei 300° trat etwas Dunkelfärbung ein.

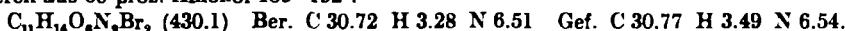


4-Chlor-2-nitro-1-d-ribitylamino-benzol: 6 g 40-proz. d-Ribamin und 1.5 g 1.4-Dichlor-2-nitro-benzol wurden in 30 ccm 70-proz. Alkohol im Bombenrohr unter Kohlensäure 1.5 Stdn. auf 110°, 3 Stdn. auf 135° und eine weitere Stde. auf 147° erhitzt. Sehr langsam kristallisierten zunächst 0.2 g vom Schmp. 162° aus; aus der Mutterlauge wurden noch 0.5 g unreines Produkt erhalten. Nach 2 maligem Umkristallisieren aus Methanol rotorange Nadeln vom Schmp. 166°.

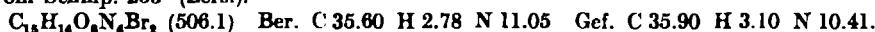


3.) Bromhaltige Verbindungen

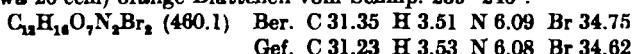
1.2-Dibrom-4-nitro-5-d-ribitylamino-benzol: 2.2 g 40-proz. d-Ribamin und 1.2 g 1.2-Dibrom-4.5-dinitro-benzol⁹⁾ wurden in 10 ccm 80-proz. Alkohol 2 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. 1.4 g orangegelbe Blättchen; Schmp. nach 2 maligem Umkristallisieren aus 60-proz. Alkohol 189–192°.



6.7-Dibrom-9-d-ribo-flavin: 1 g 1.2-Dibrom-4-nitro-5-d-ribitylamino-benzol wurden in 70 ccm Alkohol zum Diamin katalytisch reduziert. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels i. Vak. wurde der ölige Rückstand in 50 ccm Eisessig aufgenommen. Zur Flavin-Kondensation wurde mit 0.55 g Alloxan-tetrahydrat + 0.91 g Borsäure in 50 ccm Eisessig bei 50° versetzt. Nach wiederholtem Abdampfen mit Methanol lagen 0.95 g Flavin vor. Es wurde 2 mal aus 80-proz. Essigsäure umkristallisiert; orange Nadeln vom Schmp. 253° (Zers.).



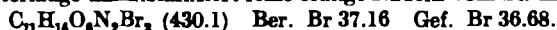
1.2-Dibrom-4-nitro-5-d-galaktitylamino-benzol: 2.9 g d-Galaktamin und 2.5 g 1.2-Dibrom-4.5-dinitro-benzol in 20 ccm Alkohol + 5 ccm Wasser wurden 1 Stde. unter Rückfluß gekocht; Ausb. 3.5 g. Nach 3 maligem Umkristallisieren aus verd. Propanol (etwa 20 ccm) orange Blättchen vom Schmp. 239–240°.



6.7-Dibrom-9-d-galakto-flavin: Durch Hydrierung von 0.9 g der vorstehenden Nitroverbindung und Kondensation des Diamins mit 0.5 g Alloxan-tetrahydrat und 1 g Borsäure in Eisessig wurden 0.75 g Flavin gewonnen. Nach 2 maligem Umkristallisieren aus verd. Essigsäure gelbe Nadeln vom Schmp. 260° (Zers.). Die Substanz konnte nicht vollständig analysenrein erhalten werden.



1.2-Dibrom-4-nitro-5-l-arabitylamino-benzol: 2 g l-Arabinamin und 2 g 1.2-Dibrom-4.5-dinitro-benzol in 20 ccm 70-proz. Alkohol wurden 3 Stdn. unter Rückfluß erhitzt; Ausb. 2.2 g. Aus 200 ccm 70-proz. Propanol in mehreren Anteilen aus der gleichen Mutterlauge umkristallisiert feine orangefarbene Nadeln vom Schmp. 241°.



6.7-Dibrom-9-l-arabo-flavin: 1 g 1.2-Dibrom-4-nitro-5-l-arabitylamino-benzol wurde in 90 ccm 70-proz. Alkohol hydriert, wobei die Wasserstoffaufnahme wegen der Schwerlöslichkeit der Verbindung nur langsam vor sich ging. Das erhaltene Diamin

⁹⁾ F. Schiff, Monatsh. Chem. 11, 336 [1891].

wurde mit 0.58 g Alloxan-tetrahydrat + 1.4 g Borsäure in 50 ccm Eisessig kondensiert. Schon beim Eindampfen der mit Wasser verdünnten Kondensationslösung begannen sich orangefarbene Kristalle abzuscheiden. Dieses Flavin ist also im Gegensatz zu anderen Polyoxyalkyl-flavinen auch in Anwesenheit von Borsäure schwer löslich. Die erhaltenen 0.9 g Rohprodukt wurden in kalter $n/10$ NaOH gelöst. Dabei hinterblieb viel gallertiger Rückstand, der ungelöstes Flavin eingeschlossen hielt. Nach dem Filtrieren wurde aus der alkalischen Lösung das Flavin sofort durch Zugabe von Essigsäure ausgefällt und in Form kleiner gelber Nadeln erhalten, die nach 2maligem Umkristallisieren aus verd. Essigsäure bei 297° (Zers.) schmolzen. Die Verbindung konnte indes auf diese Weise nicht analysenrein erhalten werden.

$C_{15}H_{14}O_6N_4Br_2$ (506.1) Ber. C 35.60 H 2.78 N 11.05 Br 31.58
Gef. C 39.25 H 3.61 N 10.56 Br 30.48.

4.) Fluorhaltige Verbindungen

1.4-Difluor-2-nitro-benzol¹⁰⁾: 55 g 1.4-Difluor-benzol wurden bei 0° in eine Mischung von 60 ccm Salpetersäure (d 1.5) und 120 ccm konz. Schwefelsäure unter Röhren eingetropft, wobei vorübergehend die Temperatur auf +10° stieg. Es wurde auf Eis gegossen, ausgeäthert und die äther. Lösung mit Calciumchlorid getrocknet. Ausb. 65 g = 85% d.Th.; Sdp.₁₅ 86–87°.

4-Fluor-2-nitro-1-d-ribitylamino-benzol: 7.6 g 40-proz. d-Ribamin und 1.5 g 1.4-Difluor-2-nitro-benzol wurden in 20 ccm Alkohol + 10 ccm Wasser 2.5 Stdn. im Rohr auf 130° erhitzt. Nach dem Erkalten schieden sich beim Anreiben 2 g orange Kristalle aus. Nach 2maligem Umkristallisieren aus wenig Propanol orange Blättchen vom Schmp. 161.5°.

$C_{11}H_{15}O_6N_2F$ (290.2) Ber. C 45.52 H 5.20 N 9.65 Gef. C 45.61 H 5.20 N 9.38.

6-Fluor-9-d-ribo-flavin: 1 g 4-Fluor-2-nitro-1-d-ribitylamino-benzol wurde in 60-proz. Methanol, in dem es wenig löslich ist, mit frischem Platinoxyd binnen 20 Min. unter Aufnahme der ber. Menge Wasserstoff zum Diamin hydriert. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels i. Vak. wurde das ölige Diamin in 50 ccm Eisessig aufgenommen und mit 0.6 g Alloxan-tetrahydrat und 1.2 g Borsäure in 50 ccm Eisessig kondensiert. 0.7 g Rohprodukt wurden aus 25 ccm sehr verd. Essigsäure umkristallisiert; 0.3 g dunkelgrüne, fast schwarz schimmernde, breite Prismen vom Schmp. 264° (Zers.).

$C_{15}H_{15}O_6N_4F$ (366.3) Ber. C 49.18 H 4.13 N 15.30 Gef. C 49.22 H 4.19 N 15.46.

Von den in dieser Arbeit beschriebenen Flavinen ist dies das einzige, das nicht in Nadeln kristallisiert. Durch Zerreiben wurde ein gelbes Pulver erhalten.

4-Fluor-2-nitro-1-l-arabitylamino-benzol: 1.3 g l-Arabinamin und 1.35 g 1.4-Difluor-2-nitro-benzol in 25 ccm 50-proz. Alkohol lieferten, im Rohr 1 Stde. auf 125° erhitzt, 0.8 g Rohprodukt. Nach 2maligem Umkristallisieren aus Methanol orangegelbe Nadeln vom Schmp. 212°.

$C_{11}H_{15}O_6N_2F$ (290.2) Ber. C 45.52 H 5.20 N 9.65 Gef. C 45.28 H 5.10 N 9.29.

6-Fluor-9-l-arabido-flavin: Nach katalytischer Reduktion von 0.72 g 4-Fluor-2-nitro-l-arabitylamino-benzol in 60 ccm 70-proz. Alkohol zum Diamin und Kondensation mit 0.55 g Alloxan-tetrahydrat + 1 g Borsäure in 100 ccm Eisessig lagen 0.7 g rohes Flavin vor. Umkristallisiert wurde 2mal aus 20 ccm ganz. verd. Essigsäure; lange, gelbe, grünstichige Nadeln vom Schmp. 262° (Zers.).

$C_{15}H_{15}O_6N_4F$ (266.3) Ber. C 49.18 H 4.13 N 15.30 Gef. C 48.46 H 4.32 N 14.84.

4-Fluor-2-nitro-1-d-galaktitylamino-benzol: 1.6 g d-Galaktamin und 1.4 g 1.4-Difluor-2-nitro-benzol wurden in 40 ccm 70-proz. Alkohol 4 Stdn. im Rohr auf 130–135° erhitzt. Aus Methanol 0.8 g orange Prismen vom Schmp. 219°.

$C_{12}H_{11}O_7N_2F$ (320.3) Ber. C 45.01 H 5.35 N 8.75 Gef. C 44.64 H 5.64 N 8.34.

6-Fluor-9-d-galakto-flavin: Nach Hydrierung von 0.7 g 4-Fluor-2-nitro-1-d-galaktitylamino-benzol zum Diamin wurde die Kondensation zum Flavin mit 0.6 g

¹⁰⁾ Vergl. G. Schiemann, Journ. prakt. Chem. [2] 140, 109 [1934].

Alloxan-tetrahydrat + 1.2 g Borsäure in 85 ccm Eisessig vorgenommen; Rohausb. 0.3 g. Nach 3 maligem Umkristallisieren aus je 25 ccm Wasser lange, gelbe Nadeln vom Schmp. 260° (Zers.)

$C_{16}H_{10}O_4N_4F$ (396.3) Ber. C 48.49 H 4.32 N 14.14 Gef. C 48.36 H 4.60 N 13.93.

1.4-Difluor-2-amino-benzol¹⁰⁾: 40 g 1.4-Difluor-2-nitro-benzol wurden in 120 ccm Methanol gelöst und langsam mit einer Lösung von 180 g Zinn(II)-chlorid in 180 ccm konz. Salzsäure und 40 ccm Wasser versetzt; der Zinn(II)-chlorid-Lösung hatte man zuvor noch 10 g Eisen(II)-oxyd zugesetzt. Die Reaktionstemperatur wurde durch leichte Kühlung zwischen 40 und 50° gehalten. Nach 1 stdg. Röhren bei dieser Temperatur wurde in Eiswasser gegossen, wobei etwa 1 g einer kristallinen Verbindung ausfiel (vergl. den folgenden Abschnitt). Nach deren Abtrennung wurde das Methanol i. Vak. verjagt und die Lösung ausgeäthert, die äther. Lösung mit Calciumchlorid getrocknet und das Difluor-amino-benzol i. Vak. fraktioniert. Ausb. 23 g = 72% d. Th. vom Sdp.₁₈ 170–175° (nach der Vorschrift von Schiemann beträgt die Ausbeute 55% d. Th.).

2.5.2'.5'-Tetrafluor-azoxybenzol: Die bei der Reduktion des 1.4-Difluor-2-nitro-benzols erhaltene feste Verbindung wurde 2 mal aus Methanol umkristallisiert. Hellgelbe, feine Nadeln und Prismen vom Schmp. 99–100°; die Substanz verändert sich beim Lagern nicht.

$C_{12}H_6ON_2F_2$ (270.2) Ber. C 53.34 H 2.29 N 10.37 Gef. C 53.27 H 2.35 N 10.39.

1.2.4-Trifluor-benzol¹⁰⁾: 30 g 1.4-Difluor-2-amino-benzol wurden in 80 ccm konz. Salzsäure suspendiert und unter sehr guter Außenkühlung und Turbinieren bei –10° bis 0° ohne Zugabe von Eis mit 18 g Natriumnitrit in 35 ccm Wasser diazotiert. Einige feine Kristalle wurden durch Zugabe von etwas Wasser in Lösung gebracht, dann wurde unter 0° durch eine gekühlte Sinternutsche klar filtriert und das Filtrat mit 85 ccm 40-proz. Borfluorwasserstoffsäure versetzt. Nochmals auf –15° abgekühlt fielen 35 g farbloses Diazoniumborfluorid aus. Es wurde mit kalter Borfluorwasserstoffsäure, mit Methanol und Äther gewaschen und i. Vak. über Schwefelsäure getrocknet. (Zersp. 150°).

Die Zersetzung wurde in 3 Anteilen vorsichtig mit freier Flamme vorgenommen und ergab nach sorgfältiger Fraktionierung 10 g 1.2.4-Trifluor-benzol vom Sdp.₇₅₅ 88–88.5°. Wegen seiner Zersetzunglichkeit wurde es alsbald nitriert.

1.2.4-Trifluor-5-nitro-benzol: In eine Mischung von 10 ccm Salpetersäure (d 1.5) und 20 ccm konz. Schwefelsäure wurden bei –5° bis 0° 10 g 1.2.4-Trifluor-benzol eingetropft, wobei die Temperatur anfänglich kurz auf +15° stieg. Nach 30 Min. wurde auf Eis gegossen, ausgeäthert, mit Eiswasser, verd. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und nochmals mit Eiswasser gewaschen. Nach dem Trocknen der äther. Lösung mit Calciumchlorid und Verdampfen des Äthers wurde i. Vak. fraktioniert. Ausb. 10 g = 75% d. Th.; Sdp.₁₈ 80–81°.

$C_6H_2O_2NF_3$ (177.1) Ber. C 40.69 H 1.14 N 7.91 Gef. C 41.46 H 1.04 N 8.04.

Die Kohlenstoffanalysen fielen bei hohen Fluorgehalten öfters zu hoch aus.

1.2-Difluor-4-nitro-5-d-galaktitylamino-benzol: 0.5 g d-Galaktamin und 0.2 g Natriumhydrogencarbonat wurden in 5 ccm Wasser gelöst. Dazu gab man eine Lösung von 0.5 g 1.2.4-Trifluor-5-nitro-benzol in 10 ccm Methanol. Beim Stehen bei 20° schieden sich über Nacht 0.1 g gelbe Nadeln aus. Die Mutterlauge wurde vorsichtig eingeengt, wobei sich die Ausbeute etwas erhöhte. Zur Reinigung löste man die Substanz in lauwarmem Wasser und ließ das Lösungsmittel im Exsiccator über Schwefelsäure verdunsten; Schmp. 222°.

$C_{12}H_{16}O_2N_2F_2$ (308.2) Ber. C 42.60 H 4.77 N 8.28 Gef. C 44.39 H 4.24 N 8.21.

Die in üblicher Weise vorgenommene Hydrierung (Aufnahme von 3 Mol. H_2) und Kondensation mit Alloxan-Borsäure lieferte nicht das gesuchte 6.7-Difluor-9-d-galakto-flavin. Es wurden zwar grün fluoreszierende Lösungen erhalten, doch konnte nichts Kristallisiertes gewonnen werden.

1.2-Difluor-4-nitro-benzol: 18 g 1-Fluor-2-amino-4-nitro-benzol wurden in 60 ccm konz. Salzsäure mit 8.5 g Natriumnitrit bei –5° bis 0° diazotiert. Man filtrierte klar und versetzte mit 36 ccm 40-proz. Borfluorwasserstoffsäure. Das Diazoniumbor

fluorid (16 g) zeigte einen Zersp. von 150–160°. Nach gutem Trocknen über Schwefelsäure wurde es mit 30 g reinem Seesand gemischt und in einem 100 ccm-Kölbchen bei 20 Torr. vorsichtig durch Erwärmen über freier Flamme zersetzt. Durch Fraktionieren wurden 0.5 g = 3% d.Th. 1,2-Difluor-4-nitro-benzol vom Sdp.₁₄ 80° als hellgelbes Öl erhalten. J. G. McNally u. J. R. Byers¹¹⁾ gewähnten die gleiche Verbindung durch Nitrieren von 1,4-Difluor-benzol.

$C_8H_5O_2NF_2$ (159.1) Ber. C 45.30 H 1.90 N 8.80 Gef. C 45.31 H 1.93 N 8.76.

1,3-Dinitro-4,6-bis-[*l*-arabitylamino]-benzol: 0.16 g *l*-Arabinamin wurden mit 0.055 g 1,3-Dinitro-4,6-difluor-benzol¹²⁾ in 5 ccm 70-proz. Alkohol 1.5 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Beim Stehen im Eisschrank schieden sich weiche Kristalle ab, die aus Wasser durch langsames Verdunsten in Form hellgelber Prismen erhalten wurden; Schmp. 212–213°, nicht ganz scharf.

$C_{15}H_{24}O_4N_4$ (486.4) Ber. C 41.20 H 5.62 N 12.01 Gef. C 41.86 H 5.41 N 12.71.

1,3-Dinitro-4,6-bis-[*d*-galaktitylamino]-benzol: Entsteht aus 2.4 g *d*-Galaktamin und 0.7 g 1,3-Dinitro-4,6-difluor-benzol in 7 ccm Wasser + 10 ccm Äthanol durch Erhitzen auf dem Wasserbad. Bereits in der Kälte findet Kondensation statt. Nach 2 maligem Umkristallisieren aus Wasser gelbe Nadeln vom Schmp. 242–244°.

$C_{15}H_{24}O_4N_4$ (526.4) Ber. C 41.06 H 5.74 N 10.64 Gef. C 41.07 H 6.03 N 10.80.

2,4-Dinitro-phenyl-*d*-galaktitylamino-benzol: 0.7 g *d*-Galaktamin und 0.25 g Natriumhydrogencarbonat in 30 ccm Wasser wurden mit 0.7 g 2,4-Dinitro-fluorbenzol in 10 ccm Methanol versetzt. Als bald fielen breite gelbe Nadeln aus; Ausb. 0.8 g. Aus Wasser oder Methanol umkristallisiert Schmp. 195–196°; $[\alpha]_D^{20}$: + 0.05° × 100/1.33 × 0.5 = +7.5°.

$C_{15}H_{17}O_4N_3$ (347.3) Ber. C 41.50 H 4.93 N 12.10 Gef. C 41.10 H 4.90 N 12.12.

2,4-Dinitro-phenyl-*d*-glucitylamino-benzol: Beim Zusammengießen von 1.5 g *d*-Glucamin, 0.3 g Natriumhydrogencarbonat und 0.5 g 2,4-Dinitro-fluorbenzol in 10 ccm Wasser u. 10 ccm Methanol entstand eine gelbe Lösung, aus der am nächsten Tag mit Aceton ein hellgelber Sirup ausfiel, der verworfen wurde. Aus der überstehenden Flüssigkeit wurden nach dem Verdampfen des Acetons und Methanols 0.4 g einer bei 160–166° schmelzenden Verbindung erhalten, die schwer kristallisierte. Nach 2 maligem Umkristallisieren aus Methanol gelbe Nadeln vom Schmp. 166°; $[\alpha]_D^{20}$: + 0.09° × 100/1.41 × 0.5 = +12.8°.

$C_{15}H_{17}O_4N_3$ (347.3) Ber. C 41.50 H 4.93 N 12.10 Gef. C 41.47 H 4.94 N 12.03.

¹¹⁾ Amer. chem. Abstr. 40, 2635 [1948].

¹²⁾ F. Swarts, Rec. Trav. chim. Pays-Bas 35, 142 [1915].