

265. Ensor R. Holiday und Kurt G. Stern: Über das spektrale Verhalten des Photo-flavins, des Alloxazins und verwandter Verbindungen: Einfluß der Wasserstoff-Ionen-Konzentration und der zweistufigen Reduktion.

[Aus d. Med. Unit, London Hospital und aus d. Courtauld Institute of Biochemistry, Middlesex Hosp. Med. School, London.]

(Eingegangen am 20. Juni 1934.)

Die Eigentümlichkeit einer Reihe aromatischer Verbindungsklassen, in Lösung unter bestimmten Bedingungen als teilweise oxydierte und teilweise reduzierte Körper von charakteristischer Färbung aufzutreten, ist weit eingehender vom chemischen als vom optischen Standpunkt studiert worden. Dennoch läßt das bereits vorliegende Beobachtungsmaterial erkennen, daß intermediäre Körper dieser Art nicht allein eine tiefere Färbung, sondern auch ein komplizierter beschaffenes Spektrum im Vergleich zu den entsprechenden voll-oxydierten und voll-reduzierten Formen besitzen. Diese Feststellung läßt sich in einer Reihe untersuchter Beispiele weiter dahingehend präzisieren, daß die intermediäre Form im Sichtbaren mindestens eine Absorptionsbande mehr als die voll-oxydierte Stufe aufzuweisen pflegt. Die neue Bande pflegt die langwelligste des Systems zu sein. Die voll-reduzierte Stufe zeigt im Sichtbaren meist keine abgegrenzte Bande, sondern höchstens eine geringfügige unspezifische Absorption.

Die Formulierung der teilweise oxydierten Verbindungen als molekulare Additionsverbindungen der voll-oxydierten und voll-reduzierten Stufe nach Art der Chinhydrone (R. Willstätter und J. Piccard¹⁾) bzw. als radikalartige Moleküle mit zweiwertigem Kohlenstoff oder Stickstoff (A. Hantzsch²⁾, E. Weitz³⁾) hat Vergleiche ihres Lichtabsorptions-Verhaltens mit demjenigen der Methylradikale (K. H. Meyer und H. Wieland⁴⁾) einerseits und mit dem echter Chinhydrone (vergl. z. B. I. Lifschitz⁵⁾) andererseits angeregt. Das Ergebnis derartiger Vergleiche⁶⁾ ist, daß eine gewisse Analogie in den spektralen Eigenschaften der oxydativen Zwischenstufen und der Methylradikale besteht, während die Lösungen der Chinhydrone sich abweichend verhalten: In verdünnter Lösung tritt weitgehender Zerfall in die beiden Komponenten ein, es gelangt im wesentlichen das Spektrum der chinoiden Form zur Beobachtung. In konzentrierteren Lösungen macht sich die Gegenwart undissoziierter Chinhydrone-Moleküle durch eine Vereinfachung des Spektrums bemerkbar.

Die mangelnde optische Ähnlichkeit zwischen den molekularen Additionsprodukten vom Typus des einfachen Chinhydrone und den sog. *meri*-chinoiden Körpern wurde bereits von A. Hantzsch²⁾ als Stütze für die versuchsweise Formulierung der letzteren als monomolekulare radikalartige Körper angeführt. Die Radikal-Natur der bei teilweiser Reduktion von gewissen Dipyridyl- und Phenazin-Derivaten, sowie der bei teilweiser Oxydation alkylierter aromatischer Diamine auftretenden tiefgefärbten Zwischenstufen ist seitdem bekanntlich von E. Weitz und Mitarbeitern⁷⁾

¹⁾ B. **41**, 1458 [1908].

²⁾ B. **49**, 511 [1916].

³⁾ Ztschr. Elektrochem. **34**, 538 [1928].

⁴⁾ B. **44**, 2557 [1911].

⁵⁾ B. **49**, 2050 [1916], **50**, 906 [1917].

⁶⁾ vergl. z. B. A. Hantzsch, l. c. 2), ferner W. M. Clark, B. Cohen u. H. D. Gibbs, U. S. A. Publ. Health Rep. Suppl. 54 [1926] und besonders L. Michaelis u. E. S. Hill, Journ. Amer. chem. Soc. **55**, 1481 [1933].

⁷⁾ Lit. bei l. c. 3).

vornehmlich durch Molekulargewichts-Bestimmungen nach der ebullioskopischen Methode an Dipyridyl-Derivaten und in jüngster Zeit von L. Michaelis und Mitarbeitern⁸⁾ durch potentiometrische Analyse aller drei Verbindungsklassen sehr wahrscheinlich gemacht worden. Es ist bemerkenswert, daß diese, von L. Michaelis als Semi-chinone bezeichneten, radikal-artigen Zwischenstufen nur in Form einwertiger Kationen, also im sauren p_H -Bereich, nennenswerte Beständigkeit besitzen.

Bei der Reduktion der zurzeit von verschiedenen Seiten bearbeiteten Flavine, sowie ihres Licht-Spaltproduktes, das im folgenden als Photo-flavin bezeichnet wird, tritt in saurer Lösung eine rote Zwischenstufe auf, worüber zuerst von R. Kuhn und Th. Wagner-Jauregg⁹⁾ berichtet worden ist. Die gleichen Autoren machten auf die Ähnlichkeit dieser „Farb-reaktion“ mit dem Verlauf der Alloxazin-Reduktion aufmerksam. Das Spektrum wurde anscheinend nur subjektiv untersucht: Für den Fall des Lacto-flavins wird der Schwerpunkt der langwelligen Bande des roten Körpers mit 490 $m\mu$ angegeben. Nach R. Kuhn und F. Bär¹⁰⁾ soll das Auftreten einer roten Zwischenstufe bei dieser Körperklasse an die Unversehrtheit des alkali-labilen Pyrimidin-Ringes geknüpft sein: Das gelbe Oxy-chinoxalin-carbonsäure-ureid, das sich durch hydrolytische Aufspaltung des Alloxan-Ringes vom Alloxazin ableitet, läßt bei Reduktion durch Zink, Zinn, Natrium-amalgam in stark saurer Lösung keine rote Zwischenstufe erkennen. Wir finden, daß dies nur zutrifft, wenn die Reduktion mit den genannten Reduktionsmitteln ausgeführt wird. Bei Reduktion mit Chromchlorür in mineral-saurer Lösung tritt jedoch auch bei der gelben Ureido-säure eine schön rote Zwischenstufe auf. Damit ist gezeigt, daß die Unversehrtheit des Pyrimidin-Ringes keine notwendige Vorbedingung für die Reaktion darstellt, sondern daß es sich hier nur um graduelle, wohl durch Potentialgrößen bedingte, Unterschiede handelt.

Daß den Flavinen, deren Konstitution bis auf den alkali-labilen Ring und die bei Belichtung abgespaltene zucker-artige Gruppe von 4 C-Atomen (R. Kuhn und Mitarbeiter¹¹⁾) im einzelnen noch nicht geklärt ist, eine alloxazin-artige Struktur zugrundeliegt, ist durch synthetische Versuche der Verfasser¹²⁾ sehr wahrscheinlich gemacht worden. Wir haben in den Kreis unserer optischen Versuche die Verbindung einbezogen, welche aus Tolu-alloxazin im Schmelzfluß mit überschüssigem Kalium-äthyl-sulfat entsteht und über deren andere Eigenschaften, insbesondere Konstitution, im Zusammenhang mit anderen, analog gewonnenen, Körpern getrennt berichtet werden soll, soweit dies noch nicht in der zitierten vorläufigen Mitteilung geschehen ist.

Die potentiometrische Analyse des Photo-flavins hat den einen von uns zu dem Schluß geführt, daß die rote Zwischenstufe, die bei der Reduktion (beispielsweise mit Titantrichlorid oder Chromchlorür) im sauren Gebiet auftritt, zu der von Michaelis umrissenen Klasse der semi-chinoiden Salze zu rechnen ist¹³⁾. Unveröffentlichte Versuche an dem oben genannten Äthylierungsprodukt des Tolu-alloxazins haben bisher dasselbe

⁸⁾ Lit. bei l. c. 6).

⁹⁾ B. **67**, 361 [1934].

¹⁰⁾ B. **67**, 898 [1934].

¹¹⁾ Zusammenfassung bei Th. Wagner-Jauregg, *Angew. Chem.* **47**, 318 [1934].

¹²⁾ B. **67**, 1104 [1934].

¹³⁾ K. G. Stern, *Biochem. Journ.* **28**, 949 [1934].

ergeben. Die vorliegenden optischen Messungen wurden ausgeführt, da es wünschenswert erschien, diese Schlußfolgerung mit Hilfe einer unabhängigen Methode nachzuprüfen.

Bevor auf diese Resultate eingegangen wird, ist es notwendig, das spektrale Verhalten der genannten Verbindungen bei variiertem H-Ionen-Konzentration zu beschreiben: Das charakteristische Drei-Banden-Spektrum der Flavine, des Photo-flavins, des Alloxazins und seiner Homologen, sowie der photo-flavin-ähnlichen neuen Alkylierungsprodukte der Alloxazine¹²⁾ wird nur in neutraler und alkalischer Lösung beobachtet. Unter diesen Bedingungen schließen sich an eine im kurzwelligen Ultraviolett (zwischen 255 und 270 μ) gelegene, sehr steile und scharfe Absorptionsbande (Mol. Extinkt. $E = \frac{1}{c} \times \frac{1}{d} \log \frac{I_0}{I} = 2.5-4.10^4$) zwei längerwellige Nebenbanden an, von denen eine im langwelligen Ultraviolett und die andere im blauviolettten Gebiet liegt. Diese Nebenbanden sind weit niedriger (Mol. Extinkt. 0,5 bis 1.0×10^4) und weniger gut definiert als die Hauptbande. Die Änderung in der Lichtabsorption der genannten Verbindungen, die beim Ansäuern eintritt, bezieht sich auf die Nebenbanden, während die Hauptbande innerhalb enger Grenzen unverändert gefunden wird. Mit steigender H-Ionen-Konzentration tritt eine allmähliche Verschmelzung der beiden Nebenbanden zunächst zu einem sehr flachen Maximum und schließlich zu einer ausgeprägten, im langwelligen Ultraviolett (zwischen 360 und 390 μ) liegenden Einzelbande ein. Für den Einzelfall des Ovo-flavins ist hierüber bereits von R. Kuhn, G. György und Th. Wagner-Jauregg¹⁴⁾ berichtet worden. Unsere Befunde, die in der Tabelle zusammengestellt sind, zeigen, daß es sich um eine Klassen-Eigenschaft der Alloxazine handelt. Das Oxy-chinoxalin-carbonsäure-ureid zeigt keine im kurzwelligen Ultraviolett gelegene steile Hauptbande, sondern, wie die Tabelle lehrt, nur zwei (niedrigere) längerwellige Banden. Das oben über den Spektraltypus der Alloxazine Gesagte bezieht sich auf Lösungen, deren Acidität bis max. 50 % Schwefelsäure entspricht. Die subjektive Farbe solcher Lösungen ist gelb. In konz. Schwefelsäure hingegen gehen Alloxazin, das Äthylierungsprodukt des Tolu-alloxazins und Photo-flavin mit roter Farbe in Lösung. Spektrographisch wurde bisher nur das Verhalten der ersten beiden Körper in diesem Solvens untersucht. Wie die Tabelle zeigt, wurden in der Alloxazin-Lösung (subl. Präparat) sofort nach dem Auflösen zwei längerwellige Maxima gefunden, die nach 2-stdg. Stehen bei Raum-Temperatur unter subjektivem Farbwechsel von rot nach orangegelb allmählich einem einzelnen Maximum Platz machten, das unweit dem in 50-proz. Schwefelsäure gemessenen Schwerpunkt liegt. Im Gegensatz hierzu zeigt die Lösung des Äthylierungsproduktes des Tolu-alloxazins von vornherein nur eine langwellige Bande, die im Verlaufe von 3 Stdn. nur eine geringfügige Verschiebung nach rot hin um etwa 10 μ erleidet. Die sich über 18 Stdn. erstreckende Beobachtung der Transmission einer Lösung eines anderen Alloxazin-Präparates in konz. Schwefelsäure, die unter reinstem Stickstoff gehalten wurde, vor einer licht-elektrischen Zelle ergab nur eine geringfügige Zunahme der Transparenz im Gebiet zwischen 436 und 480 μ (Maximum der langwelligen Bande des roten Salzes 450 μ). Auch unter aeroben Bedingungen erlitt die Lösung dieses,

¹⁴⁾ B. 66, 576 [1933].

Ergebnis der spektrophotographischen Messungen:

Verbindung	Lösungsmittel	Oxydations- Stufe		Banden-Schwerpunkte $m\mu$	Bemerkungen
Alloxazin..... subl. Präparat umgefällt. Präp.	konz. H_2SO_4	Holo-chinon	0	335 ↓ 385 370	450 kurz nach dem Auflösen nach 2 Stdn.
	50-proz. H_2SO_4	Holo-chinon Semi-chinon Leuko-Form	0 0 0	325	460 red. mit $CrCl_2$
	$pH = 8.0$ (Bicarbonat) 2-n. NaOH	Holo-chinon Holo-chinon	257 263	340 ↔ 380 335	420 nach Kuhn, l. c. ¹⁰⁾
	konz. H_2SO_4	Holo-chinon	267		420 kurz nach d. Auflösen nach 3 Stdn.
Äthylierungsprodukt des Tolu-alloxazins	50-proz. H_2SO_4	Holo-chinon Semi-chinon Leuko-Form	0 0 0	338	475 red. mit $CrCl_2$
	0.01-n. NaOH 0.2-n. NaOH	Holo-chinon Holo-chinon	266 266	340 ↔ 400 340	430
	0.2-n. HCl etwa 2-n. HCl verd. NaOH	Holo-chinon Semi-chinon Leuko-Form	267 0 255	358	490 red. mit Na-Hg nach Warburg, l. c. ¹⁶⁾
	$pH = 7$ 0.2-n. NaOH	Holo-chinon Holo-chinon	0 263	364 352	440 442
Oxy-chinoxalin-carbon- säure-ureid	50-proz. H_2SO_4	Holo-chinon Semi-chinon Leuko-Form	0 0 0	355 360	470 470 red. mit $CrCl_2$
	20-proz. H_2SO_4	Holo-chinon Semi-chinon Leuko-Form	----- ----- -----	315	390
	$pH = 6.0$ (5-proz. Essig- säure)	Holo-chinon	-----	360	470 red. mit $CrCl_2$
		Holo-chinon	-----	315	390

Zeichen-Erklärung: o nicht gemessen; ----- nicht vorhanden; ↔ Maxima nicht deutlich getrennt.

nicht sublimierten, Präparates keine meßbare Veränderung im Laufe von 4 Std. Dem soll weiter nachgegangen werden.

Zum Studium der bei der Reduktion eintretenden spektralen Veränderungen wurden die gelben Lösungen der aufgeführten Verbindungen in verd. Mineralsäuren benutzt. Als Reduktionsmittel diente beim Photoflavin Natrium-amalgam, bei den anderen Körpern Chromchlorür. Im letzteren Falle gelangt wegen der scharfen Endabsorption des Reduktionsmittels nur das Spektralgebiet oberhalb 280 $m\mu$ zur Messung. Der subjektive Farbwechsel bei fortschreitender Reduktion ist von gelb über rot nach farblos. Die rote Farbe kommt der intermediären, potentiometrisch als Semi-chinon gekennzeichneten Zwischenstufe zu¹⁵⁾. Aus der Zusammenstellung geht hervor, daß diese Zwischenstufen an Stelle der im langwelligen Ultraviolett gelegenen Bande des Holo-chinons zwei Maxima zeigen, von denen das eine im Gebiet zwischen 325 und 360 $m\mu$ und das zweite im Sichtbaren zwischen 460 und 490 $m\mu$ gefunden wird. Somit steht die Änderung der Lichtabsorption in der Alloxazin-Reihe (mit Einschluß der Flavine) beim Übergang der holo-chinoiden in die semi-chinoide Stufe in Übereinstimmung mit dem eingangs kurz gekennzeichneten Verhalten der entsprechenden Oxydations-Stufen anderer Verbindungs-Klassen. Das Semi-chinon besitzt ein komplexeres Spektrum als das Holo-chinon, es ist tiefer gefärbt und zeigt eine zusätzliche, langwellige Absorptionsbande.

Es ist bemerkenswert, daß das rote Farbsalz des Alloxazins in konz. Schwefelsäure sogleich nach dem Auflösen ein Spektrum gibt, das von demjenigen des semi-chinoiden Farbsalzes nur wenig verschieden ist. Die gelbe Ureido-säure zeigt die gleiche Erscheinung, nur mit dem Unterschied, daß das holo-chinoide rote Farbsalz noch in 50-proz. Schwefelsäure existiert, wo bei den Körpern mit geschlossenem Pyrimidinring bereits die Umlagerung in das gelbe, einbandige, holo-chinoide Salz eingetreten ist. Hier tritt also bei Reduktion in 50-proz. Schwefelsäure zunächst weder eine subjektive, noch eine merkliche objektive Änderung in der Lichtabsorption ein. Dies ist vielmehr erst in 20-proz. Schwefelsäure der Fall, in der beide Banden der holo-chinoiden Form im langwelligen Ultraviolett liegen.

Wird die Reduktion weiter bis zur Dihydro-Form getrieben, so verschwinden die langwelligen Banden. Im Falle des Alloxazins und des Äthylierungsproduktes des Tolu-alloxazins bleibt eine niedrige Bande im langwelligen Ultraviolett erhalten. Die Leuko-Form des Photoproduktes des gelben Oxydationsfermentes (Hefe-Flavin) zeigt nach O. Warburg und W. Christian¹⁶⁾ in verd. Natronlauge eine hohe Bande bei 255 $m\mu$ (Mol. Extinkt. 6.10^4). Die Leuko-Form der gelben Ureido-säure endlich scheint überhaupt keine spezifische Absorption zu besitzen.

Aus Gründen der Raum-Ersparnis beschränken wir uns auf die Wiedergabe der besprochenen Erscheinungen in graphischer Darstellung am Beispiel des von uns synthetisierten Äthylierungsproduktes des Tolu-alloxazins.

¹⁵⁾ In konzentrierter Salzsäure sowie Bromwasserstoffsäure sind die Semi-chinone tiefrot gefärbt und von auffallender Beständigkeit.

¹⁶⁾ Biochem. Ztschr. **266**, 377 [1933].

Im Diagramm entspricht die Ordinate dem dekadischen, molaren Extinktionskoeffizienten, der nach der Formel $E = \frac{I}{c} \times \frac{I}{d} \log \frac{I_0}{I}$ in üblicher Weise definiert ist. In der tabellarischen Übersicht begnügen wir uns mit der Angabe der Banden-Schwerpunkte, da nicht für alle untersuchten Verbindungen streng vergleichbare quantitative Ergebnisse vorliegen. Größenordnungsmäßige Differenzen haben wir nicht angetroffen.

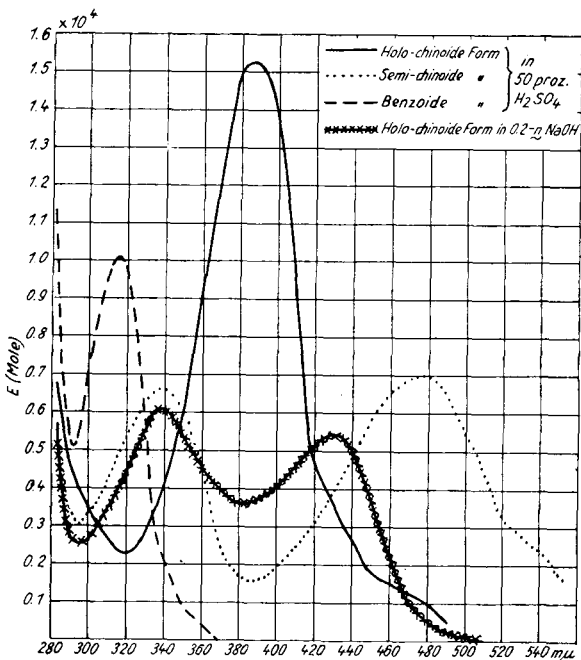
Zur Methodik: Die spektrographischen Messungen wurden ausgeführt mit einem mittleren Quarz-Spektrographen von Adam Hilger, London. Starr mit demselben verbunden ist das Spekter-Quarz-Photometer, das eine Änderung der einfallenden Licht-Intensität durch Änderung der Apertur der einen Einfalls-Linse gestattet. Als Lichtquelle diente der kondensierte Funke zwischen Wolfram-Stahl-Elektroden. Bei den Messungen, die die Änderungen des Spektrums bei variiertem H-Ionen-Konzentration betrafen, befand sich die untersuchte Lösung in einer Rohr-Cuvette, die durch Quarzplatten verschlossen wurde, die mechanisch angepreßt wurden.

Für die Messungen bei fortschreitender Reduktion bedienten wir uns der von Warburg¹⁷⁾ angegebenen Absorptions-Tröge mit aufgeschmolzenen Fenstern und Capillarstopfen-Verschuß. Die Auswertung der Platten erfolgte mittels der Vergleichs-Punkt-Methode.

Zur Stabilitäts-Prüfung des roten Farbsalzes des Alloxazins in konz. Schwefelsäure wurde in den Strahlengang einer Niedervolt-Lampe (6 V, 3 Amp.), die eine Selen-Sperrschichtzelle (Photron-Zelle der Weston-Gesellschaft) beleuchtete, außer einem 1 mm Blauglas-Filter (BG 5 von Schott & Gen.) das die Lösung enthaltende Versuchsgefäß aus Pyrexglas gebracht. Es wurde mit Stickstoff durchströmt, der mittels eines mit Kupfer beschickten, elektrisch beheizten Quarzrohres von Sauerstoff-Spuren befreit worden war.

Das eine benutzte Alloxazin-Präparat¹⁸⁾ war durch Sublimation im Hochvakuum gereinigt. Ein anderes war durch Umfällen gereinigt.

Das Photo-flavin war ein nach der von O. Warburg und W. Christian¹⁶⁾ für den Hefe-Farbstoff gegebenen Vorschrift aus vorgereinigten Hepato-flavin-Lösungen¹⁹⁾ gewonnenes Präparat. Es schmolz nach mehrmaligem Umkrystallisieren aus 2-n. Essigsäure bei 340° (unkorr.) unt. Zers.



Absorptionsspektren des Äthylierungsproduktes von Tolu-alloxazin unter verschiedenen Bedingungen.

¹⁷⁾ Biochem. Ztschr. **254**, 447 [1933].

¹⁸⁾ Darstellung nach O. Kühling, B. **24**, 2363 [1891].

¹⁹⁾ K. G. Stern, Nature **132**, 784 [1933]; Biochem. Journ. **28**, 949 [1934].

Die Darstellung des Äthylierungsproduktes des Tolu-alloxazins wird an anderer Stelle eingehend beschrieben werden. Das benutzte Präparat war 2-mal aus verd. Essigsäure umkrystallisiert worden. Es schmolz nach vorangehender Dunkel-färbung bei 325^o unt. Zers.

Das Oxy-chinoxalin-carbonsäure-ureid war nach der Vorschrift von O. Hinsberg¹⁸⁾ dargestellt und durch Umkrystallisieren aus Eisessig gereinigt worden. Es schmolz bei 260—261^o.

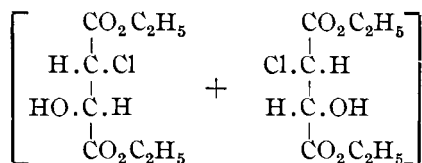
Anmerkungen bei der Korrektur: Das zu den vorstehenden Versuchen u. a. benutzte Äthylierungsprodukt des Tolu-alloxazins ist nach Beobachtungen, die wir an einem später dargestellten und durch Krystallisation fraktionierten Präparat gemacht haben, nicht ganz einheitlich. Außer dem überwiegend darin enthaltenen 7-Methyl-9-äthyl-alloxazin scheint noch eine C-ärmere Verbindung zugegen zu sein.

266. V. Anna Rao und P. C. Guha: Untersuchungen über die Waldensche Umkehrung, III. Mitteil.: Umwandlung von *meso*-Weinsäure in eine optisch aktive Form unter asymmetrischen Bedingungen.

[Aus d. Indian Institute of Science, Dept. of Organic Chemistry, Bangalore, Indien.]

(Eingegangen am 19. Juni 1934.)

Im allgemeinen nimmt man an, daß organische Verbindungen, die asymmetrische Zentren in ihrem Molekül enthalten, aber durch innere Kompensation inaktiv wirken, nicht in die aktiven Enantiomeren umgewandelt werden können. In der chemischen Literatur ist auch kein Versuch, eine solche Umwandlung zu bewirken, erwähnt. Wir hielten es für möglich, eine optisch aktive Verbindung zu gewinnen, falls es gelänge, in einer innerkompensierten Verbindung auf irgend eine Weise die Anordnung der mit einem asymmetrischen Kohlenstoffatom verknüpften Atome oder Gruppen zu verändern. Aber jede dieser unter normalen Versuchs-Bedingungen bewirkten Veränderungen, durch die die innere Kompensation gestört werden kann, läuft darauf hinaus, daß beide, die *d*- und *l*-Form gebildet werden und somit ein *racem*. Produkt entsteht. In Übereinstimmung damit fanden wir, daß *meso*-Weinsäure-äthylester durch Einwirkung von Phosphorpentachlorid¹⁾ *d*, *l*-β-Chlor-äpfelsäure-äthylester ergibt:



Um diese Schwierigkeit zu überwinden, nahmen wir uns vor, die Waldensche Umkehrung bei der *meso*-Weinsäure unter asymmetrischen Bedingungen zu untersuchen. Wenn anstatt des Äthylesters optisch aktive Ester-Gruppen eingeführt würden, konnten wir hoffen, daß sich unter dem Einfluß dieser optisch aktiven Ester-Gruppen ein Überschuß

¹⁾ Anna Rao u. Guha, B. 67, 741 [1934].