

III) Methylen-cyclobutan (II) und Eisessig

20 ccm Methylen-cyclobutan und 20 ccm Eisessig werden 48 Stdn. in einem Bombenrohr auf 200° erhitzt. Man versetzt den Rohrinhalt mit Wasser und trennt das abgeschiedene Öl von der Essigsäure ab. Nach dem Durchschütteln mit verd. Soda-Lösung und Wasser erhält man etwa 9 g eines zwischen 140° und 200° siedenden Gemisches.

1-Oxy-1-methyl-cyclobutan-acetat (entspr. XVIII): Durch Verseifen der zwischen 130° und 160° siedenden Fraktion mit methylalkohol. Kalilauge gewinnt man auf die bereits beschriebene Weise das bei 120° siedende 1-Oxy-1-methyl-cyclobutan, das durch sein Phenylurethan vom Schmp. 139° charakterisiert wird.

α-Terpinen (XXI): 4 g einer zwischen 170° und 185° siedenden Fraktion werden mit 2 g Maleinsäure-anhydrid in wenig Äther gelöst und 4 Stdn. unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Anschließend destilliert man den Äther, die nicht umgesetzten Kohlenwasserstoffe und das überschüss. Maleinsäure-anhydrid ab und nimmt den Rückstand in konz. heißer Soda-Lösung auf. Nach längerem Kochen fällt ein schwerlösliches Natrium-Salz in charakteristischen, fettig glänzenden Schuppen aus. Die freie Säure wird durch Erhitzen über ihren Schmelzpunkt und anschließende Sublimation i. Vak. in ihr Anhydrid vom Schmp. 62–63° übergeführt.

$C_{14}H_{18}O_3$ (234.3) Ber. C 71.8 H 7.7 Gef. C 71.7 H 7.9

Das Anhydrid erweist sich durch die Mischprobe als identisch mit dem Addukt von Maleinsäure-anhydrid an α-Terpinen²³⁾.

Die Untersuchung der übrigen Reaktionsprodukte wird fortgesetzt.

97. Adolf Butenandt und Hans-Georg Schlossberger: Über 3.4-Dioxy-kynurenin, seine Synthese und physiologische Bedeutung*)

[Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie und dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität, Tübingen]

(Eingegangen am 19. März 1952)

d,l-3.4-Dioxy-kynurenin wurde nach dem Prinzip der 3-Oxy-kynurenin-Synthese von A. Butenandt und G. Hallmann synthetisiert. Es ist unter den Bedingungen der üblichen Standardteste 1.) unwirksam im Augenpigment-Bildungsprozeß an *Drosophila* und *Ephestia* und vermag 2.) bei *Neurospora crassa* Nicotinsäureamid nicht zu ersetzen. Nach diesen Ergebnissen kann 3.4-Dioxy-kynurenin weder als Zwischenprodukt der Ommochrom- noch der Nicotinsäure-Synthese aus Tryptophan angesprochen werden. Das Enzym Kynureninase (nach O. Wiss aus Ratten- bzw. Schweineleber) spaltet 3.4-Dioxy-kynurenin in Alanin und 3.4-Dioxy-anthranilsäure; da dieses Enzym auch in *Neurospora* nachweisbar ist, stellt somit auch 3.4-Dioxy-anthranilsäure kein Zwischenprodukt der Nicotinsäure-Synthese aus Tryptophan dar.

Vor 2 Jahren wurde von uns das 3-Oxy-kynurenin (III) als Intermediärprodukt des Tryptophanstoffwechsels entdeckt. Es wurde in der natürlich vorkommenden *l*-Form aus Fliegenpuppen (*Calliphora erythrocephala*) isoliert und als Racemat auf synthetischem Wege gewonnen¹⁾. Die physiologische

²³⁾ O. Diels, W. Koch u. H. Frost, B. 71, 1163 [1938]; N. F. Goodway u. T. F. West, Journ. chem. Soc. London 1940, 702.

*) Herrn Geheimrat H. Wieland zum 75. Geburtstag.

¹⁾ A. Butenandt, W. Weidel u. H. Schlossberger, Ztschr. Naturforsch. 4b, 242 [1949].

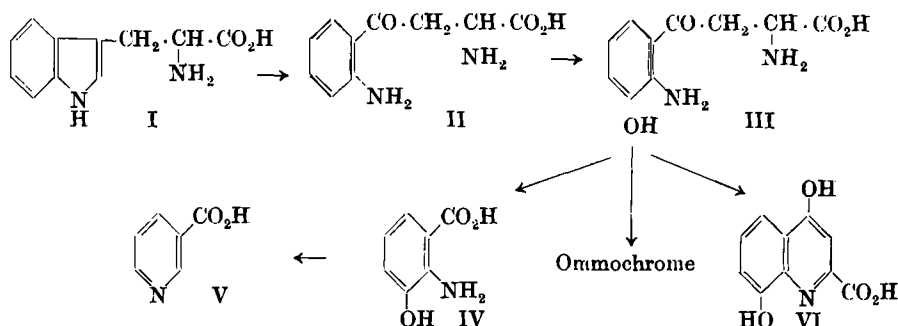
Auswertung ergab, daß das 3-Oxy-kynurenin

1.) identisch ist mit dem unter der Wirkung des *cn*⁺-Gens (*Drosophila melanogaster*) aus Kynurenin entstehenden „*cn*⁺-Stoffes“ und als solches ein Glied in der Reaktionskette darstellt, die vom Tryptophan zu den Insektenspigmenten der Ommochromgruppe führt¹⁾, daß es

2.) Zwischenprodukt der Nicotinsäure-Synthese²⁾ bei *Neurospora* und bei der Ratte ist und daß es

3.) die Vorstufe für die im Harn aufgefundene Xanthurensäure (VI)³⁾ darstellt.

Somit steht das 3-Oxy-kynurenin (III) an einer bemerkenswerten Gabelungsstelle des Tryptophanstoffwechsels. Nach den Arbeiten von J. F. Nyc und H. K. Mitchell⁴⁾ stellt die 3-Oxy-anthranilsäure (IV) eine weitere Vorstufe der Nicotinsäure (V) dar; sie wird unter der Wirkung des Enzyms Kynureninase aus 3-Oxy-kynurenin gebildet⁵⁾. Da weder die 3-Oxy-anthranilsäure (IV) noch die Xanthurensäure (VI) Vorstufen der Ommochrom-Synthese sind, kann man die bisher bekannten Zusammenhänge durch folgendes Schema darstellen:



Es ist nun die weitere Aufgabe, nach noch unbekannten Zwischenprodukten zu suchen, die innerhalb der vorstehenden Reaktionsketten auftreten.

In einer kürzlich erschienenen Arbeit hat Makino⁶⁾ die Auffassung vertreten, daß Leberschnitte von Pferd, Rind und Schwein in der Lage sind, neben 3-Oxy-anthranilsäure (IV) auch 3,4-Dioxy-anthranilsäure (VII) in Nicotinsäure überzuführen. Diese Dioxysäure ist bisher nicht aus natürlichem Material isoliert worden, und es darf noch nicht als gesichert gelten, daß sie bei der biochemischen Nicotinsäure-Synthese ein obligates Zwischenprodukt ist.

²⁾ F. A. Haskins u. H. K. Mitchell, Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) **35**, 500 [1949]; C. E. Dagliesh, Quart. Rev. Chem. Soc. London **5**, 227 [1951].

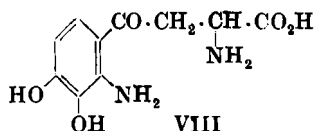
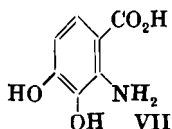
³⁾ L. Musajo, F. M. Chiancone u. D. Coppini, Science **113**, 125 [1951].

⁴⁾ Journ. Amer. chem. Soc. **70**, 1847 [1948].

⁵⁾ O. Wiss u. F. Hatz, Helv. chim. Acta **32**, 532 [1949]; O. Wiss, Helv. chim. Acta **32**, 1694 [1949]; O. Wiss u. H. Fuchs, Experientia **6**, 472 [1950]; O. Wiss, Ztschr. Naturforsch. **7b**, 133 [1952].

⁶⁾ K. Makino, F. Itoh u. K. Nishi, Nature **167**, 115 [1951].

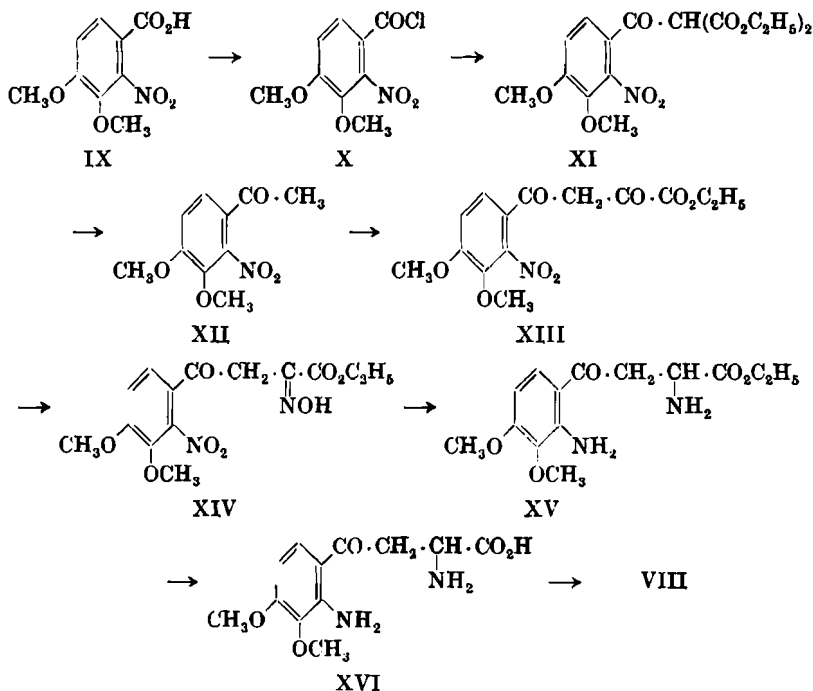
Die 3.4-Dioxy-anthranilsäure (VII) könnte theoretisch durch direkte Oxydation von 3-Oxy-anthranilsäure (IV) oder aber – der Entstehung von 3-Oxy-anthranilsäure (IV) aus 3-Oxy-kynurenin (III) entsprechend⁵⁾ – aus 3.4-Dioxy-kynurenin (VIII) unter der Wirkung der Kynureninase gebildet werden. Auf Grund dieser Überlegung gewann das 3.4-Dioxy-kynurenin



(VIII) Interesse als mögliches Zwischenprodukt in der Synthese der Nicotinsäure. Da andererseits der Übergang von 3-Oxy-kynurenin (III) in Ommochrome mit oxydativen Vorgängen verknüpft ist⁷⁾, könnte dem 3.4-Dioxy-kynurenin möglicherweise auch eine Rolle im Ablauf der Ommochrom-Synthese zukommen. Wir haben deshalb 3.4-Dioxy-kynurenin (VIII) synthetisiert und sein Verhalten im Stoffwechsel geprüft.

Synthese des *d,l*-3.4-Dioxy-kynurenins

Die Synthese des *d,l*-3.4-Dioxy-kynurenins (VIII) erfolgte in weitgehender Analogie zur 3-Oxy-kynurenin-Synthese von A. Butenandt und G. Hallmann⁸⁾. Als Ausgangsmaterial verwendeten wir 2-Nitro-3.4-dimethoxyacetophenon (XII), dessen Darstellung aus dem Säurechlorid (X) der



⁷⁾ R. Danneel, Biol. Zbl. 61, 388 [1941].

⁸⁾ Ztschr. Naturforsch. 5 b, 444 [1950].

bekannten 2-Nitro-3.4-dimethoxy-benzoesäure⁹⁾ (2-Nitro-veratrumsäure; IX) durch Umsetzung mit Äthoxy-magnesiummalonsäure-diäthylester¹⁰⁾ über den 2-Nitro-3.4-dimethoxy-benzoylmalonsäure-diäthylester (XI) gelingt. 2-Nitro-3.4-dimethoxy-acetophenon (XII) wurde nach Angaben von Claisen¹¹⁾ in 2-Nitro-3.4-dimethoxy-benzoyl-brenztraubensäure-äthylester (XIII) übergeführt und daraus durch Umsetzung mit Hydroxylamin das 2-Nitro-3.4-dimethoxy-benzoyl-brenztraubensäure-äthylester- α -oxim (XIV) gewonnen. Katalytische Hydrierung dieses Oxims und anschließende Verseifung des nicht isolierten *d,l*-3.4-Dimethoxy-kynurenin-äthylesters (XV) führte zum *d,l*-3.4-Dimethoxy-kynurenin (XVI), dessen Methoxygruppen ohne Schwierigkeit mit 48-proz. wäßrigem Bromwasserstoff verseift werden konnten.

Die Originalmethode von Butenandt und Hallmann⁸⁾ zur Darstellung von 3-Oxy-kynurenin benutzt zum Schutz der aromatischen Oxygruppe während der Synthese nicht den Methyläther, sondern den katalytisch leicht spaltbaren Benzyläther. Inzwischen hat Kotake¹²⁾ gezeigt, daß 3-Methoxy-kynurenin mit Bromwasserstoff leicht zum 3-Oxy-kynurenin gespalten werden kann. Diese Erfahrung wurde in der vorstehend beschriebenen Synthese des 3.4-Dioxy-kynurenins verwertet und dadurch eine Vereinfachung des Reaktionsweges erzielt.

Das zuerst anfallende *d,l*-3.4-Dioxy-kynurenin-hydrobromid vom Schmp. 175° hydrolysiert beim Lösen in Wasser, und es scheidet sich das in Wasser schwer lösliche freie *d,l*-3.4-Dioxy-kynurenin (VIII) in kleinen hellgelben rhombischen Kristallen vom Zersp. 274° (Kofler-Mikro-Schmelztisch) ab. Es zeigt eine positive Ninhydrin-Reaktion, gibt mit Eisen(III)-chlorid eine blutrote Färbung und reduziert ammoniakalische Silbersalz-Lösung.

Zur physiologischen Wirksamkeit des 3.4-Dioxy-kynurenins

a) Die Auswertung im Ommochrombildungstest an Insekten: 3.4-Dioxy-kynurenin vermag – im Gegensatz zu 3-Oxy-kynurenin – an *vw*- und *cnbw*-*Drosophila* und *a-Ephestia* keine Augenpigmentbildung auszulösen. Weder nach Implantation von Dioxy-kynurenin-Kristallen in *Drosophila* bzw. *Ephestia*-Puppen, noch beim Zusatz von Dioxy-kynurenin zum Futter der *Drosophila*-Larven konnte eine Ommochrombildung erzielt werden (s. Tafel 1–3). Die mit Hilfe des Ostwaldschen Farbkörpers getestete Augenausfärbung¹³⁾ ist gegenüber den unbehandelten Kontrollen weder nach Farbe noch nach Helligkeit verändert. Daraus ergibt sich einwandfrei, daß das 3.4-Dioxy-kynurenin keine Vorstufe der Ommochrombildung darstellt; die Abwandlung des 3-Oxy-kynurenins zu den Ommochromen muß somit in anderer Richtung gesucht werden.

⁹⁾ R. Pschorr u. C. Sumuleanu, B. 32, 3405 [1899]; K. H. Slotta u. F. Lauer-
sen, Journ. prakt. Chem. [2] 139, 220 [1934]; I. J. Pisovschi, B. 43, 2137 [1910].

¹⁰⁾ H. G. Walker u. C. R. Hauser, Journ. Amer. chem. Soc. 68, 1386 [1946]; H.
Lund, B. 67, 935 [1934].

¹¹⁾ C. Beyer u. L. Claisen, B. 20, 2178 [1887]; E. Brömme u. L. Claisen, B. 21,
1131 [1888].

¹²⁾ M. Kotake, T. Sakan u. S. Senoh, Journ. Amer. chem. Soc. 73, 1832 [1951].

¹³⁾ E. Caspari, Arch. Entw. Mech. 130, 353 [1933].

b) Die Prüfung auf Wachstumswirkung an *Neurospora*: Die Mutante ATC 10767 von *Neurospora crassa*, die bei Zusatz von Kynurenin bzw. Nicotinsäureamid zum Nährmedium eine eindeutige Wachstumssteigerung zeigt, kann überraschenderweise 3.4-Dioxy-kynurenin nicht verwerten; selbst hohe Zusätze sind ohne jeden Einfluß auf das Wachstum (s. Tafel 4). Daraus ist mit hoher Wahrscheinlichkeit zu folgern, daß das 3.4-Dioxy-kynurenin auch keine Vorstufe der Nicotinsäure-Synthese bei *Neurospora crassa* darstellt.

c) 3.4-Dioxy-kynurenin als Substrat der Kynureninase: Nach Versuchen von O. Wiss spalten aus Ratten- und Schweineleber bereitete Kynureninase-Präparate das 3.4-Dioxy-kynurenin unter Bildung von Alanin¹⁴⁾. In Analogie zum Abbau von Kynurenin und 3-Oxy-kynurenin durch dieses Ferment ist zu erwarten, daß neben Alanin als zweites Spaltprodukt die 3.4-Dioxy-anthranilsäure entsteht, die nach Makino⁶⁾ von Pferde-, Schweine- und Rinderleber in Nicotinsäure übergeführt werden soll. Da die von uns verwendete *Neurospora*-Mutante sicher im Besitz der Kynureninase-Aktivität ist, sollte sie aus 3.4-Dioxy-kynurenin die 3.4-Dioxy-anthranilsäure in Freiheit setzen können. Die physiologische Inaktivität von 3.4-Dioxy-kynurenin im Wachstumstest an *Neurospora* führt somit zugleich zu dem Schluß, daß auch 3.4-Dioxy-anthranilsäure bei *Neurospora crassa* – im Gegensatz zu den Angaben von Makino⁶⁾ bei Pferd, Rind und Schwein – keine Vorstufe der Nicotinsäure sein kann. Darüber fehlen bisher Angaben in der Literatur; Hellmann und Wiss¹⁴⁾ haben zur Klärung dieser Frage 3.4-Dioxy-anthranilsäure synthetisiert und auf ihre physiologische Wirkung geprüft. In Übereinstimmung mit den von uns gezogenen Folgerungen finden sie, daß reine 3.4-Dioxy-anthranilsäure keinerlei Wachstumswirkung an *Neurospora crassa* (Mutante ATC 10767) ausübt. Man vermag daher mit Sicherheit zu sagen, daß bei *Neurospora* weder 3.4-Dioxy-kynurenin noch 3.4-Dioxy-anthranilsäure Zwischenprodukte auf den bisher bekannten Wegen des Tryptophanstoffwechsels darstellen. Der Befund Makinos⁶⁾, der den Säugetieren eine bisher nicht bekannt gewordene Sonderstellung im Tryptophanstoffwechsel zuschreiben würde, bedarf der Bestätigung.

In den "Abstracts of Papers" des XII. Internationalen Chemiekongresses, New York, September 1951 (S. 314), finden wir das Referat einer Arbeit von K. Makino und K. Nishi, in der ebenfalls über eine Synthese des 3.4-Dioxy-kynurenins berichtet wird. Der Weg ist von dem hier beschriebenen verschieden und folgt der Oxykynurenin-Synthese von Kotake¹²⁾. Makino hält nach den kurzen Angaben des Referates 3.4-Dioxy-kynurenin für die Vorstufe der Dioxyanthranilsäure und der Nicotinsäure sowie für ein Intermediärprodukt bei der Entstehung des braunen Pigments in den Eiern des Seiden-spinners *Bombyx mori*. Da in dem Referat keinerlei Versuchs-Angaben enthalten sind und das Dioxy-kynurenin nicht charakterisiert wurde, ist ein Vergleich unserer Befunde mit diesen neuen Angaben von Makino noch nicht möglich.

Hrn. Dr. O. Wiss und Frln. K. Britt danken wir für die Prüfung des Dioxy-kynurenins im *Neurospora*- und Kynureninasetest, Frln. Dr. G. Hanser für die Durchführung der Auswertungen an *Drosophila* und *Ephestia*, Frln. I. Löschmann für Mithilfe bei der chemischen Arbeit.

¹⁴⁾ H. Hellmann u. O. Wiss, Ztschr. physiol. Chem., im Druck.

Beschreibung der Versuche

I. Synthese des 3.4-Dioxy-kynurenins

1.) 2-Nitro-3.4-dimethoxy-benzoesäure (2-Nitro-veratrumssäure) (IX)⁹): Die Lösung von 76 g Vanillin in 275 ccm 2*N*KOH und 100 ccm Wasser wird teilweise mit 55 ccm Essigsäureanhydrid versetzt, das gebildete Vanillin-acetat nach dem Abkühlen des Reaktionsgemisches abgesaugt und nach dem Trocknen (Ausb. 93 g = 96 % d. Th.) in einem 2 l-Filtrierstutzen in 250 ccm Tetrachlorkohlenstoff aufgeschlämmt. Zu dieser Suspension werden innerhalb von 3 Stdn. unter starkem Rühren und Eis-Kochsalz-Kühlung 250 ccm rote, rauchende Salpetersäure derart zugegeben, daß die Reaktionstemperatur zwischen 8 und 12° bleibt. Nach 1 Stde. weiteren intensiven Rührens erfolgt, ebenfalls unter Rühren, Zugabe von 600 ccm Eisbrei und wenig Wasser, wobei sich kristallisiertes 2-Nitro-vanillin-acetat (79 g = 69 % d. Th.) abscheidet. Diese Verbindung wird in 800 ccm Wasser suspendiert und mit so viel 8-proz. Natronlauge versetzt, daß sich beim Erwärmen auf dem Wasserbad eine klare Lösung bildet, in die nach dem Abkühlen unter Rühren so viel 25-proz. Salzsäure eingetropfelt wird, daß das 2-Nitro-vanillin völlig abgeschieden ist (Ausb. 54 g = 83 % d. Th.). Hierauf werden zur Lösung des 2-Nitro-vanillins in 125 ccm 2*N*KOH bei 70° im 1 l-Dreihalskolben unter Rühren und Durchleiten von Stickstoff 62.5 ccm Dimethylsulfat langsam zugeetropfelt; die Lösung wird jeweils beim Farbumschlag von Rot nach Gelb durch Zusatz von Kalilauge wieder alkalisch gemacht. Nach Beendigung der Reaktion erstarrt beim Kühlen der Mischung mit Eis unter weiterem Rühren schließlich der gebildete 2-Nitro-3.4-dimethoxy-benzaldehyd (Ausb. 43 g = 76 % d. Th.). Die Lösung dieses Aldehyds in Aceton wird mit 150 g Kaliumpermanganat in 2 l Wasser vereinigt und das Reaktionsgemisch auf dem Wasserbad bis zur völligen Entfärbung erwärmt. Hierauf wird vom abgeschiedenen Mangandioxyd abfiltriert und das Filtrat nach dem Einengen auf 800 ccm zur Entfernung nicht oxydierten Aldehyds einige Male ausgeäthert. Die wäßr. Phase wird so lange teilweise mit Salzsäure versetzt, bis die gebildete 2-Nitro-3.4-dimethoxy-benzoesäure (IX) völlig ausgefällt ist (Ausb. 30 g = 65 % d. Th.).

2.) 2-Nitro-3.4-dimethoxy-benzoylchlorid¹ (X): 20 g 2-Nitro-3.4-dimethoxy-benzoesäure werden im Schiffskolben mit aufsteigendem Kühler teilweise mit insgesamt 10 ccm Thionylchlorid versetzt; anschließend wird die Reaktionsmischung noch 1 Stde. auf dem Wasserbad erwärmt, worauf das überschüss. Thionylchlorid abdestilliert und das zurückbleibende 2-Nitro-3.4-dimethoxy-benzoylchlorid (X) in wenig absol. Äther aufgenommen wird.

3.) 2-Nitro-3.4-dimethoxy-acetophenon (XII)¹⁰): a) 2-Nitro-3.4-dimethoxy-benzoyl-malonsäurediäthylester (XI): In einem 500 ccm -Dreihalskolben mit Rührer, Tropftrichter und Rückflußkühler (mit Chlorcalciumrohr) werden auf dem zunächst ungeheizten Wasserbad 2.14 g Magnesium mit 2.3 ccm absol. Alkohol und 0.2 ccm Tetrachlorkohlenstoff übergossen, worauf sofort die Umsetzung beginnt. Nach einigen Minuten werden 30 ccm absol. Äther und anschließend die Lösung von 14.1 g Malonsäurediäthylester in 8 ccm absol. Alkohol und 10 ccm absol. Äther in dem Maße zugeetropfelt, daß schneller Rückfluß, der bei Bedarf durch Erwärmen erzwungen wird, erhalten bleibt. Danach wird die Reaktionsmischung 3 Stdn. bzw. so lange, bis alles Magnesium gelöst ist, zum Sieden erhitzt. Zu dieser Lösung wird unter starkem Rühren die äther. Lösung des Säurechlorides X gegeben und die Mischung 90 Min. gekocht. Nach dem Abkühlen wird mit verd. Schwefelsäure angesäuert und die Ätherphase mit einem Ätherextrakt der wäßr. Phase vereinigt. Die gesamte Ätherfraktion wird mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Abdestillieren des Äthers hinterbleibt der rohe 2-Nitro-3.4-dimethoxy-benzoyl-malonsäurediäthylester (XI).

b) Das rohe Malonester-Derivat XI wird mit einer Lösung von 24 ccm Eisessig, 3 ccm konz. Schwefelsäure und 16 ccm Wasser 5 Stdn. gekocht. Anschließend wird die Reaktions-Lösung mit 20-proz. Natronlauge alkalisch gemacht, mehrmals ausgeäthert und der Äther, nach dem Trocknen der vereinigten äther. Auszüge mit Natriumsulfat,

abdestilliert. Der Rückstand, das rohe 2-Nitro-3.4-dimethoxy-acetophenon (XII), bildet nach dem Umkristallisieren farblose Nadelchen vom Schmp. $93^{\circ}18$) (Ausb. 15 g = 75% d. Th.).

$C_{10}H_{11}O_5N$ (225.2) Ber. C 53.33 H 4.92 N 6.22 Gef. C 53.42 H 4.78 N 6.12

4.) 2-Nitro-3.4-dimethoxy-benzoyl-brenztraubensäure-äthylester (XIII)¹¹⁾: Zur Lösung von 1.1 g Natrium in 45 ccm absol. Alkohol wird die Suspension von 10 g 2-Nitro-3.4-dimethoxy-acetophenon in 15 g Oxalsäurediäthylester teilweise zugegeben, die Reaktionsmischung 12 Stdn. gekühlt und anschließend, nach dem Neutralisieren mit eiskalter n H_2SO_4 , mehrmals mit Äther extrahiert. Nach dem Trocknen der vereinigten äther. Auszüge wird der Äther abdestilliert, der Rückstand in Benzol gelöst und die Lösung mit Petroläther angespritzt, wobei der 2-Nitro-3.4-dimethoxy-benzoyl-brenztraubensäure-äthylester (XIII) in blaßgelb gefärbten Blättchen vom Schmp. 104° auskristallisiert (Ausb. 10.5 g = 73% d. Th.).

$C_{11}H_{13}O_8N$ (325.3) Ber. C 51.69 H 4.65 N 4.31 Gef. C 51.74 H 4.49 N 4.25

5.) 2-Nitro-3.4-dimethoxy-benzoyl-brenztraubensäure-äthylester- α -oxim (XIV): 5.4 g Hydroxylamin-hydrochlorid werden mit 6 g wasserfreiem Natriumacetat und 1.5 ccm Wasser innig verrieben. Nach Zugabe von absol. Alkohol wird die Mischung kräftig durchgerührt und die alkohol. Lösung des Hydroxylamin-acetats vom gebildeten Natriumchlorid durch Filtrieren getrennt. Die Hydroxylamin-acetat-Lösung wird in die absol. alkohol. Lösung von 8 g 2-Nitro-3.4-dimethoxy-benzoyl-brenztraubensäure-äthylester gegossen und das Reaktionsgemisch nach 10 Stdg. stehenlassen bei 20° auf ein geringes Volumen eingedampft; nach dem Anspritzen mit Wasser fällt das Oxim XIV aus. Nach dem Trocknen wird es in Benzol gelöst und die Lösung nach Entfärben mit Tierkohle mit tiefsiedendem Petroläther angespritzt. Es scheidet sich das 2-Nitro-3.4-dimethoxy-benzoyl-brenztraubensäure-äthylester- α -oxim (XIV) völlig farblos aus (Ausb. 7.3 g = 88% d. Th.). Es wird ohne weitere Reinigung zur Hydrierung verwandt.

6.) d,l - β -[2-Amino-3.4-dimethoxy-benzoyl]-alanin (d,l -3.4-Dimethoxy-kynurenin; XVI): a) d,l - β -[2-Amino-3.4-dimethoxy-benzoyl]-alanin-äthylester (d,l -3.4-Dimethoxy-kynurenin-äthylester; XV): Die Suspension von 0.5 g Raney-Nickel und 0.2 g Pd-Mohr in absol. Alkohol wird nach dem Vorhydrieren in einer Schüttelente mit der Lösung von 2 g 2-Nitro-3.4-dimethoxy-benzoyl-brenztraubensäure-äthylester- α -oxim in 50 ccm Alkohol vereinigt und in einer Wasserstoffatmosphäre geschüttelt. Nach Aufnahme der zur Reduktion der Nitrogruppe erforderlichen 3 Moll. Wasserstoff wird die Schüttelente mit einer Heizplatte erwärmt und so lange unter Schütteln weiterhydriert, bis (unter Berücksichtigung des durch die Erwärmung vergrößerten Gasvolumens) noch etwa 2 weitere Moll. Wasserstoff aufgenommen worden sind. Nach Abfiltrieren vom Katalysator wird die alkohol. Lösung i. Vak. auf etwa 10 ccm eingengt.

b) Die eingeeengte alkohol. Lösung des d,l - β -[2-Amino-3.4-dimethoxy-benzoyl]-alanin-äthylesters wird mit einer Suspension von etwa 1.4 g $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$ in 200 ccm Wasser versetzt und 3 Stdn. geschüttelt. Anschließend wird mit Schwefelsäure neutralisiert und das ausgeschiedene Bariumsulfat durch Zentrifugieren und Filtrieren entfernt. Die klare, gelbe Lösung wird i. Vak. eingengt, wobei in beträchtlicher Menge zunächst schwach gelbliche Nadelchen vom Schmp. 262° auskristallisieren, die jedoch mit Ninhydrin-Lösung keine Blaufärbung ergeben. Beim weiteren Einengen scheidet sich d,l - β -[2-Amino-3.4-dimethoxy-benzoyl]-alanin ab, das nach dem Umkristallisieren aus Wasser farblose, blaß gelbgrün schimmernde Nadelchen vom Zersp. 265° bildet; es gibt mit Ninhydrin-Lösung eine blaurote Färbung (Ausb. 450 mg = 28% d. Th.).

$C_{12}H_{15}O_5N_2$ (268.3) Ber. C 53.72 H 6.01 N 10.44 Gef. C 53.79 H 5.90 N 10.16

¹⁵⁾ Soweit nicht anders vermerkt, werden die Schmelzpunkte auf der Kofler-Schmelzbank bestimmt.

7.) *d,l*- β -[2-Amino-3,4-dioxy-benzoyl]-alanin (*d,l*-3,4-Dioxy-kynurenin; VIII): a) *d,l*- β -[2-Amino-3,4-dioxy-benzoyl]-alanin-hydrobromid (*d,l*-3,4-Dioxy-kynurenin-hydrobromid): In einem Schliffkölbchen mit Rückflußkühler und einem bis zum Boden reichenden Gaseinleitungsrohr wird die Lösung von 200 mg *d,l*- β -[2-Amino-3,4-dimethoxy-benzoyl]-alanin in 4 ccm 48-proz. wäßr. Bromwasserstoff 10 Stdn. zum schwachen Sieden erhitzt (Metallbad), während ein schwacher Stickstoffstrom durch die Reaktions-Lösung geleitet wird. Nach dem Abkühlen wird die Lösung mit 2 ccm Wasser versetzt und nach Entfärben mit Tierkohle i. Vak. unter Stickstoff eingengt. Es scheidet sich *d,l*- β -[2-Amino-3,4-dioxy-benzoyl]-alanin-hydrobromid aus, das nach dem Umkristallisieren aus 15-proz. wäßr. Bromwasserstoff farblose Nadelchen vom Schmp. 175° bildet (Ausb. 250 mg = 85 % d.Th.).

$C_{10}H_{12}O_5N_2 \cdot 2HBr$ (402.1) Ber. C 29.87 H 3.51 N 6.97 Br 39.75

Gef. C 30.29 H 3.62 N 6.80 Br 39.13

b) 150 mg *d,l*- β -[2-Amino-3,4-dioxy-benzoyl]-alanin-hydrobromid werden mit 2 ccm Wasser übergossen. Die Substanz löst sich, wird aber sofort hydrolysiert, wobei sich kleine hellgelbe rhombische Kristalle von *d,l*- β -[2-Amino-3,4-dioxy-benzoyl]-alanin vom Zersp. 274° abscheiden. Die Ausscheidung wird durch Zugabe von verd. Ammoniak bis zu p_H 5.5 der überstehenden Lösung vervollständigt (Ausb. 65 mg = 95 % d.Th.). Nach Überschreiten dieser Wasserstoff-Ionen-Konzentration verfärbt sich die Lösung langsam. *d,l*-3,4-Dioxy-kynurenin zeigt eine positive Ninhydrin-Reaktion und gibt mit Eisen(III)-chlorid-Lösung eine blutrote Färbung; es reduziert augenblicklich ammoniakalische Silbersalz-Lösung, was für den Nachweis der Verbindung auf Papierchromatogrammen geeignet ist. In organ. Lösungsmitteln ist es praktisch unlöslich. In Wasser lösen sich bei Zimmertemperatur 15 mg im l; die schwach gelbliche Lösung färbt sich beim Stehenlassen an der Luft nach kurzer Zeit rötlichbraun. In Säuren löst sich 3,4-Dioxy-kynurenin leicht und ohne Zersetzungserscheinungen, während die tiefgelbe alkal. Lösung des Stoffes sehr schnell unter Zerstörung der Verbindung Farbvertiefung zeigt.

$C_{10}H_{12}O_5N_2$ (240.2) Ber. C 50.00 H 5.03 N 11.66 Gef. C 49.86 H 5.21 N 11.24

II.) Versuche über die physiologische Wirksamkeit des *d,l*-3,4-Dioxy-kynurenins

a) als Ommochromvorstufe bei Insekten

Tafel 1. Imaginalaugenfarbe von *Drosophila melanogaster*-Mutanten nach Implantation von Dioxy-kynurenin-Kristallen in 0–10 Stdn. alte Puppen (25°)

Stamm	Substanz	n implant. Tiere	n geschlüpfte Fliegen	Farbklasse M (± 3 m)	Helligkeits- klasse M (± 3 m)
<i>v bw</i>	<i>d,l</i> -3,4-Dioxy-kynurenin	225	36	3.39	5.31
<i>v bw</i>	<i>d,l</i> -3-Oxy-kynurenin	63	18	6.45 (± 0.17)	8.9 (± 0.57)
<i>v bw</i>	Kontrolltiere ohne Implantation	—	26	3.19 (± 0.23)	5.5 (± 0.29)
<i>cn bw</i>	<i>d,l</i> -3,4-Dioxy-kynurenin	167	32	3.0	4.75
<i>cn bw</i>	Kontrolltiere ohne Implantation	—	45	3.02 (± 0.06)	4.87 (± 0.44)

Tafel 2. Imaginalaugenfarbe von *Ephestia kühniella* (Mutation *a*) nach Implantation von Dioxy-kynurenin-Kristallen in 1–3 Tage alte Puppen (20°)

Stamm	Substanz	n	Farbklasse M (± 3 m)	Helligkeits- klasse M (± 3 m)
<i>a</i>	<i>d,l</i> -3.4-Dioxy-kynurenin	170	4.54	8.15
<i>a</i>	<i>d,l</i> -3-Oxy-kynurenin	55	6.13	12.2
<i>a</i>	Kontrolltiere ohne Implantation ..	57	4.79 (± 0.18)	8.38 (± 0.26)

Tafel 3. Imaginalaugenfarbe von *Drosophila melanogaster*-Mutanten nach Umsetzen 72 Stdn. alter Larven auf Testfutter, dem jeweils 0.04% der zu prüfenden Substanz zugesetzt wurde

Stamm	Substanz	Anzahl der Tiere	Imaginal- Augenfarbe
<i>v bw</i>	<i>d,l</i> -3.4-Dioxy-kynurenin	13	farblos
<i>cn bw</i>	<i>d,l</i> -3.4-Dioxy-kynurenin	9	farblos
<i>cn bw</i>	<i>d,l</i> -3-Oxy-kynurenin	9	rot
<i>r bw</i>	ohne Zusatz	10	farblos
<i>cn bw</i>	ohne Zusatz	8	farblos

b) als Nicotinsäure-Vorstufe bei *Neurospora crassa*Tafel 4. Wachstumsversuch mit *Neurospora crassa*, Stamm ATC 10767

	Zur Nährlösung zugesetzte Komponente	Menge	Trockengewicht des Mycels von je 2 Pa- rallelansätzen
1. a)	<i>d,l</i> -3.4-Dioxy-kynurenin	4 γ	7.1 mg
b)	„	4 γ	4.4 mg
c)	„	4 γ	3.8 mg
d)	„	40 γ'	2.5 mg
e)	„	40 γ	3.8 mg
f)	„	40 γ	3.5 mg
g)	<i>d,l</i> -Kynureninsulfat	4 γ	37.4 mg
h)	keine	—	5.0 mg
2. a)	<i>d,l</i> -3.4-Dioxy-kynurenin	2.8 γ	9.1 mg
b)	„	5.5 γ	7.6 mg
c)	„	28 γ	3.7 mg
d)	<i>d,l</i> -Kynureninsulfat	2.8 γ	34.2 mg
e)	„	5.5 γ	33.9 mg
f)	„	28 γ	50.8 mg
g)	keine	—	6.0 mg

Nach Sterilisation der keine Wachstumsfaktoren enthaltenden Nährlösung (45 Min. bei 100°) wurde bei den Versuchen 1. a–f) und 2. a–c) die Lösung der entsprechenden Menge *d,l*-3.4-Dioxy-kynurenin in $n/_{10}$ HCl zugesetzt und anschließend die Gesamtlösung mit der entsprechenden Menge $n/_{10}$ NaOH neutralisiert. Bei den übrigen Versuchen wurde die Nähr-Lösung mit bzw. ohne *d,l*-Kynureninsulfat zur Sterilisation 45 Min. auf 100° erhitzt. Für jeweils 2 Parallelansätze wurden 5 ccm Nähr-Lösung + 1 ccm Testsubstanz enthaltende Lösung verwandt; pH 5.5.