

Arch. Pharm. (Weinheim) 310, 865–872 (1977)

Geza Stájer, Angela E. Szabó, Elemér Vinkler und Pál Sohár\*

## Eine neue Reaktion zur Identifizierung von Mephenytoin

Aus dem Institut für Pharmazeutische Chemie der Medizinischen Universität Szeged und dem Institut für Arzneimittelforschung\*, Budapest  
(Eingegangen am 15. November 1976)

---

Es wurde eine Farbreaktion zur Identifizierung von Mephenytoin (**1a**) ausgearbeitet. Nach Nitrierung von **1a** gibt das Reaktionsprodukt mit Ammoniumhydroxid eine rote Färbung. Durch diese Reaktion, für die das 1,2',4'-Trinitro-mephenytoin (**1h**) verantwortlich ist, kann **1a** von der Norverbindung Nirvanol, sowie von anderen phenylsubstituierten Hypnosedativa und Anticonvulsiva unterschieden werden. Durch präp. DC und fraktionierte Kristallisation wurden fünf Nitroverbindungen aus dem Nitrierungsgemisch isoliert, deren Struktur mittels IR- und NMR-Spektroskopie aufgeklärt wurde.

### New Reaction for the Identification of Mesantoin

A new colour reaction for the identification of mesantoin (**1a**) has been developed. Nitration of **1a** yields 1,2',4'-trinitromesantoin (**1h**), which reacts with ammonia to give a red colour. This reaction serves to distinguish **1a** from the nor compound nirvanol and from other hypnosedativa and anticonvulsiva. From the reaction mixture five nitro derivatives were isolated by preparative tlc. Their structures were elucidated by i.r. and n.m.r. spectroscopy.

---

Zur Identifizierung von Mephenytoin (5-Äthyl-3-methyl-5-phenyl-hydantoin) (**1a**) ist bisher keine spezifische Reaktion bekannt, deshalb kann die Verbindung nur durch UV- und IR-Spektroskopie, mit DC und GC, sowie durch Darstellung von Derivaten charakterisiert werden<sup>1-6</sup>). Mit nichtspezifischen Reaktionen kann man **1a**

\* Wir sind Frau *M. Fejes*, FrI. *V. Windbrechtinger* und Herrn *A. Fürjes* für die technische Mitwirkung verbunden.

- 1 J. Kračmar und J. Kračmarova, *Cesk. Farm.* 15, 16 (1966).
- 2 G. Machata und W. Kisser, *Arch. Toxicol.* 19, 327 (1962).
- 3 T. H. Elliot, P. N. Natarajan, *J. Pharm. Pharmacol.* 19, 209 (1967).

auch von Nirvanol nicht unterscheiden<sup>7,8</sup>). Wir haben versucht, eine spezifische Farb-reaktion auszuarbeiten. Zu diesem Zweck nitrierten wir **1a** mit  $\text{KNO}_3/\text{konz. H}_2\text{SO}_4$  unter Erwärmen, wonach das Reaktionsgemisch mit Ammoniumhydroxid eine rote Färbung ergibt.

Bei der Nitrierung entstehen mehrere Verbindungen, fünf von diesen (**1d–h**) wurden durch fraktionierte Kristallisation, bzw. präp. DC isoliert (Abb. 1). In der Mutterlauge wurden zwei weitere Verbindungen nachgewiesen, die aber nicht in reinem Zustand isoliert werden konnten. Bei der Nitrierung unter milden Bedingungen<sup>9</sup>) entstehen die Mononitroderivate **1b** und **1c**.

Die Nitrierung von **1a** wurde schon von *Wiegrebe* und Mitarb. untersucht<sup>10</sup>) und **1b** isoliert, dann dessen Struktur durch oxidativen Abbau bewiesen. Ebenso nahmen sie an, daß auch **1c** entsteht, sie konnten es aber nicht beweisen. Uns gelang es auch, **1c** zu isolieren und die Struktur beider Mononitroderivate, sowie die der Verbindungen **1d–h** mittels IR- und NMR-Spektroskopie zu beweisen.

	<b>1a</b>	$\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{R}^3 = \text{R}^4 = \text{R}^5 = \text{H}$	Schmp.° 136
	<b>1b</b>	$\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{R}^4 = \text{R}^5 = \text{H}; \text{R}^3 = \text{NO}_2$	201–202
	<b>1c</b>	$\text{R}^1 = \text{R}^3 = \text{R}^4 = \text{R}^5 = \text{H}; \text{R}^2 = \text{NO}_2$	153–155
	<b>1d</b>	$\text{R}^1 = \text{R}^4 = \text{R}^5 = \text{H}; \text{R}^2 = \text{R}^3 = \text{NO}_2$	167–169
	<b>1e</b>	$\text{R}^2 = \text{R}^3 = \text{R}^5 = \text{H}; \text{R}^1 = \text{R}^4 = \text{NO}_2$	207–208
	<b>1f</b>	$\text{R}^1 = \text{R}^3 = \text{R}^5 = \text{H}; \text{R}^2 = \text{R}^4 = \text{NO}_2$	194–195
	<b>1g</b>	$\text{R}^1 = \text{R}^3 = \text{H}; \text{R}^2 = \text{R}^4 = \text{R}^5 = \text{NO}_2$	199–201
	<b>1h</b>	$\text{R}^2 = \text{R}^4 = \text{H}; \text{R}^1 = \text{R}^3 = \text{R}^5 = \text{NO}_2$	154–156

Abb. 1: Nitrierungsprodukte von **1a**

In den IR-Spektren der Derivate **1b–h** konnten die Nitrobanden in allen Fällen gefunden werden (Tab. 1). Die unveränderte Struktur des Hydantoinringes wurde im Falle der Verbindungen **1b–f** durch die  $\nu\text{NH}$ -Banden, ferner die für die cyclische Imidstruktur charakteristischen gekoppelten  $\nu\text{C}=\text{O}$ -Banden bewiesen. In den NMR-Spektren konnten die Signale des Imidprotons und der Äthylgruppe identifiziert werden (Tab. 2). Danach erfolgte die Nitrosubstitution dieser Derivate ausschließ-

- 4 L. Erdey, L. Káplár, J. Takács und Y. M. Dessouky, *J. Chromatogr.* **45**, 63 (1969).
- 5 C. Gardner-Thorpe, M. J. Parsonage, P. F. Smethurst und C. Toothill, *Clin. Chim. Acta* **36**, 223 (1972).
- 6 D. K. Jung, T. P. Forrest, M. L. Gilroy und M. M. Vohra, *J. Pharm. Sci.* **62**, 1764 (1973).
- 7 G. Brockelt, *Pharmazie* **12**, 215 (1957).
- 8 G. W. Pennington und D. Smyth, *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **152**, 285 (1964); ref. C. A. **62**, 8941e (1965).
- 9 J. W. Huisman, *Clin. Chim. Acta* **13**, 323 (1966).
- 10 W. Wiegrebe, L. Wehrhahn und U. P. Schlunegger, *Pharm. Acta Helv.* **50**, 261 (1975).

lich am aromatischen Ring. In den IR-Spektren der Derivate **1g, h** sind keine NH-Banden vorhanden, und die Frequenzen der  $\nu\text{C}=\text{O}$ -Banden sind, im Vergleich mit denen der Verbindungen **1b–f**, wesentlich größer. Die chemischen Verschiebungen der N-Methyl- und der Methylenprotonen sind ebenfalls wesentlich größer. Diese Angaben weisen auf das Entstehen eines N-Nitroderivates hin. In Übereinstimmung erschien kein NH-Signal im NMR-Spektrum, die Multipletts der Äthylgruppe konnten dagegen identifiziert werden. Die N-Nitrierung des Hydantoinringes ist schon früher beschrieben worden<sup>11)</sup>.

Die Position der Nitrogruppen am aromatischen Ring wurde durch NMR-Untersuchungen aufgeklärt (s. a. <sup>12,13)</sup>). Auf Grund der Signale der aromatischen Protonen mit einer Gesamtintensität von vier Protonen konnten die Strukturen **1b** und **1c** sehr einfach zugeordnet werden. Im Spektrum von **1b** erschien nämlich das für die *para*-Disubstitution charakteristische, einfache **AA'BB'**-Multiplett und in dem von **1c** das der *meta*-Disubstitution entsprechende, komplizierte **ABCD**-Multiplett. Ebenso einfach konnten die Spektren der Verbindungen **1f** und **1g** erkannt werden. In den Spektren dieser Verbindungen erscheint nämlich das für die symmetrisch-3,5-disubstituierte Phenylgruppe charakteristische **A<sub>2</sub>X**-Multiplett mit einer Intensität von 3H, woraus sich – berücksichtigt man auch die IR-Angaben, das Vorkommen bzw. die Abwesenheit des NH-Signals im NMR-Spektrum, ferner die Kopplungskonstante **J<sub>AX</sub>** mit einer für die *meta*-Kopplung charakteristischen Größe – die Strukturen **1f** bzw. **1g** ergaben.

In sämtlichen weiteren isolierten Produkten kommen 1,2,4-trisubstituierte, d. h. zwei Nitrogruppen enthaltende Arylringe vor. Das wurde durch die **AMX**-, **ABX**-, bzw. **ABC**-Multipletts der Ringprotonen von 3H Intensität bestätigt.

Die Reihenfolge der chemischen Verschiebungen und damit die Aufspaltung der Signale konnte mit großer Wahrscheinlichkeit vorausgesagt werden<sup>12–14)</sup>. Die Einwirkung der Nitrogruppe auf die Ringprotonen konnte auf Grund der aus dem **AA'BXX'**-Spektrum des Nitrobenzols berechneten chemischen Verschiebungen bewertet und die des Heteroringes mit Hilfe der Angaben der Verbindung **1a** abgeschätzt werden. Diese Methode ermöglicht aber nur eine Annäherung, denn die gegenseitige Position der Substituenten und des aromatischen Ringes in Benzolderivaten mit benachbarten Substituenten unterscheidet sich von der in monosubstituierten Derivaten wegen der sterischen Hinderung (bei den mehrfach substituierten Verbindungen dominiert die für die monosubstituierte charakteristische koplanare Konformation nicht mehr). Die die chemische Verschiebung beeinflussende anisotrope Wirkung der Substituenten kann gegebenenfalls, der unterschiedlichen sterischen Struktur entsprechend, in bedeutendem Maße verschieden sein. Daher kann auf die Struktur nur in dem Falle verlässlich geschlossen werden, so sich die zu unterscheidenden Substi-

11 R. E. Stuckey, J. Chem. Soc. 1947, 331.

12 P. Sohár, Kernresonanzspektroskopie (ungarisch), S. 477–479, Akadémiai Kiadó, Budapest 1976.

13 E. Vinkler, P. Németh, G. Stájer, P. Sohár und Gy. Jerkovich, Arch. Pharm. (Weinheim) 309, 265 (1976).

14 G. Stájer, E. Vinkler, P. Németh und P. Sohár, Arch. Pharm. (Weinheim), 310, 326 (1977).

Tab. 1: Die wichtigeren IR-Daten der Verbindungen 1a-h ( $\text{cm}^{-1}$ )

l	a	b	c	d	e	f	g	h
$\nu_{\text{NH}}$	3300	3300– 2700	3270	3300	3300– 2800	3250	–	–
$\beta_{\text{NH}}$	1450	1455	1460	1460	1460	1460	–	–
$\nu_{\text{CO}}$	1750	1770	1770	1780	1780	1780	1810	1810
	1700	1710	1700	1700	1710	1705	1740	1740
$\nu_{\text{asNO}_2}$	–	1510	1520	1535	1540	1535	1575 <sup>□</sup> 1540	1572 <sup>□</sup> 1530
$\nu_{\text{sNO}_2}$	–	1350	1345	1370	1370	1345	1345	1350
				1350	1355		1265 <sup>□</sup>	1265 <sup>□</sup>
$\beta_{\text{sNO}_2}$	–	850*	850	850	870 835	840	830	835
$\gamma_{\text{C}_{\text{Ar}}\text{H}}$	870,780	850*	765**	730	760,750	790	770	780,770
	760,730		725,710**	710	740,720	725	730	750,740
$\gamma_{\text{C}_{\text{Ar}}\text{C}_{\text{Ar}}}$	700						720	735,725,705

□ Charakteristisch für die N-NO<sub>2</sub>-Gruppe; \* Ungetrennt, die Frequenz ist charakteristisch für die p-Disubstitution; \*\* charakteristisch für die m-Disubstitution.

Tab. 2: Die NMR-Daten der Verbindungen 1a-h  
Chemische Verschiebungen ( $\delta_{\text{TMS}} = 0$  ppm) und Kopplungskonstanten (Hz)

Verbin- dung	Äthylgruppe		N-Methyl- gruppe		Heteroring $\delta_{\text{NH}}$	Arylprotonen			
	$\delta_{\text{CH}_3}$ $t^+$ (3H)	$\delta_{\text{CH}_2}$ $qu^+$ (2H)	$\delta_{\text{CH}_3}$ $s$ (3H)	$\delta_{\text{NH}}$ $s$ (1H)		$\delta \Delta_{\text{H}^{\text{X}}}$	J <sub>AB</sub> J <sub>AM</sub>	J <sub>AX</sub>	J <sub>BX</sub> J <sub>MX</sub>
1a <sup>o</sup>	0,90	2,20	3,00	~7,9	430-465 m (5H)	-	-	-	AA'BB'C
1b <sup>o</sup>	0,85	2,15	3,00	~8,9	7,85 (H-2,6) m (2H) 8,20 (H-3,5) m (2H)	9	-	-	AA'BB'
1c <sup>o</sup>	0,98	2,28	3,13	~8,0*	460-530 m (4H)	-	-	-	ABCD
1d <sup>o</sup>	0,95	2,20	3,05	~7,0	$\delta_{\text{A}} = 7,96$ (H-5) d (1H) $\delta_{\text{B}} = 8,05$ (H-6) 2xd (1H) $\delta_{\text{X}} = 8,20$ (H-2) d (1H)	8,5	~0,5	~2	ABX
1e <sup>o</sup>	0,95	2,35	3,05	~5,85	8,45 (3H)	-	-	-	ABC~A <sub>3</sub>
1f <sup>o</sup>	1,00	2,30 <sup>□</sup>	3,08	~7,15	$\delta_{\text{A}} = 8,87$ (H-2,6) d (2H) $\delta_{\text{X}} = 9,03$ (H-4) t (1H)	-	2	-	A <sub>2</sub> X
1g <sup>o</sup>	1,00	2,80	3,15	-	$\delta_{\text{A}} = 8,75$ (H-2,6) d (2H) $\delta_{\text{X}} = 8,95$ (H-4) t (1H)	-	2	-	A <sub>2</sub> X
1h <sup>o</sup>	1,00	2,80	3,22	-	$\delta_{\text{A}} = 8,10$ (H-6) d (1H) $\delta_{\text{M}} = 8,50$ (H-3) d (1H) $\delta_{\text{X}} = 8,53$ (H-5) 2xd (1H)	0	9	2	AMX

<sup>+</sup>J = 7 Hz; <sup>o</sup> Aufgenommen bei 60 MHz; <sup>•</sup> Aufgenommen bei 100 MHz; \* Mit dem Multiplett der Ringprotonen Überlappung  
<sup>x</sup> $\Delta_{\text{H}}$  = Spektrumintervall (Hz), im Falle von Multipletts;  $\square$  = AB-Teil eines ABX<sub>3</sub> Multipletts

tationsmöglichkeiten in Hinsicht auf die chemischen Verschiebungen genügend unterscheiden. Für die in dem gegenwärtigen Bericht beschriebenen Verbindungen ist das nicht der Fall – im Gegensatz zu den früher behandelten Analoga<sup>13,14</sup>) – und daher können die im folgenden angegebenen Strukturen **1d**, **e**, **h** nur als wahrscheinlich, nicht – wie **1b**, **c**, **f** und **g** – als bewiesen betrachtet werden. Dies desto mehr, als eine der drei Verbindungen ein N-Nitroderivat ist, was gleichfalls zur Veränderung – obwohl nur in geringfügigem Maße (s. a. die spektralen Angaben bei **1f** und **1g**) – der anisotropen Wirkung des Heteroringes führen kann.

Im Falle einer 2,4-Dinitrosubstitution hat **H-6** die kleinste chemische Verschiebung unter den Ringprotonen, und das entsprechende Signal ist ein Dublett mit der für die *ortho*-Kopplung charakteristischen Aufspaltung von etwa 9 Hz. So konnte die Struktur **1h** der Verbindung mit dem Schmp. 154–156° zugeordnet werden.

Im Falle einer 2,5-Dinitrosubstitution unterscheiden sich die erwarteten chemischen Verschiebungswerte der Ringprotonen kaum, d. h. das **AMX**-Spektrum nähert sich dem Grenzfall **A<sub>3</sub>** (Singulett). Das Isomer mit dem Schmp. 207–208° weist ein derartiges Spektrum auf, seine Struktur **1e** kann daher als sehr wahrscheinlich betrachtet werden. Das Vorkommen eines 1,2,4-trisubstituierten Ringes wurde noch dadurch bewiesen, daß in anderen Lösungsmitteln (z. B. Aceton-d<sub>6</sub>, bzw. DMSO-d<sub>6</sub>) ein **ABX**-Multiplett erscheint. Für das Isomer mit dem Schmp. 167–169° bleibt nun die Struktur **1d** mit dem 3,4-dinitrosubstituierten Ring übrig. Diese Zuordnung steht einerseits mit den chemischen Eigenschaften (s. unten) und andererseits mit den spektralen Angaben in Einklang. In dieser Verbindung befinden sich nämlich die Nitrogruppen in benachbarten Stellungen, wobei nur eine der beiden mit dem Ring koplanar stehen kann, daher können in diesem Fall die kleinsten relativen chemischen Verschiebungen erwartet – und gemessen – werden.

**1d** ergibt mit Hydroxylamin in alkalischem Milieu – ähnlich den aromatischen Dinitroverbindungen<sup>15</sup>) – eine violette Färbung, welche die Richtigkeit der vorgeschlagenen Struktur unterstützt. Daneben wurde die Struktur **1h** durch oxidativen Abbau zur 2,4-Dinitrobenzoesäure bestätigt<sup>16</sup>).

Die violette Farbreaktion von **1d** ist zur Identifizierung von **1a** nicht geeignet, weil die anderen Nitrierungsendprodukte die Farbe zu Braunrot modifizieren. **1h** jedoch gibt mit Ammoniumhydroxid eine Rotfärbung ( $\lambda_{\max} = 528 \text{ nm}$ ), welche die Identifizierung von **1a** ermöglicht. Der rote Farbstoff konnte nicht isoliert werden, es wurde aber festgestellt, daß die Ausgangsverbindung **1h** nach Ansäuern der alkalisierten Lösung zurückgewonnen werden kann, die Farbreaktion ist also reversibel. Wahrscheinlich entsteht ein EDA-Komplex. Die Farbreaktion kann außer mit Ammoniak auch mit Alkylaminen ausgelöst werden. Die uns zur Verfügung stehende geringe Substanzmenge ermöglichte keine weiteren Untersuchungen. Das andere N-Nitroderivat gibt die Farbreaktion nicht. Daraus folgt, daß die Voraussetzung zur roten Farbreaktion einerseits die Nitrosubstitution eines der Stickstoffatome am Heteroring und andererseits die gleichzeitige Substitution in 2- und 4-Stellung am Aryl-

15 F. Feigl, Spot Tests in Organic Analysis, 5. erweiterte und korr. Ausgabe (engl.), S.31, Elsevier Publishing Co., London 1956.

16 A. E. Pierce, M. M. Rising, J. Am. Chem. Soc. 58, 1361 (1936).

ring ist. Es ist interessant, daß mit Alkalilauge die rote Farbe nicht erscheint. Die Reaktion ist spezifisch, weil sie von anderen phenylsubstituierten Hypnosedativa und Anticonvulsiva (Glutethimid, Phenobarbital, Primidon, Phenytoin, usw.) und selbst von Nirvanol (5-Äthyl-5-phenyl-hydantoin) nicht ausgelöst werden kann.

Da die Nitrierung von **1a** unter milden Bedingungen das Hauptprodukt **1b** ergibt, sollte die primäre Substitution am Arylring in *para*-Stellung erfolgen. Während die Verbindungen **1d, h** durch Weiternitrierung von **1b** entstehen, können **1e, f, g** als weiternitrierte Derivate von **1c** betrachtet werden. Die relativen Mengen der Produkte können wegen des komplizierten Isolierungsverfahrens nicht angegeben werden.

### Experimenteller Teil\*

*Schmp.* unkorrt. *IR-Spektren* in KBr, Perkin-Elmer 577, *NMR-Spektren* JEOL-HL, bzw. FT-VARIAN XL-100 Spektrometer (Raumtemp.).

#### 1. Nitrierung

10 g **1a** werden in 200 ml konz.  $H_2SO_4$  gelöst, dann unter Rühren 50 g  $KNO_3$  zugefügt. Das Gemisch wird 5 Min. auf dem siedenden Wasserbad erhitzt und nach Abkühlen auf Eis gegossen. Das ausgeschiedene Produkt wird mit Wasser gewaschen und getrocknet. Ausb.: 12,5 g.

#### 2. DC

Das Rohprodukt von **1a** wird in Methanol gelöst und auf DC-Platten (Kieselgel G. Merck) aufgetragen und das Chromatogramm mit  $CHCl_3$ -Cyclohexan-Pyridin (60 : 20 : 5) entwickelt. Nach Trocknen werden die Flecke mit  $SnCl_2$ -Lösung (5 g  $SnCl_2 \cdot 2H_2O$  + 15 ml konz. HCl + 80 ml  $H_2O$ ) und nach Trocknen mit *p*-Dimethylamino-benzaldehyd-Lösung (1 g *p*-Dimethylamino-benzaldehyd + 85 ml Methanol + 5 ml 2N HCl) sichtbar gemacht: Sechs gelbe Flecke vom Startpunkt in der Reihenfolge: **1d, 1b + c, 1f, 1h** und **1g**.

#### 3. Isolierung von **1e**

2 g Rohprodukt in 20 ml 2N NaOH werden filtriert, dann unter Rühren und Kühlung mit 4N HCl angesäuert. Das gewonnene Produkt wird mit Wasser gewaschen und aus Äthanol mehrmals umkristallisiert. Farblose Kristalle, Schmp. 207–208°.  $C_{12}H_{12}N_4O_6$  (308,25); Ber.: C 46,76 H 3,92 N 18,18; Gef.: C 46,78 H 4,12 N 18,1.

#### 4. Isolierung von **1g**

Zur Vorreinigung wurden 10 g Rohprodukt auf eine  $Al_2O_3$  (Woelm neutral)-Säule aufgetragen und mit  $CHCl_3$  eluiert. Der trockene Rückstand des Eluats wurde unter Erwärmen in Methanol gelöst. Jede 30 Min. wird das ausgeschiedene Produkt abfiltriert und die einzelnen Fraktionen werden auf Grund von DC vereinigt. Die ersten Kristallfraktionen bestehen hauptsächlich aus **1g**. Nach Umkristallisieren aus Äthanol werden farblose, lockere Nadeln gewonnen, die in alkoholischer Lösung weder mit Ammoniak, noch mit  $NH_2OH \cdot HCl$  in 2N NaOH eine Färbung ergeben. Schmp. 199–201°.  $C_{12}H_{11}N_5O_8$  (353,25); Ber.: C 40,80 H 3,14 N 19,83; Gef.: C 40,90 H 3,21 N 19,70.

### 5. Isolierung von 1h

Einige der nach 4.) gewonnenen Kristallfraktionen bestehen größtenteils aus **1h**. Diese werden nach DC vereinigt und aus Äthanol etwa 15 mal umkristallisiert. Hellgelbe, schimmernde Prismen, welche sich in Äthanol mit Ammoniumhydroxid intensiv rot färben; Schmp. 154–156°.  $C_{12}H_{11}N_5O_8$  (353,25) Ber.: C 40,80 H 3,14 N 19,83; Gef.: C 40,88 H 3,28 N 19,59.

#### 5. 1. Oxidativer Abbau von 1h<sup>16)</sup>

Der Abbau wurde im Mikromaßstab durchgeführt. Als Vergleichssubstanzen wurden *p*-Nitrobenzoesäure, 2,4-, 3,4- und 3,5-Dinitrobenzoesäure verwendet. Die Chromatogramme wurden mit dem Fließmittel<sup>10)</sup> mindestens 7 mal entwickelt. Detektion unter UV-Licht, bzw. nach 2.).

### 6. Isolierung von 1f

Die Reste der nach 4. gewonnenen Kristallfraktionen werden vereinigt, in Methanol gelöst und auf präp. DC-Platten aufgetragen (Kieselgel PF<sub>254</sub>, Merck, Schichtdicke: 1 mm), dann laut 2.) entwickelt. Der dritte Streifen von oben (UV-Licht) wird abgehoben und mit heißem Methanol eluiert. Nach Eindampfen des Eluats wird der Rückstand mit je 10 ml Äthanol 6 mal zur Trockne eingedampft, dann aus Äthanol mehrmals umkristallisiert. Hellgelbe Kristalle. Schmp. 194–195°.  $C_{12}H_{12}N_4O_6$  (308,25). Ber.: C 46,76 H 3,92 N 18,18; Gef.: C 46,88 H 4,12 N 18,19.

### 7. Isolierung von 1d

Die nach 4.) erhaltenen methanolischen Mutterlaugen werden vereinigt, zur Trockne eingedampft und der Rückstand in Methanol auf präp. DC-Platten aufgetragen, dann nach 6.) entwickelt. Der niedrigste Streifen wird abgehoben, dann mit heißem Methanol eluiert. Nach Eindampfen des Eluats wird der trockene Rückstand mehrmals aus Äthanol umkristallisiert. Farblose Kristalle, Schmp. 167–169°. Die Substanz gibt in alkalischer Lösung mit  $NH_2OH \cdot HCl$  eine violette Färbung.  $C_{12}H_{12}N_4O_6$  (308,25); Ber.: C 46,76 H 3,92 N 18,18; Gef.: C 46,60 H 3,90 N 18,00.

### 8. Herstellung von 1c

Die bei der Nitrierung von **1a**<sup>9)</sup> erhaltenen Mutterlaugen werden vereinigt und zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird mindestens 15 mal aus Äthanol umkristallisiert. Farblose Kristalle, Schmp. 153–155°.  $C_{12}H_{13}N_3O_4$  (263,26); Ber.: C 54,75 H 4,98 N 15,96; Gef.: C 54,85 H 5,10 N 16,15.

### 9. Identitätsreaktion

0,02 g **1a**, 0,10 g  $KNO_3$  und 10 Tropfen konz.  $H_2SO_4$  werden in einem trockenen Proberöhrchen 5 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt, nach Abkühlen mit 2 ml Wasser, dann mit 1 ml Methanol verdünnt. Auf Zugabe von 3 ml konz. Ammoniumhydroxid verfärbt sich das Gemisch in einigen Min. rot, diese Färbung wird beim Stehen stärker.