

Photochemie des (Iso)Alloxazins, IV^{1,2)}

Dealkylierung und Decarboxylierung kurzkettiger Isoalloxazin-10-alkancarbonsäuren

Wolfgang-R. Knappe

Fachbereich Biologie der Universität Konstanz,
D-7750 Konstanz, Postfach 7733

Eingegangen am 16. Januar 1975

Während 7,8-Dimethylisoalloxazin-10-essigsäure (**3a**) in einer *intermolekularen* Triplett-Photo-reaktion zu 7,8-Dimethylalloxazin („Lumichrom“), Kohlendioxid und Formaldehyd reagiert, entsteht bei der thermischen Zersetzung 7,8,10-Trimethylisoalloxazin („Lumiflavin“). Hingegen reagieren 3-Methylisoalloxazin-10-propionsäure (**2a**) und 3,β-Dimethylisoalloxazin-10-propionsäure (**2c**) im pH-Bereich 2–6 *intramolekular* unter Photodecarboxylierung und Cyclisierung der N(10)-Seitenkette nach N(1); in dieser Triplett-Reaktion, die erneut die Photoaktivität der N(1)-Position bestätigt, entsteht das 1,2,5,6-Tetrahydro-4*H*,7*H*-benz[*g*]imidazo[1,2,3-*ij*]pteridin-4,6-dion-System (**8**). Im pH-Bereich > 6 findet eine *intramolekulare*, vom Singulett- und Triplett-Zustand aus verlaufende photochemische Abspaltung des N(10)-Substituenten statt, wobei 3-Methylalloxazin und Acryl- bzw. Crotonsäure entstehen. — Das massenspektrometrische und thermische Verhalten der Isoalloxazin-10-alkancarbonsäuren wird analysiert (McLafferty-Umlagerung und γ -Wasserstoff-Abstraktion) und mit der Photoreaktivität verglichen.

Photochemistry of (Iso)Alloxazines, IV^{1,2)}

Dealkylation and Decarboxylation of Short-chained Isoalloxazine-10-alkanoic Acids

While 7,8-dimethylisoalloxazine-10-acetic acid (**3a**) yields 7,8-dimethylalloxazine (“lumichrome”), carbon dioxide, and formaldehyde in an *intermolecular* triplet photoreaction, 7,8,10-trimethylisoalloxazine (“lumiflavine”) and carbon dioxide are the products of the thermal decomposition. On the other hand, 3-methylisoalloxazine-10-propanoic (**2a**) and 3,β-dimethylisoalloxazine-10-propanoic acid (**2c**) undergo an *intramolecular* photodecarboxylation and cyclisation of the N(10)-side-chain to N(1) in the pH-range of 2–6 to yield the 1,2,5,6-tetrahydro-4*H*,7*H*-benz[*g*]imidazo[1,2,3-*ij*]pteridine-4,6-dione system (**8**) in a triplet reaction, which again confirms the photoactivity of the N(1)-position. In the pH-range > 6 the N(10)-substituent is split off *via* the singlet and triplet state in an *intramolecular* reaction yielding 3-methylalloxazine and acrylic or crotonic acid, resp. — The mass-spectroscopic and thermal behaviour of these isoalloxazine-10-alkanoic acids is analyzed (McLafferty rearrangement and γ -hydrogen abstraction) and is compared to the photochemical reactivity.

¹⁾ Teilweise vorgetragen auf der 2. Vortragstagung der Fachgruppe „Photochemie“ der Gesellschaft Deutscher Chemiker in Konstanz am 22. 11. 1974.

²⁾ III. Mittel.: M. Gladys und W.-R. Knappe, Chem. Ber. 107, 3658 (1974).

Isoalloxazin-Derivate reagieren beim Bestrahlen in Gegenwart von Vinyl- oder Aryl-essigsäuren unter Decarboxylierung der Carbonsäure und reduktiver Alkylierung des Isoalloxazins zu 4a- bzw. 5-Alkyldihydroisoalloxazinen³⁻⁵); als Zwischenstufe wird im alkalischen Bereich zumindest in einem Fall das 8-Alkyl-1,8-dihydroisoalloxazin durchlaufen⁶). Über die gleichen Positionen verläuft auch die enzymatische Aktivität von Flavinenzymen (s. Diskussion im Schlußteil). Nachdem in den vorangegangenen Arbeiten^{2,7}) die photochemische Aktivität der N(1)-Position des Isoalloxazingerüsts sowohl für Singulett- als auch für Triplett-Reaktionen nachgewiesen wurde, soll in dieser Arbeit das photochemische Verhalten der Isoalloxazin-10-alkancarbonsäuren untersucht werden, für die bei kurzer Kettenlänge durch sterische Begünstigung der N(1)-Position gegenüber den C(4a)-, N(5)- und C(8)-Positionen eine Entstehung von N(1),N(10)-überbrückten 1,5-Dihydroisoalloxazin-Derivaten zu erwarten ist. Eine ähnliche intramolekulare Photodecarboxylierung und Cyclisierung haben *Noyori* und Mitarbb.⁸) in der Acridinreihe beobachtet: 5-(9-Acridyl)valeriansäure und 6-(9-Acridyl)capronsäure ergeben in dieser Photoalkylierungsreaktion in etwa 10proz. Ausbeute 9,9-Tetramethylen- bzw. 9,9-Pentamethylenacridan. Als Konkurrenz-Photoreaktion für die Cyclisierung könnte ferner eine Abspaltung des N(10)-Substituenten auftreten, wie sie in der Reihe der 10-Alkylisoalloxazine beobachtet wurde²).

Über das photochemische Verhalten der Isoalloxazin-10-alkancarbonsäuren haben bisher nur *Kuhn* und *Rudy*⁹) kurz berichtet. Diese Autoren beobachteten den Photoabbau der 7,8-Dimethylisoalloxazin-10-essigsäure („Flavin-10-essigsäure“¹⁰), der hauptsächlich zu 7,8-Dimethylalloxazin („Lumichrom“) neben etwas 7,8,10-Trimethylisoalloxazin („Lumiflavin“) führte, ohne jedoch den Mechanismus dieser Reaktion zu untersuchen. 1936 identifizierten *Karrer* und Mitarbb.¹¹) das Photooxidationsprodukt des 10-(3-Hydroxypropyl)isoalloxazins als Isoalloxazin-10-propionsäure; die photochemische Reaktivität dieser Verbindung untersuchten sie jedoch nicht. Neben diesen beiden Arbeitsgruppen haben sich lediglich *McCormick* und Mitarbb.¹²) mit der Darstellung dieser Verbindungen als Zwischenstufen für die Synthese von Flavinpeptiden beschäftigt.

Synthese der Ausgangsverbindungen

Bereits *McCormick* und Mitarbb.¹²) hatten 7,8-Dimethylisoalloxazin-10-alkancarbonsäuren durch Oxidation der entsprechenden Alkohole mit Salpetersäure dargestellt. Die für die vorliegende Untersuchung benötigten Isoalloxazin-10-alkancarbonsäuren **2a–d** wurden jedoch auf folgendem Wege synthetisiert: Durch Umsetzung von 1-Fluor-2-nitrobenzol mit den entsprechenden Aminosäuren in sodaalkalischer Lösung nach *Lantz* und *Obellianne*¹³) wurden die *N*-Carboxyalkyl-2-nitroaniline **1a–d** dargestellt.

³) *P. Hemmerich, V. Massey und G. Weber*, *Nature (London)* **213**, 728 (1967).

⁴) *W. H. Walker, P. Hemmerich und V. Massey*, *Helv. Chim. Acta* **50**, 2269 (1967).

⁵) *W. H. Walker, P. Hemmerich und V. Massey*, *Eur. J. Biochem.* **13**, 258 (1970).

⁶) *M. Brüstlein, W.-R. Knappe und P. Hemmerich*, *Angew. Chem.* **83**, 854 (1971); *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **10**, 804 (1971).

⁷) *W.-R. Knappe*, *Chem. Ber.* **107**, 1614 (1974).

⁸) *R. Noyori, M. Kato, M. Kawanisi und H. Nozaki*, *Tetrahedron* **25**, 1125 (1969).

⁹) *R. Kuhn und H. Rudy*, *Ber. Deut. Chem. Ges.* **68**, 300 (1935).

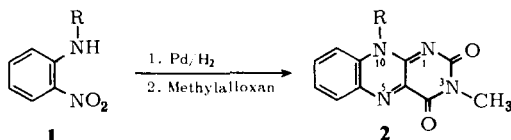
¹⁰) In der Literatur werden 7,8-Dimethylisoalloxazin-Derivate häufig als „Flavine“ bezeichnet.

¹¹) *P. Karrer, T. Köbner und F. Zehender*, *Helv. Chim. Acta* **19**, 261 (1936).

¹²) *W. Förty, R. E. MacKenzie und D. B. McCormick*, *J. Heterocycl. Chem.* **5**, 625 (1968).

¹³) *R. Lantz und P. Obellianne*, *Bull. Soc. Chim. France* **1956**, 311.

Die durch katalytische Reduktion von **1a–d** zugänglichen Phenylendiamin-Derivate wurden in situ mit 3-Methylalloxan analog zu *Kuhn* und *Weygand*¹⁴⁾ kondensiert. Die durch die *N*(3)-Methylgruppe erhöhte Löslichkeit der entstandenen Isoalloxazine ermöglichte auch die photochemische Untersuchung in organischen Lösungsmitteln.



	R		R		R
1, 2 a	CH ₂ CH ₂ CO ₂ H	1, 2 e	CH ₂ CH ₂ OH	2 i	CH(CH ₃)CH ₂ CO ₂ CH ₃
b	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CO ₂ H	f	CH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	j	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃
c	$\overset{\beta}{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)\overset{\alpha}{\text{C}}\text{H}_2\text{CO}_2\text{H}$	g	CH(CH ₃)CH ₂ OH		
d	$\overset{\gamma}{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)\overset{\beta}{\text{C}}\text{H}_2\overset{\alpha}{\text{C}}\text{H}_2\text{CO}_2\text{H}$	h	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ OH		

Die 7,8-Dimethylisoalloxazin-10-essigsäure (**3a**) wurde nach *McCormick* und Mitarbb.¹²⁾ durch Permanganat-Oxidation des 7,8-Dimethylisoalloxazin-10-acetaldehyds dargestellt, letzterer wurde durch Perjodatabbau des Riboflavins erhalten¹⁵⁾. Die Veresterung der Isoalloxazin-10-alkancarbonsäuren **2c** und **3a** zu **2i** bzw. **3b** erfolgte nach *Kuhn* und *Rudy*⁹⁾.

Photochemie der 7,8-Dimethylisoalloxazin-10-essigsäure (**3a**)

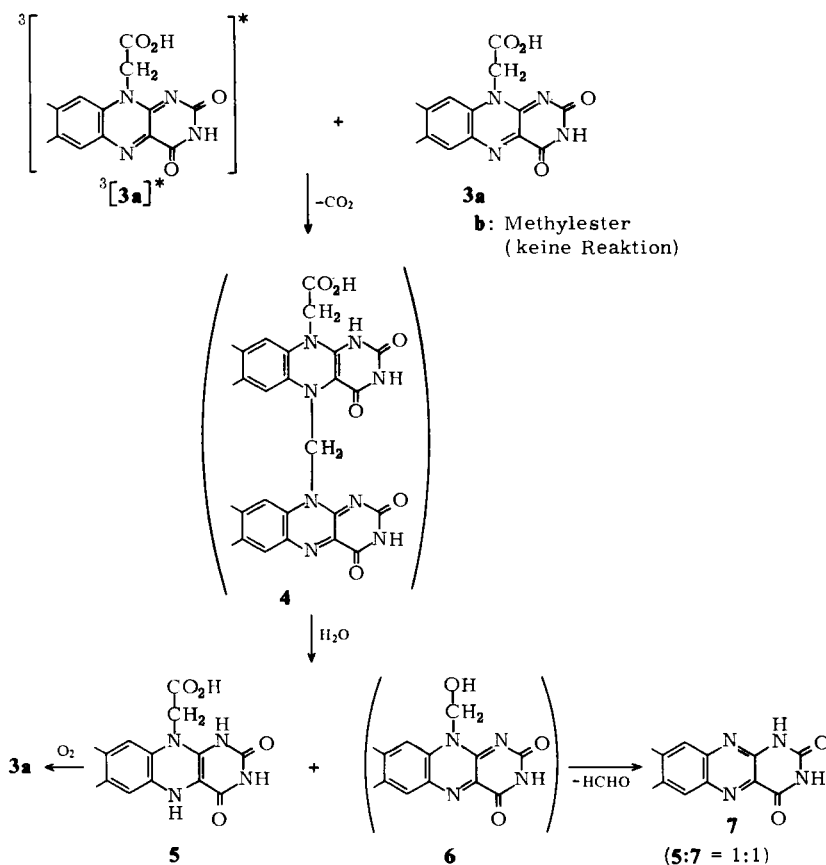
Die bereits von *Kuhn* und *Rudy*⁹⁾ 1935 beobachtete Photoreaktion von **3a** führt unter aeroben Bedingungen bei pH 5 mit einer Quantenausbeute von 0.14 zu 7,8-Dimethylalloxazin („Lumichrom“). Unter anaeroben Bedingungen hingegen führt diese Photoreaktion mit einer Quantenausbeute von 0.80 konzentrationsunabhängig zu einem 1 : 1-Gemisch von 7,8-Dimethylalloxazin (**7**) und 7,8-Dimethyl-1,5-dihydroisoalloxazin-10-essigsäure (**5**); dies deutet auf eine intermolekulare Photoreaktion hin. Entgegen den Angaben von *Kuhn* und *Rudy*⁹⁾ konnte bei allen mit **3a** durchgeführten Photoreaktionen in keinem Fall 7,8,10-Trimethylisoalloxazin („Lumiflavin“) beobachtet werden. Als weiteres Produkt der Seitenkette konnte neben Kohlendioxid durch den quantitativen Mikronachweis mit Chromotropsäure (1,8-Dihydroxynaphthalin-3,6-disulfonsäure)¹⁶⁾ eine der zersetzten Menge von **3a** etwa äquimolare Menge an Formaldehyd nachgewiesen werden. Auf Grund dieser Befunde wird in Analogie zur reduktiven Photoalkylierung von Flavin in Gegenwart von Arylessigsäuren^{3–5)} folgender intermolekularer Mechanismus (siehe S. 2425) vorgeschlagen, der auch durch den Befund gestützt wird, daß der Methylester **3b** photochemisch nicht reagiert.

Die Jodidhalblöschungskonzentrationen betragen für die aerob durchgeführte Photoreaktion etwa 1×10^{-4} M, für den anaeroben Fall 1.5×10^{-5} M. Die Fluoreszenz von **3a** wird in Wasser bei pH 5 von 2.8×10^{-2} M Jodid zur Hälfte gelöscht; das Fluoreszenzmaximum liegt bei 523 nm, und die Quantenausbeute der Fluoreszenz beträgt 0.24. In der

¹⁴⁾ R. *Kuhn* und F. *Weygand*, Ber. Deut. Chem. Ges. **68**, 1282 (1935).

¹⁵⁾ H. H. *Fall* und H. G. *Petering*, J. Amer. Chem. Soc. **78**, 377 (1956).

¹⁶⁾ C. E. *Bricker* und W. A. *Vail*, Anal. Chem. **22**, 720 (1950).



Literatur werden für typische Triplet-Reaktionen des Flavin-Systems $4 \times 10^{-6} \text{ M}^{17)}$, für typische Singulett-Reaktionen $2.6 \times 10^{-2} \text{ M}^{2)}$ als Jodidhalblöschungskonzentrationen berichtet. Demzufolge verläuft der Photoabbau von **3a** unter anaeroben Bedingungen über den ersten angeregten Triplet-Zustand; die bei Sauerstoff-Ausschluß gefundene etwas höhere Jodidhalblöschungskonzentration kann ebenfalls durch die Ausbildung hydrophober Komplexe erklärt werden, zu der Flavine ganz allgemein neigen¹⁸⁾. Im aeroben Fall konkurrieren Sauerstoff- und Jodid-Löschung mit der intermolekularen Photoreaktion; auch hier kann eine Singulett-Beteiligung nicht nachgewiesen werden.

Die Quantenausbeute ist über den experimentell zur Verfügung stehenden Konzentrationsbereich von $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ (Sättigungskonzentration von **3a** in Wasser) bis $1.5 \times 10^{-6} \text{ M}$ konstant, wegen der langen Lebensdauer des Triplet-Zustandes von etwa $55 \mu\text{s}$ bei Raumtemperatur in Wasser¹⁹⁾ ist jedoch eine intermolekulare Photoreaktion mit der gefundenen hohen Wirksamkeit möglich.

¹⁷⁾ B. Holmström und G. Oster, J. Amer. Chem. Soc. **83**, 1867 (1961).

¹⁸⁾ M. Brüstlein, Dissertation, Univ. Konstanz 1971.

¹⁹⁾ S. Schreiner, Dissertation, Univ. Stuttgart 1974.

Der Photoabbau von **3a** ist nur wenig pH-abhängig, das Maximum der Quantenausbeute liegt bei pH 5–6, was sowohl mit dem von *Schreiner*¹⁹⁾ gemessenen Triplett-pK des Lumiflavin von 4.45 als auch mit dem von *Haas* und *Hemmerich*^{20, 21)} für die Photoreaktion von Lumiflavin mit Phenylelessigsäure bestimmten „Photo-pK“ von 5.5 übereinstimmt.

Die schnelle Hydrolyse eines Aminals vom Typ **4** ist in der Reihe des Isoalloxazins schon häufig beobachtet worden: Beispielsweise ist es trotz vieler Bemühungen bisher nicht gelungen, das vermutete Intermediärprodukt der Photoreaktion von Flavin mit α -Aminosäuren zu isolieren^{20–22)}. Die einzige spektroskopische Charakterisierung eines solchen Zwischenproduktes gelang *Elliot* und *Bruice*²³⁾, die das elektronenarme 8-Cyan-3,10-dimethylisoalloxazin photochemisch mit Äthylendiamintetraessigsäure umsetzten.

Als Produkt der α -CH₂-Gruppe von Glycin, Sarkosin und *N,N*-Dimethylglycin nach der Photoreaktion mit Flavin wurde Formaldehyd quantitativ nachgewiesen²²⁾, wobei in Analogie zum Aminoal **4** besonders das aus *N,N*-Dimethylglycin und Flavin unter Photodecarboxylierung und reduktiver Alkylierung entstehende Aminoal mit einer N(5)–CH₂–N(CH₃)₂-Gruppe von Bedeutung ist. Auch die Untersuchung der Photoreaktion von **3a** in aprotischen Lösungsmitteln wie Acetonitril, in denen die Hydrolyse des intermediär gebildeten Aminoals **4** langsamer bzw. gar nicht erfolgen sollte, brachte keinen weiteren Aufschluß: Auch hier wurde das gesuchte Mischspektrum des Aminoals **4** bestehend aus dem Flavin-Chromophor mit π, π^* -Übergängen bei 445 und 370 nm und dem 5-Alkyl-1,5-dihydroflavin-Chromophor mit einem π, π^* -Übergang bei etwa 340 nm^{4, 5)} nicht beobachtet, sondern stets das Mischspektrum von **5** und **7**, das bei Sauerstoff-Zutritt in das Mischspektrum von **3a** und **7** überging. Bei aerober Durchführung des Photoabbaus entstand als Endprodukt nur **7**, da das pro Cyclus zu 50% wieder zurückgebildete **3a** erneut photochemisch umgesetzt wird.

Mit der hohen Quantenausbeute von 0.80 ist **3a** das lichtempfindlichste bisher bekannte Flavin-Derivat; **3a** ist über 2 Größenordnungen lichtempfindlicher als Riboflavin, für dessen Photoabbau eine Quantenausbeute von 0.006 gemessen wurde¹⁷⁾.

Photochemie der 3-Methylisoalloxazin-10-propionsäure (**2a**) und 3, β -Dimethylisoalloxazin-10-propionsäure (**2c**)

Wird eine wäßrige Lösung von **2c** bei pH 3.5 bestrahlt, so ergibt sich der in Abb. 1 wiedergegebene spektroskopische Verlauf.

Mit einer maximalen Quantenausbeute von 0.092 bei pH 4 entsteht eine neue Verbindung (**8b**), deren UV-Spektrum ein Maximum bei 320 nm sowie eine ausgeprägte Schulter bei 375 nm aufweist. Dieses UV-Spektrum ist gegenüber dem des 3,10-Dimethyl-1,5-dihydroisoalloxazins, das in Abb. 1 punktiert wiedergegeben ist, um etwa 35 nm bathochrom – bei gleichen Extinktionskoeffizienten – verschoben. Bei der Zugabe von Sauerstoff wird **8b** analog dem 1,5-Dihydroisoalloxazin praktisch momentan oxidiert, und es entsteht das Kation **9b**, dessen UV-Spektrum (Schultern bei 401 und 430, Maximum bei 366 nm)

²⁰⁾ *W. Haas*, Dissertation, Univ. Konstanz 1973.

²¹⁾ *W. Haas* und *P. Hemmerich*, *Z. Naturforsch.* **27B**, 1035 (1972).

²²⁾ *W. R. Frisell*, *C. W. Chung* und *C. G. Mackenzie*, *J. Biol. Chem.* **234**, 1297 (1959).

²³⁾ *D. L. Elliot* und *T. C. Bruice*, *J. Amer. Chem. Soc.* **95**, 7901 (1973).

ebenfalls in Abb. 1 dargestellt ist. Ein Vergleich mit den von Müller und Massey²⁵⁾ angegebenen spektroskopischen Daten für das „7,8-Dimethyl-1,10-äthanoisoalloxazinium-perchlorat“ [pH 7: λ_{\max} 428 nm ($\log \epsilon$ 4.09), 378 (4.23), λ_{\min} 290 nm (3.40)] deutet auf die strukturelle Ähnlichkeit von **8b** mit dieser Verbindung hin. Wird die Photoreaktion von **2c** in einem Gemisch von Essigsäure und Acetanhydrid durchgeführt und wird die Reaktions-

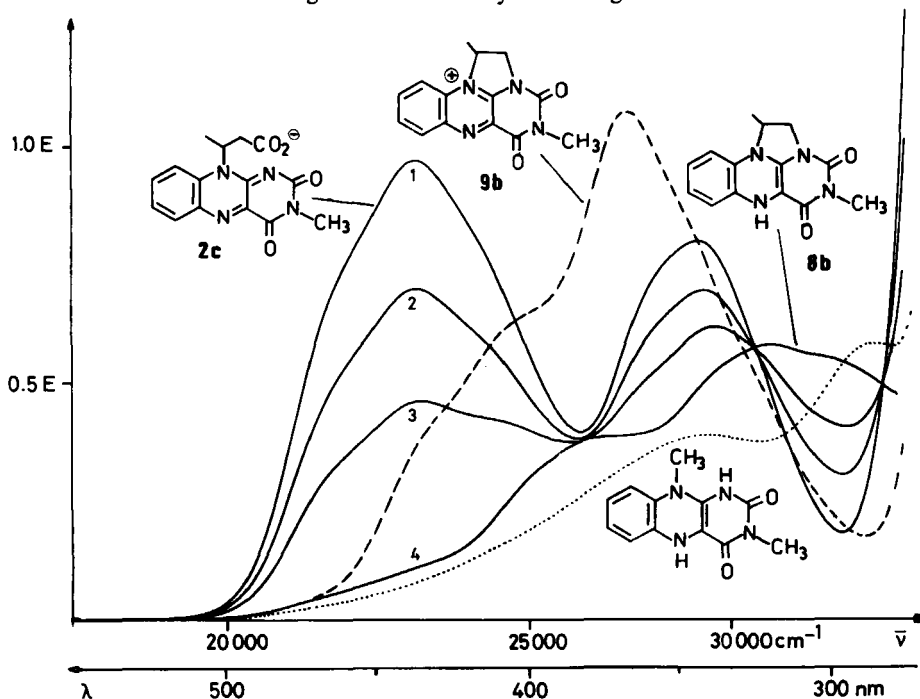


Abb. 1. Intramolekulare Photodecarboxylierung von **2c** (0.95×10^{-4} M in Puffer pH 3.5 unter Sauerstoff-Ausschluß in 1-cm-Thunberg-Küvette). Bestrahlungsintensität: 2.7×10^{16} Quanten der Wellenlängen 420–450 nm. Belichtungsdauer: 1) 0 s, 2) 15 s, 3) 45 s, 4) 240 s. Gestrichelte Kurve: Oxidation von **8b** mit Sauerstoff zu **9b**. Punktierter Kurve: 3,10-Dimethyl-1,5-dihydroisoalloxazin (0.95×10^{-4} M, aus 3,10-Dimethylisoalloxazin durch Bestrahlen in Gegenwart von Äthylendiamintetraessigsäure in situ dargestellt²⁴⁾, Wasser, pH 5)

mischung nach dem Belichten weitere 30 min unter Sauerstoff-Ausschluß stengelassen, so entsteht eine gegen Sauerstoff stabile Verbindung mit einem Absorptionsmaximum bei 296 nm; dies weist auf eine acylierbare N(5)–H-Gruppe hin, vgl. l. c.²⁵⁾

Dem bei der Photoreaktion von **2c** entstehenden Produkt kommt daher die Struktur des 1,5-Dimethyl-1,2,5,6-tetrahydro-4H,7H-benz[*g*]imidazo[1,2,3-*ij*]pteridin-4,6-dion²⁶⁾ (**8b**) zu. Dies wird zweifelsfrei durch dünnschichtchromatographischen und UV-spektroskopischen Vergleich von **8b** mit authentischem, auf anderem Wege gewonnenem Material (s. u.) bestätigt.

²⁴⁾ K. Enns und W. H. Burgess, J. Amer. Chem. Soc. **87**, 5766 (1965), und dort zit. Lit.

²⁵⁾ F. Müller und V. Massey, J. Biol. Chem. **244**, 4007 (1969).

²⁶⁾ Herrn Dr. B. Langhammer vom Beilstein-Institut für Literatur der Organischen Chemie danke ich für die Nomenklaturvorschläge.

Die pH-Abhängigkeit der Quantenausbeute der Photoreaktion von **2c** zeigt den in Abb. 2 wiedergegebenen Verlauf.

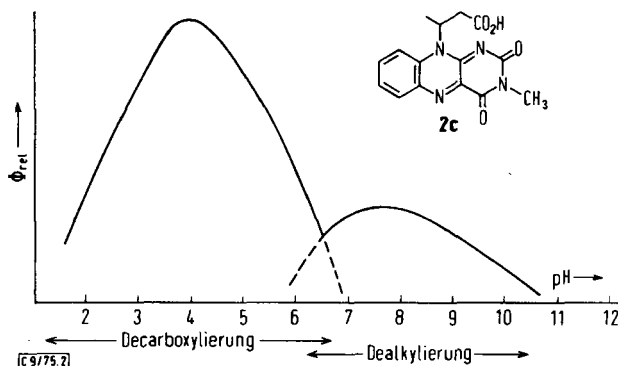


Abb. 2. pH-Abhängigkeit der relativen Quantenausbeuten der Photoreaktion von **2c** in Wasser, 3×10^{-5} M, 0.1 M NaClO_4 , unter Sauerstoffausschluß. pH 2–7: Decarboxylierung und Cyclisierung zu **8b**, pH 6–11: Dealkylierung zu 3-Methylalloxazin (**12**)

Während das Maximum der Quantenausbeute der intramolekularen, unter Decarboxylierung verlaufenden, reduktiven Photocyclisierung bei pH 4 liegt und zum sauren Bereich hin wegen der ab pH < 2 merklich auftretenden Löschung des ersten angeregten Singulett-Zustandes durch Protonen abfällt, tritt ab pH > 6 eine neue Reaktion auf, die ab pH > 7 allein beobachtet wird: Diese Reaktion besteht in der Abspaltung des *N*(10)-Substituenten als Crotonsäure; ihr spektroskopischer Verlauf führt vom Startspektrum von **2c** mit Maxima bei 438 und 344 nm mit einer Quantenausbeute von 0.026 bei pH 8.4 zum Endspektrum des 3-Methylalloxazins (**12**) (λ_{max} 379 und 335 nm) bzw. dessen Anions ($\text{p}K_{\text{a}} = 8.5$; λ_{max} 424 und 332 nm), das gegen Sauerstoff stabil ist.

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, wurde diese intramolekulare Photodealkylierung bereits in der Reihe der 10-Alkylisoalloxazine gefunden²⁾.

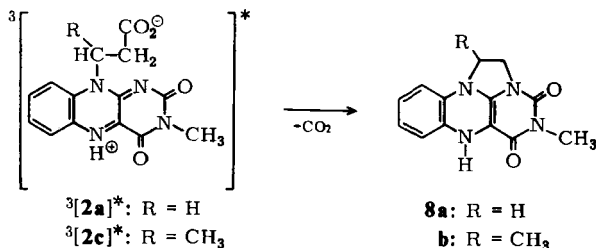
Die 3-Methylisoalloxazin-10-propionsäure (**2a**) reagiert völlig analog zu **2c**.

Mechanismus der Photoreaktionen von **2a, c**

Die Jodidhalblöschungskonzentration für die intramolekulare Photocyclisierung von **2c** liegt bei pH 4.1 unter Sauerstoff-Ausschluß bei 4.0×10^{-6} M, in Gegenwart von Sauerstoff bei 1.1×10^{-5} M. Diese Reaktion verläuft daher eindeutig über den Triplett-Zustand; wie bereits erwähnt, werden in der Literatur für typische Triplett-Reaktionen des Isoalloxazin-Systems Halblöschungskonzentrationen von 4×10^{-6} M Jodid angegeben^{1,7)}. Der höhere Wert für die unter aeroben Bedingungen durchgeführte Reaktion kommt durch die kompetitive Löschung des Triplett-Zustandes durch den Sauerstoff zustande; eine Beteiligung des ersten angeregten Singulett-Zustandes ist nicht nachweisbar.

Da der 3,β-Dimethylisoalloxazin-10-propionsäure-methylester (**2i**) nicht reagiert, photodecarboxyliert nur das Anion; dieses Verhalten wird auch bei der intermolekularen reduktiven Photoalkylierung des Isoalloxazins in Gegenwart von Carboxylat-Anionen

wie z. B. Phenylacetat oder Pyruvat beobachtet^{18,20,21}). Die pH-Abhängigkeit zeigt ein Maximum der Quantenausbeute bei pH 4, das gut mit dem von Schreiner¹⁹) zu 4.45 bestimmten Triplett- pK_a des Lumiflavins mit N(5) als Protonierungsort übereinstimmt. Bei pH < 4 nehmen die Quantenausbeuten wegen des pK_a der Carbonsäure ab, bei pH < 2 kommt noch die Löschung des ersten angeregten Singulett-Zustandes durch Protonen²⁷) hinzu. Bei pH > 4 nimmt die Quantenausbeute ebenfalls ab, daher ist das N(5)-protonierte **2a, c** im Triplett-Zustand die reaktive Spezies, in der das elektronenarme N(1) die Seitenkette elektrophil unter Decarboxylierung und Reduktion des Isoalloxazinkerns substituiert. Der Mechanismus der Photoreaktion ist daher folgender:



Ein ähnliches Verhalten war bereits bei der Photocyclisierung des 10-Phenylisoalloxazins beobachtet worden⁷), die allerdings über den ersten angeregten Singulett-Zustand verläuft.

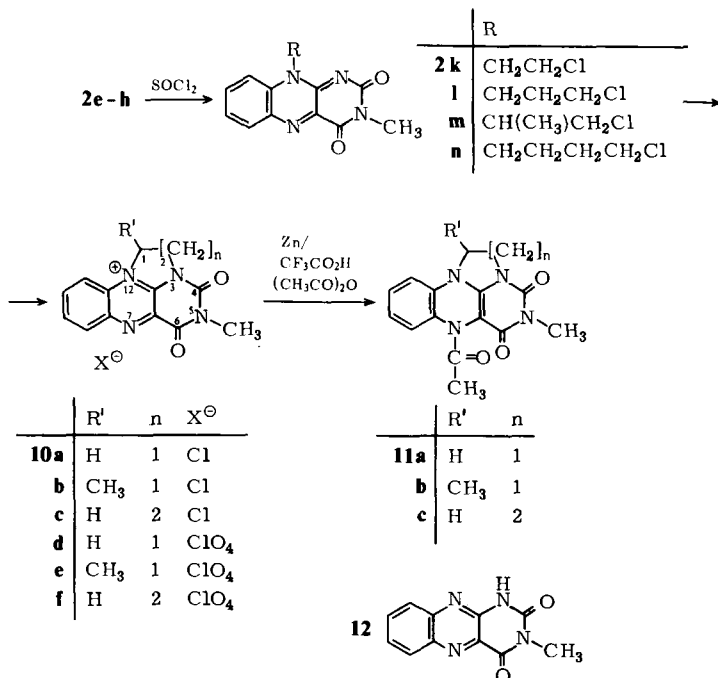
In organischen Lösungsmitteln wie Methanol, Acetonitril oder Benzol erfolgt die Photodecarboxylierung von **2a** und **c** zu **8a** und **b** nur in Gegenwart schwacher Säuren, wie z. B. bei Zusatz von 3% Essigsäure. In Abwesenheit der Säure findet die Abspaltung des N(10)-Substituenten zu 3-Methylalloxazin(12) statt. Die β -Methylgruppe in **2c** begünstigt die Photodecarboxylierung und Cyclisierung im Vergleich zu **2a**, die Quantenausbeuten bei pH 4.0 betragen 0.092 für **2c** bzw. 0.065 für **2a**, da durch sterische Wechselwirkung der β -Methylgruppe mit dem 9-H-Atom des Isoalloxazin-Kerns eine ebene Konfiguration der N(1)–C(10a)–N(10)–C(β)–C(α)-Gruppierung begünstigt wird. Das gleiche Argument gilt auch für die im alkalischen Bereich erfolgende Photodealkylierung: Bei pH 8.4 betragen die Quantenausbeuten bei **2c** bzw. **a** 0.026 und 0.019; die Quantenausbeute für **2c** ist deutlich größer, da auch hier die sterische Wechselwirkung der β -Methylgruppe mit 9-H die ebene Anordnung der Seitenkette relativ zum Isoalloxazinkern begünstigt, wie bereits für die 10-Alkylisoalloxazine allgemein gezeigt wurde²⁾.

Die Jodidhalblöschungskonzentration der Photoalkylierung von **2c** unter Sauerstoffausschluß beträgt $1.8 \times 10^{-6} M$ bei einer Quantenausbeute von 0.026 bei pH 8.4, in Gegenwart von Sauerstoff wird eine Jodidhalblöschungskonzentration von $1.8 \times 10^{-2} M$ bei einer Quantenausbeute von 0.0023, ebenfalls bei pH 8.4, gefunden. Daher verläuft diese Photoalkylierung sowohl über den ersten angeregten Singulett- als auch über den Triplett-Zustand im Verhältnis 1:10. Für die analoge Photodealkylierung des 10-*sec*-Butyl-3-methylisoalloxazins (**2j**) wurde in Acetonitril als Lösungsmittel ein Verhältnis von 1:8 beobachtet²⁾. Auch das Auftreten der (*trans*-)Crotonsäure, die dünnschichtchromatographisch als Produkt der Seitenkette von **2c** nachgewiesen werden konnte, ist analog dem Auftreten von *trans*-2-Buten im Falle von **2j**.

²⁷⁾ S. G. Schulman, J. Pharm. Sci. **60**, 628 (1971).

Unabhängige Synthese von 8a,b-Derivaten

Durch Umsetzung von 1-Fluor-2-nitrobenzol mit Aminoalkoholen wurden die bereits oben angegebenen *N*-(Hydroxyalkyl)-2-nitroaniline **1e–h** gewonnen. Durch katalytische Reduktion und Kondensation *in situ* mit Methylalloxan entstehen daraus die entsprechenden 3-Methylisoalloxazin-10-alkanole **2e–h**. Werden **2e** und **g** nach *Bhaduri* und *Hemmerich*²⁸⁾ mit Thionylchlorid erhitzt, so bilden sich in hohen Ausbeuten über die intermediär durchlaufenen 10-Chloralkyl-Derivate **2k** und **m** das 5-Methyl-4,6-dioxo-1,2,5,6-tetrahydro-4*H*-benz[*g*]imidazo[1,2,3-*ij*]pteridinium-chlorid²⁶⁾ (**10a**) bzw. das 1,5-Dimethyl-Derivat **10b**, die zur Analyse als Perchlorate **10d** und **e** gefällt wurden.



Wird 10-(3-Hydroxypropyl)-3-methylisoalloxazin (**2f**) mit Thionylchlorid umgesetzt, so entsteht ein Gemisch des 10-(3-Chlorpropyl)-3-methylisoalloxazins (**2l**) mit dem 6-Methyl-5,7-dioxo-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*,5*H*-benzo[*g*]pyrimido[1,2,3-*ij*]pteridiniumchlorid²⁶⁾ (**10c**), letzteres wurde in das Perchlorat **10f** übergeführt. Die Verbindungen **10d–f** sind in Wasser nur bei pH < 5 beständig. Im alkalischen Bereich tritt ein nucleophiler Angriff von Hydroxyl-Ionen bzw. Wasser auf die 12a- (oder für **10f**: 13a-) Position mit nachfolgender Umlagerung analog l. c.²⁹⁾ ein. Durch katalytische Reduktion oder Reduktion mit Dithionit, Titan(III)-chlorid, Zink/Salzsäure oder Photoreduktion in Gegenwart von Äthylendiamintetraessigsäure^{25, 28)} können **10d** und **e** in **8a** und **b** übergeführt werden. Als sauerstoffstabile Derivate dieses Systems wurden die 7-Acetyl-Verbindungen dargestellt: Durch Reduktion mit Zink in Trifluoressigsäure in Gegenwart von

²⁸⁾ A. P. *Bhaduri* und P. *Hemmerich*, unveröffentlichte Ergebnisse.

²⁹⁾ K. H. *Dudley* und P. *Hemmerich*, *J. Org. Chem.* **32**, 3049 (1967).

Acetanhydrid werden die Chloride **10a–c** in die Acetylderivate **11a–c** übergeführt, deren Strukturen durch die Massenspektren (Molekülpeak, nachfolgend Acetylabsplattung, danach Abspaltung von Methylisocyanat), IR-Spektren ($2C=O$ -Valenzschwingungen des Pteridindion-Systems und eine Acetylbande bei $1642–1644\text{ cm}^{-1}$) sowie die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (Signale und Kopplungen der 1- und 2-Methylenprotonen, für **11c** 1-, 2- und 3- CH_2 -Gruppen) bestätigt werden.

Die durch Photodecarboxylierung von **2a** und **c** in Essigsäure/Acetanhydrid dargestellten Acetylverbindungen erwiesen sich in allen Eigenschaften mit den Derivaten **11a** und **b** identisch. Ferner konnte im Falle der Photoreaktion von **2b** (s. u.) in Gegenwart von Acetanhydrid die intramolekulare Decarboxylierung und Cyclisierung nach N(1), die durch nachfolgende Acetylierung zu **11c** hätte führen müssen, ausgeschlossen werden.

Bei der Umsetzung längerkettiger 10-(ω -Hydroxyalkyl)isoalloxazine wie etwa **2h** mit Thionylchlorid findet auch bei höheren Temperaturen und längeren Reaktionszeiten keine intramolekulare Cyclisierung der entstandenen 10-(ω -Chloralkyl)isoalloxazine (**2i** im Falle von **2h**) statt.

Photoreaktionen der 3-Methylisoalloxazin-10-buttersäure (**2b**) und 3, γ -Dimethylisoalloxazin-10-buttersäure (**2d**)

Durch Verlängerung der Seitenkette in **2a** und **c** um eine Methylengruppe verändert sich die Photochemie dieser Verbindungen tiefgreifend: **2d** zeigt als einzige charakteristische Photoreaktion die Abspaltung des N(10)-Substituenten, wobei in nur 60proz. Ausbeute 3-Methylalloxazin (**12**) entsteht. Diese Photodealkylierung findet im Gegensatz zu der analogen Reaktion von **2c** im gesamten pH-Bereich statt; die Quantenausbeute bei pH 5 beträgt 0.10. Eine Überbrückung nach N(1) unter Decarboxylierung ist offenbar aus sterischen Gründen ungünstig, wie auch schon die nur schwer durchzuführende Cyclisierung von **2l** zu **10e** ergab.

3-Methylisoalloxazin-10-buttersäure (**2b**), deren Dealkylierung wegen des Fehlens einer γ -Methylgruppe mit einer niedrigeren Quantenausbeute als für **2d** beobachtet erfolgen sollte, zeigt eine neue bisher nicht bekannte Photoreaktion: Diese im Küvettenmaßstab einheitlich verlaufende Reaktion führt im gesamten pH-Bereich zu einer Verbindung mit einem Absorptionsmaximum bei 293 nm und nur schwach ausgeprägten langwelligigen Schultern. Die neue Verbindung ist gegen Sauerstoff – auch beim Bestrahlen – stabil und läßt sich mit Nitrit/Essigsäure nur teilweise in ein mit dem Ausgangsmaterial nicht identisches Isoalloxazinderivat überführen. Der Aufklärung dieser Reaktion, die auch bei noch längerkettigen Isoalloxazin-10-alkancarbonsäuren auftritt und bei der es sich vermutlich um eine Decarboxylierung und Cyclisierung nach N(5) handelt, soll eine gesonderte Mitteilung gewidmet werden.

Massenspektroskopie und Thermogravimetrie der Isoalloxazin-10-alkancarbonsäuren

Kuhn und Rudy⁹⁾ fanden für die Flavin-10-essigsäure (**3a**) den Schmelzpunkt 293°C unter Zersetzung ohne Angabe der Produkte. Die Thermoanalyse zeigt eine Abspaltung von Kohlendioxid, das massenspektrometrisch identifiziert wurde, in einem aus unbekanntem Gründen zweiphasigen Prozeß: Zwischen 142 und 177°C werden etwa 50% von **3a**

unter Decarboxylierung zum 7,8,10-Trimethylisoalloxazin („Lumiflavin“) zersetzt, während der Rest erst ab 211 °C decarboxyliert. In einer nur auf 185 °C erhitzten Probe ist daher dünn-schichtchromatographisch **3a** noch eindeutig nachweisbar. Das Massenspektrum, das erst bei 200 °C Proben-temperatur aufgenommen werden konnte, zeigt daher keinen Molekülpeak, sondern als höchste Massenzahl $m/e = 256$, die zugleich Basispeak ist und dem Lumiflavin (Mol.-Masse = 256) entspricht. Auch die weitere Fragmentierung erfolgt analog dem Lumiflavin, vgl. l. c.³⁰⁾

Der Flavin-10-essigsäure-methylester (**3b**), der auch photochemisch stabil ist, zersetzt sich thermisch erst ab 273 °C und ist bei 308 °C vollständig geschmolzen; bei dieser Zersetzung entsteht ebenfalls Lumiflavin. Im Massenspektrum bei 200 °C wird wegen der relativ hohen thermischen Stabilität ein Molekülpeak bei $m/e = 314$ gefunden. Die Fragmentierung erfolgt zum Teil über die *N*(10)-Seitenkette unter Abspaltung einer Methoxygruppe, zum größeren Teil jedoch unter Fragmentierung des Pyrimidindion-Ringes, wie aus der Literatur von Isoalloxazin-Derivaten bekannt ist³⁰⁾.

Tab. Thermisches und massenspektroskopisches Verhalten einiger 3-Methylisoalloxazin-10-alkancarbonsäuren

Substanz	% McLafferty-Umlagerung	Thermische Zersetzung ab	Produkte der Thermolyse
2a	*	191 °C	12 (+ Acrylsäure)
b	79%	265 °C	12 (+ 3-Butensäure)
c	*	171 °C	12 + Crotonsäure
d	100%	244 °C	12 (+ 3-Pentensäure)
i	87%	214 °C	12 (+ Crotonsäure-methylester)
j	76%	241 °C	12 + <i>trans</i> -2-Buten ²¹⁾
3a	nicht möglich	142 – 177 °C 211 – 245 °C	Lumiflavin + Kohlendioxid
b	nicht möglich	273 °C	Lumiflavin

In den mit einem * markierten Fällen lag die Aufnahmetemperatur des MS über der thermoanalytisch bestimmten Zersetzungstemperatur; % McLafferty-Umlagerung = prozentualer Anteil der Peaks $m/e = 228$ und 229 [12^{+} und $(12-H)^{+}$] am Gesamtionenstrom mit $m/e > 229$; die in Klammern gesetzten Produkte der Thermolyse wurden in Analogie zu den total analysierten Fällen gefolgert.

Die analog der Norrish Typ II-Reaktion verlaufende Photodealkylierung der 3,β-Dimethylisoalloxazin-10-propionsäure (**2c**) legte es nahe, nach Parallelen im thermischen (γ -Wasserstoff-Abstraktion) und massenspektroskopischen Verhalten (McLafferty-Umlagerung) zu suchen, vgl. l. c.³¹⁾ und die dort zitierte Literatur.

Im Massenspektrum von **2c**, das wegen der geringen Flüchtigkeit bei 200 °C aufgenommen werden mußte, wird in der Tat ein Fragment der Massenzahl 228, das dem durch Abspaltung der Seitenkette entstandenen 3-Methylalloxazin (**12**) entspricht, als Basispeak gefunden, während der Molekülpeak nur eine relative Intensität von 0.5% hat. Zur Klärung, ob diesem Befund eine thermische oder massenspektroskopische Reaktion zu Grunde liegt, wurde **2c** auch thermoanalytisch untersucht: In der Thermoanalyse zeigt sich bereits ab

³⁰⁾ P. Brown, C. L. Hornbeck und J. R. Cronin, *Org. Mass Spectrom.* **6**, 1383 (1972).

³¹⁾ R. C. Dougherty, *Fortschr. Chem. Forsch.* **45**, 93 (1974).

171 °C eine Gewichtsabnahme um 26.1 %, die recht gut mit dem für die Abspaltung der Seitenkette berechneten Wert von 27.4 % übereinstimmt. Darüber hinaus konnten an den kalten Stellen des Tiegelhalters Kristalle der Crotonsäure entnommen werden, die somit das thermische Fragmentierungsprodukt der Seitenkette darstellt. Der Methylester **2i** hingegen spaltet thermisch die Seitenkette erst ab 214 °C ab; dem für die Abspaltung von Crotonsäure-methylester berechneten Gewichtsverlust von 30.5 % entspricht sehr gut der beobachtete Verlust von 30.0 %. Im Massenspektrum, das schon bei 150 °C aufgenommen werden konnte, tritt die McLafferty-Umlagerung zu 87 % auf.

Um das Auftreten der McLafferty-Umlagerung eindeutig zu bestätigen, wurde das 10-*sec*-Butyl-3-methylisalloxazin (**2j**), dessen Photodealkylierung zu **12** und *trans*-2-Buten bereits früher beobachtet wurde²⁾, erneut untersucht: **2j** ist thermisch bis 241 °C stabil, die ab dieser Temperatur erfolgende Zersetzung kann auch bei niedrigen Aufheizgeschwindigkeiten thermogravimetrisch nicht analysiert werden, da das neben dem *trans*-2-Buten entstehende **12** bereits ab etwa 280 °C sublimiert. Das schon bei 125 °C aufgenommene Massenspektrum zeigt zu 76 % das McLafferty-Produkt, dessen Auftreten somit eindeutig auf eine massenspektroskopische Umlagerung zurückzuführen ist.

2a erleidet ab 191 °C einen Gewichtsverlust von 25 %, die berechnete Abnahme bei Abspaltung der *N*(10)-Seitenkette als Acrylsäure beträgt 24.0 %. Da das Massenspektrum erst bei 250 °C aufgenommen werden konnte, kann über eine McLafferty-Umlagerung bei **2a** nichts ausgesagt werden. **2d** zeigt die massenspektroskopische Abspaltung der *N*(10)-Seitenkette bei 225 °C zu 100 %; seine thermische Zersetzung beginnt erst ab 244 °C.

Schlußfolgerung

Als „aktive Zentren“ der Coenzyme FMN und FAD wurden bisher nur die C(4a)-^{32, 33)}, N(5)-³²⁾ und C(8)-Positionen³⁴⁾ diskutiert. Die vorliegende Untersuchung zeigt, daß bei günstiger sterischer Anordnung des „Substrates“, in der vorliegenden Arbeit: der kurzen Seitenkette, und bei sterischer Ausschaltung der N(5)- und C(4a)-Positionen, wiederum durch die zu kurze Kette, N(1) ebenfalls zu den aktiven Zentren des Isoalloxazingerüsts zu rechnen ist. Zumindest in den photochemisch angeregten Zuständen können Elektronen über die N(1)-Position in den heterocyclischen Kern hineingegeben werden, wie bereits bei der intramolekularen Photocyclisierung des 10-Phenylisalloxazins gefunden wurde⁷⁾. Die in dieser Arbeit beschriebene thermische γ -Wasserstoff-Abstraktion zeigt, daß die N(1)-Position bei geeigneter sterischer Anordnung der Seitenkette auch im Grundzustand aktiv ist.

Einige der hier beschriebenen Verbindungen, wie etwa der 3, β -Dimethylisalloxazin-10-propionsäure-methylester (**2i**), gehören ferner zu jenen seltenen Substanzen, in denen ein und dasselbe Molekül photochemisch, thermisch und massenspektroskopisch die gleiche Reaktion zeigt.

³²⁾ P. Hemmerich, G. Nagelschneider und C. Veeger, FEBS-Lett. **8**, 69 (1970), und dort zit. Lit.

³³⁾ P. Hemmerich und M. Schuman-Jorns in C. Veeger, J. Drenth und R. A. Oesterbaan (Herausgeber), Enzymes: Structure and Function, 1. Aufl., S. 95, North Holland, Amsterdam 1972.

³⁴⁾ P. Hemmerich, A. P. Bhaduri, G. Blankenhorn, M. Brüstlein, W. Haas und W.-R. Knappe, in T. E. King, H. S. Mason und M. Morrison (Herausgeber), Oxidases and Related Redox Systems, 1. Aufl., S. 3, University Park Press, Baltimore 1973.

Fräulein *K. Bluhme* und Frau *M. Gladys* danke ich für die hervorragende experimentelle Mitarbeit, Herrn *E. Pilz* für die Aufnahme der IR- und Massenspektren sowie Herrn *G. A. Wildermuth* für die Thermoanalysen. Herrn Prof. *P. Hemmerich* danke ich für kritische Diskussionen und der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* für die großzügige finanzielle Unterstützung.

Experimenteller Teil

Die Schmelzpunkte sind nicht korrigiert. IR-Spektren in Kaliumbromid, Perkin-Elmer-Gitterspektrophotometer Modell 621. — $^1\text{H-NMR}$ -Spektren: Varian A 60-A Kernresonanzspektrometer bei ca. 40°C , Tetramethylsilan als innerer Standard. — Elektronenspektren: Varian-Techtron 635 M. — Fluoreszenzspektren: Perkin-Elmer-Gerät des Typs MPF 3. — Massenspektren: Spektrometer CH-7 der Fa. Varian-Atlas bei direkter Probeneinführung in die Ionenquelle. — Thermoanalysen: Gerät STA 429 der Fa. Netzsch, gekoppelt mit Quadrupol-Massenspektrometer QMG 101 der Fa. Balzers.

Die *analytischen Photoreaktionen* wurden unter reinstem Argon mit 1% Wasserstoff der Fa. Linde, das zur Entfernung von Sauerstoff bis herab zu Konzentrationen < 1 ppm über einen Edelmetallkatalysator („Deoxo-Gasreiniger“ der Fa. Heraeus) geleitet wurde, in 1-cm-Quarzküvetten durchgeführt. Als Lichtquelle diente ein umgebauter 6×6 -cm-Diaprojektor mit einer Wolfram-Halogen-Niedervoltlampe (400 Watt/36 Volt), die von einer Hewlett-Packard-Gleichstromversorgung Typ 6268 B gespeist wurde, mit asphärischem Kondensatorsystem und Wärmefilter, das eine Lichtdurchlässigkeit von ca. 350–800 nm aufwies. In diesem Bereich wurden geeignete Spektralbanden mit Hilfe von Metallinterferenzfiltern B-40 der Fa. Balzers ausgewählt. Zur weitgehenden Unterdrückung der IR-Strahlung wurde zusätzlich zum Wärmefilter ein IR-Reflexions-Interferenzfilter der Fa. Balzers vor der Küvette in den Strahlengang gebracht. Die Quantenflußdichte wurde am Ort der Küvette mit einer Thermosäule CA 1 der Fa. Kipp und Zonen und einem Keithley Nanovoltmeter Modell 180 bestimmt. Die Quantenflußdichte bei z. B. 435 nm betrug bis zu 10^{17} Quanten/cm 2 s. Die Belichtungszeiten wurden mit einem abgestimmten Compur electronic m-Photoverschluß geregelt. Zur weiteren Stabilisierung gegen Netzspannungsschwankungen wurden alle Geräte von einem Philips PE 1601-Wechselspannungsstabilisator versorgt. — Die gemessenen Quantenausbeuten sind auf $\pm 20\%$ genau, die relative Genauigkeit ist besser als 10%. — Als Lösungsmittel dienten bidestilliertes Wasser sowie frisch über Calciumhydrid fraktioniertes Acetonitril.

Synthese der Ausgangsmaterialien

Alle *N*-substituierten *o*-Nitroaniline **1a**–**h** wurden nach *Lantz* und *Obellianne*³⁵⁾ aus 1-Fluor-2-nitrobenzol und der entsprechenden Aminoverbindung in wäßriger Natriumcarbonat-Lösung durch 16stdg. Erhitzen unter Rückfluß mit 70–90% Ausb. gewonnen:

3-(2-Nitroanilino)propionsäure (**1a**): Schmp. 142 – 143°C aus Äthanol.

$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_4$ (210.2) Ber. C 51.42 H 4.80 N 13.33 Gef. C 51.24 H 4.77 N 13.23

4-(2-Nitroanilino)buttersäure (**1b**): Schmp. 144 – 145°C aus Äthanol.

$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4$ (224.2) Ber. C 53.57 H 5.39 N 12.50 Gef. C 53.30 H 5.26 N 12.40

3-(2-Nitroanilino)buttersäure (**1c**): Schmp. 99 – 100°C aus Äthanol.

$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4$ (224.2) Ber. C 53.57 H 5.39 N 12.50 Gef. C 53.26 H 4.95 N 12.47

4-(2-Nitroanilino)valeriansäure (**1d**): Schmp. 66 – 68°C aus Methanol; 4-Aminovaleriansäure wurde nach *Tafel*³⁵⁾ durch basische Hydrolyse von 5-Methyl-2-pyrrolidinon erhalten.

$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4$ (238.2) Ber. C 55.45 H 5.92 N 11.76 Gef. C 55.25 H 5.89 N 11.45

³⁵⁾ *J. Tafel*, Ber. Deut. Chem. Ges. **22**, 1860 (1889).

2-(2-Nitroanilino)äthanol (**1e**)³⁶⁾ und 3-(2-Nitroanilino)-1-propanol (**1f**)³⁷⁾ sind literaturbekannt.

2-(2-Nitroanilino)-1-propanol (**1g**): Sdp. 128–130°C/10⁻³ Torr.

C₉H₁₂N₂O₃ (196.2) Ber. C 55.09 H 6.17 N 14.28 Gef. C 54.91 H 6.31 N 14.12

4-(2-Nitroanilino)-1-butanol (**1h**)³⁸⁾: Schmp. 40–41°C, nach Dest. i. Hochvak., Sdp. 135 bis 138°C/0.0005 Torr.

C₁₀H₁₄N₂O₃ (210.2) Ber. C 57.13 H 6.71 N 13.33 Gef. C 57.10 H 6.78 N 13.20

Die Isoalloxazin-Derivate **2a–h** wurden nach der bereits publizierten Modifikation⁷⁾ der Vorschrift von *Kuhn* und *Weygand*¹⁴⁾ aus den durch katalytische Reduktion der 2-Nitroaniline **1a–h** *in situ* dargestellten *o*-Phenylendiamin-Derivaten mit Methylalloxan-monohydrat³⁹⁾ erhalten und aus Ameisensäure umkristallisiert:

3-Methylisoalloxazin-10-propionsäure (**2a**): Ausb. 55%, ab 191°C Zersetzung (thermoanalytisch). – UV: identisch mit **2c**. – MS (250°C, 70 eV); *m/e* (% des Basispeaks): 300 M⁺ (0.7), 256 M⁺ – CO₂ (0.5), 228 M⁺ – CH₂=CHCO₂H (100), 199 228 – CH₃N (1.1), 171 228 – CH₃NCO (40), 143 171 – CO (71).

Thermoanalyse: Eine Einwaage von 53.59 mg ergab bei einer Aufheizgeschwindigkeit von 2°C/min in einem Heliumstrom von 5 l/h ab 191°C eine Gewichtsabnahme von 13.4 mg (25%). Im Platintiegel blieb 3-Methylalloxazin (**12**) zurück. Der Abspaltung von Acrylsäure entspricht eine theoretische Gewichtsabnahme von 24.0%.

C₁₄H₁₂N₄O₄ (300.3) Ber. C 56.00 H 4.03 N 18.66
Gef. C 54.92⁴⁰⁾ H 4.10 N 18.43 Mol.-Masse 300 (MS)

3-Methylisoalloxazin-10-buttersäure (**2b**): Ausb. 58%, ab 265°C Zers., ab 285°C Sublimation. – UV: identisch mit **2c**. – MS (225°C, 70 eV), *m/e* (% des Basispeaks): 314 M⁺ (18), 242 M⁺ – CH₂=CHCO₂H (8), 228 M⁺ – CH₂=CHCH₂CO₂H (100), 199 228 – CH₃N (10), 171 228 – CH₃NCO (40), 143 171 – CO (66).

C₁₅H₁₄N₄O₄ (314.3) Ber. C 57.32 H 4.49 N 17.83
Gef. C 57.68 H 4.41 N 17.98 Mol.-Masse 314 (MS)

3,β-Dimethylisoalloxazin-10-propionsäure (**2c**): Ausb. 67%, ab 171°C Zers. zu 3-Methylalloxazin und Crotonsäure (thermoanalytisch). – UV (H₂O, pH 7): λ_{max} (log ε) = 438 (4.00), 344 nm (3.91). – Fluoreszenz (H₂O, pH 7): λ_{max} 518 nm. – MS (200°C, 70 eV); *m/e* (% des Basispeaks): 228 M⁺ – CH₃CH=CHCO₂H (100), 199 228 – CH₃N (12), 171 228 – CH₃NCO (42), 143 171 – CO (95).

Thermogravimetrie: Eine Einwaage von 45.90 mg führte bei einer Aufheizgeschwindigkeit von 4°C/min in einem Heliumstrom von 5 l/h ab 171°C zu einer Gewichtsabnahme von 12.0 mg (26.1%). Während im Platintiegel 3-Methylalloxazin zurückblieb, konnte von den kalten Stellen des Tiegelhalters Crotonsäure in Form farbloser Kristalle entnommen werden. Für diese Fragmentierung ist eine theoretische Gewichtsabnahme von 27.4% zu erwarten.

C₁₅H₁₄N₄O₄ (314.3) Ber. C 57.32 H 4.49 N 17.83 Gef. C 57.36 H 4.40 N 17.78

3,γ-Dimethylisoalloxazin-10-buttersäure (**2d**): Ausb. 63%, ab 244°C Zers. (thermoanalytisch). – MS (225°C, 70 eV); *m/e* (% des Basispeaks): 228 M⁺ – CH₃CH=CHCH₂CO₂H (79), 199 228 – CH₃N (8), 171 228 – CH₃NCO (38), 143 171 – CO (100).

³⁶⁾ P. Karrer, E. Schlittler, K. Pfäehler und F. Benz, *Helv. Chim. Acta* **17**, 1516 (1934).

³⁷⁾ P. Karrer, T. Köbner, H. Salomon und F. Zehender, *Helv. Chim. Acta* **18**, 266 (1935).

³⁸⁾ W. M. Moore und C. Baylor jr., *J. Amer. Chem. Soc.* **91**, 7170 (1969).

³⁹⁾ E. Biilman und N. Berg, *Ber. Deut. Chem. Ges.* **63**, 2188 (1930).

⁴⁰⁾ Isoalloxazin-Derivate geben in der Elementaranalyse häufig um mehr als 1% zu kleine Kohlenstoffwerte; die Reinheitskontrolle erfolgte daher stets dünnschichtchromatographisch und anhand des UV-Spektrums.

Thermogravimetrie: Ab 244 °C trat Zersetzung ein; trotz der niedrigen Aufheizgeschwindigkeit von 2 °C/min war jedoch keine deutliche Stufe in der Gewichtsabnahme zu erkennen, da ab ca. 280 °C auch das entstehende 3-Methylalloxazin sublimierte.

$C_{16}H_{16}N_4O_4$ (328.3) Ber. C 58.53 H 4.91 N 17.07 Gef. C 58.37 H 4.79 N 16.83

3-Methylisoalloxazin-10-äthanol (**2e**): Ausb. 74 %, Schmp. 293 – 298 °C, ab 274 °C Sublimation. – UV: identisch mit **2c**.

$C_{13}H_{12}N_4O_3$ (272.3) Ber. C 57.35 H 4.44 N 20.58 Gef. C 56.99 H 4.32 N 20.20

3-Methylisoalloxazin-10-propanol (**2f**): Ausb. 67 %, Schmp. 248 – 250 °C, ab 210 °C Sublimation.

$C_{14}H_{14}N_4O_3$ (286.3) Ber. C 58.73 H 4.93 N 19.57 Gef. C 58.30 H 4.86 N 19.42

3,β-Dimethylisoalloxazin-10-äthanol (**2g**): Ausb. 69 %, Schmp. 281 – 286 °C (Zers.).

$C_{14}H_{14}N_4O_3$ (286.3) Ber. C 58.73 H 4.93 N 19.57 Gef. C 58.68 H 4.85 N 19.26

3-Methylisoalloxazin-10-butanol (**2h**): Ausb. 77 %, Schmp. 251 – 256 °C.

$C_{15}H_{16}N_4O_3$ (300.3) Ber. C 59.99 H 5.37 N 18.66 Gef. C 59.25 H 5.29 N 18.30

3,β-Dimethylisoalloxazin-10-propionsäure-methylester (**2i**): **2c** wurde nach Kuhn und Rudy⁹⁾ mit HCl-gesättigtem Methanol verestert, Ausb. 85 %, ab 210 °C Zers. (thermoanalytisch). – MS (150 °C, 70 eV); *m/e* (% des Basispeaks): 328 M⁺ (7), 297 M⁺ – CH₃O (1), 268 M⁺ – CH₃OCO (9), 229 (23), 228 M⁺ – CH₃CH=CHCO₂CH₃ (92), 199 228 – CH₃N, 171 228 – CH₃NCO (39), 172 (8), 170 (12), 143 171 – CO (12), 142 170 – CO (100), 117 (18), 69 (23), 43 (19).

Thermogravimetrie: Bei einer Einwaage von 70.67 mg trat zunächst ab 106 °C bei einer Aufheizgeschwindigkeit von 4 °C/min im Heliumstrom (5 l/h) eine Gewichtsabnahme von 9.0 mg (12.7 %) auf, die dem Austreten des auch in der Elementaranalyse gefundenen Kristall-Methanols entspricht. Ab 214 °C wurde eine weitere Gewichtsabnahme um 18.5 mg (30.0 %) beobachtet, die sehr gut mit dem berechneten Wert für die Abspaltung von Crotonsäure-methylester (30.5 %) übereinstimmt. Im Platintiegel bleibt 3-Methylalloxazin zurück.

$C_{16}H_{16}N_4O_4 \cdot 1.5CH_3OH$ (376.3) Ber. C 55.85 H 5.85 N 14.89
Gef. C 55.54 H 5.21 N 14.64 Mol.-Masse 328 (MS)

10-sec-Butyl-3-methylisoalloxazin (**2j**)²⁾: MS (125 °C, 70 eV); *m/e* (% des Basispeaks): 284 M⁺ (14), 269 M⁺ – CH₃ (37), 229 (64), 228 M⁺ – CH₃CH=CHCH₃ (100), 199 228 – CH₃N (17), 71 228 – CH₃NCO (57), 142 (74).

Thermogravimetrie: Ab 241 °C begann die thermische Zersetzung von **2j**, ohne jedoch nach beendeter Abspaltung der N(10)-Seitenkette eine Stufe zu zeigen, vgl. **2d**. Als Produkt konnte im Platintiegel 3-Methylalloxazin nachgewiesen werden.

Flavin-10-essigsäure (**3a**): MS (200 °C, 70 eV); *m/e* (% des Basispeaks): 256 M⁺ – CO₂ = Lumiflavin (100), 242 (66), 213 256 – HNCO (71), 185 213 – CO (28), 171 (57), 170 (25), 156 (26).

Thermogravimetrie: Bei einer Aufheizgeschwindigkeit von 4 °C/min i. Vak. zeigte eine Probe von 51.62 mg zwei CO₂-Abspaltungsphasen bei 142 – 177 und 211 – 245 °C, beide tragen zu rund 50 % zum Gewichtsverlust bei. Das CO₂ wurde massenspektroskopisch identifiziert, das im Platintiegel zurückbleibende Material konnte dünnschichtchromatographisch als Lumiflavin identifiziert werden. Wurde das Aufheizen nach der 1. Abspaltungsphase beendet, so konnte nicht zersetztes **3a** dünnschichtchromatographisch in der Probe nachgewiesen werden.

Flavin-10-essigsäure-methylester (**3b**): Veresterung von **3a** nach Kuhn und Rudy⁹⁾. Der Ester zersetzt sich ab 237 °C, wobei Lumiflavin entsteht. – MS (200 °C, 70 eV); *m/e* (% des Basispeaks): 314 M⁺ (6), 313 M⁺ – H (34), 282 313 – CH₃O (5), 271 M⁺ – HNCO (13), 256 Lumiflavin[†] (?) (24), 243 271 – CO (6), 60 (25), 45 (45), 43 (100).

Umsetzung von **2e-h** mit Thionylchlorid nach l. c.²⁸⁾

5-Methyl-4,6-dioxo-1,2,5,6-tetrahydro-4H-benz[*g*]imidazo[1,2,3-*ij*]pteridinium-chlorid (**10a**) und -perchlorat (**10d**): 1.00 g (3.67 mmol) **2e** wurden mit 12 ml Thionylchlorid erst 1 h bei Raumtemp. gerührt, dann 30 min unter Rückfluß erhitzt. Der beim Abkühlen auf 0°C ausfallende Niederschlag von **10a** wurde abfiltriert und zunächst mit Äther, dann mit Hexan gewaschen und i. Vak. bei 60°C getrocknet. Schmp. 211–217°C, gelbe Kristalle, 870 mg (82%).

Zur Analyse löste man 300 mg **10a** in etwa 5 ml Wasser bei 20°C, filtrierte und versetzte bei 0°C langsam mit 3 ml 60proz. Perchlorsäure. Der ausfallende blaßgelbe Niederschlag wurde abfiltriert, mit Eiswasser gewaschen und i. Vak. getrocknet. Ausb. 270 mg (82%) **10d**, Schmp. 282 bis 290°C. – IR (KBr): C(6)=O 1743, C(4)=O 1700, ClO₄[⊖] 1080–1150 und 625 cm⁻¹. – UV (0.1 N HClO₄): λ_{max} 405 sh (log ε 3.87), 368 (4.10), 256 (4.45), 212 nm (4.38).

[C₁₃H₁₁N₄O₂]ClO₄ (354.7) Ber. C 44.02 H 3.13 Cl 10.00 N 15.80
Gef. C 43.96 H 3.09 Cl 9.78 N 15.81

Analog wurden aus **2g** 1,5-Dimethyl-4,6-dioxo-1,2,5,6-tetrahydro-4H-benz[*g*]imidazo[1,2,3-*ij*]pteridinium-chlorid (**10b**) und -perchlorat (**10e**) dargestellt; Schmp. 202–204 bzw. 319–322°C. – IR (KBr): C(6)=O 1740, C(4)=O 1705, ClO₄[⊖] 1085–1135 und 625 cm⁻¹. – Das UV-Spektrum von **10e** ist identisch mit dem von **10d**.

[C₁₄H₁₃N₄O₂]ClO₄ (368.7) Ber. C 45.60 H 3.55 Cl 9.62 N 15.20
Gef. C 45.51 H 3.59 Cl 9.34 N 15.19

6-Methyl-5,7-dioxo-2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H-benzo[*g*]pyrimido[1,2,3-*ij*]pteridinium-chlorid (**10c**) und -perchlorat (**10f**): Bei der Umsetzung von **2f** mit Thionylchlorid analog zur Darstellung von **10a, b** wurde **10c** in 43proz. Ausb. erhalten, Schmp. > 350°C. Zur Analyse wurde wie oben das Perchlorat **10f** dargestellt, Schmp. 295–301°C. – IR (KBr): C(7)=O 1737, C(5)=O 1695, ClO₄[⊖] 1065–1145 und 615–625 cm⁻¹. – *UV (0.1 N HClO₄): λ_{max} 392 (log ε 4.00), 367 (4.12), 304 sh (3.45), 257 (4.44), 212 nm (4.36).

[C₁₄H₁₃N₄O₂]ClO₄ (368.7) Ber. C 45.60 H 3.55 Cl 9.62 N 15.20
Gef. C 45.48 H 3.54 Cl 9.74 N 15.08

Aus der Thionylchlorid-Mutterlauge fielen bei Zugabe von 50 ml Äther 250 mg (19%) 10-(3-Chlorpropyl)-3-methylisalloxazin (**2i**) in gelben Kristallen vom Schmp. 169–172°C (Zers.) aus. – IR (KBr): C(4)=O 1742, C(2)=O 1710 cm⁻¹. – UV (Methanol): identisch mit **2c**.

C₁₄H₁₃ClN₄O₂ (304.7) Ber. C 55.18 H 4.30 Cl 11.64 N 18.39
Gef. C 54.23⁴⁰⁾ H 4.21 Cl 11.34 N 17.90

10-(4-Chlorbutyl)-3-methylisalloxazin (**2n**): Bei der Umsetzung von **2h** mit Thionylchlorid entstand auch nach 3stdg. Kochen kein Niederschlag, mit Äther konnte **2n** in nahezu quantitativer Ausb. gefällt werden, Schmp. 204–207°C. – UV (Methanol): identisch mit **2c**.

C₁₅H₁₅ClN₄O₂ (318.8) Ber. C 56.52 H 4.74 Cl 11.12 N 17.58
Gef. C 55.62⁴⁰⁾ H 4.79 Cl 11.41 N 17.70

Darstellung von **11a-c** nach l. c.²⁸⁾

7-Acetyl-5-methyl-1,2,5,6-tetrahydro-4H,7H-benz[*g*]imidazo[1,2,3-*ij*]pteridin-4,6-dion (**11a**): 400 mg (1.38 mmol) **10a** wurden in 3 ml Trifluoressigsäure und 3 ml Acetanhydrid gelöst und bei Raumtemp. innerhalb von 1 h mit 150 mg Zinkstaub versetzt. Nach 1 h weiteren Rührens wurde noch 30 min unter Rückfluß erhitzt. Nach Abfiltrieren ungelösten Zinks wurde zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 10 ml Wasser aufgenommen, wobei das Endprodukt **11a** ungelöst blieb. Nach Abfiltrieren und Trocknen 235 mg (57%) farblose, bei 271–275°C schmelzende Kristalle. – IR (KBr): C(6)=O 1712, C(4)=O 1670, CH₃C=O 1644 cm⁻¹. – UV (Methanol): λ_{max} 295 (log ε 3.86), 235 (4.32), 213 nm (4.40); in 6 N HCl: λ_{max} 308 (log ε 3.86), 237 (4.21), 209 (4.39). –

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\tau = 2.18 - 3.45$ (m, 4 arom. H), 5.50 – 6.23 (m, 1-, 2-H), 6.67 (s, 5- CH_3), 7.72 (s, CH_3CO). – MS (150°C, 70 eV); m/e (% des Basispeaks): 298 M^+ (0.4), 297 $\text{M}^+ - \text{H}$ (3), 256 $\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{CO}$ (8), 255 $\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{CO}$ (100), 254 297 – CH_3CO (10), 199 256 – CH_3NCO (3), 198 255 – CH_3NCO (3), 171 199 – CO (16), 170 198 – CO (18), 143 170 – HCN (9), 43 CH_3CO (17).

$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_3$ (298.3) Ber. C 60.39 H 4.73 N 18.78

Gef. C 60.33 H 4.70 N 18.55 Mol.-Masse 298 (MS)

7-Acetyl-1,5-dimethyl-1,2,5,6-tetrahydro-4H,7H-benz[*g*]imidazo[1,2,3-*ij*]pteridin-4,6-dion (**11b**) wurde analog aus **10b** dargestellt, Ausb. 62%, Schmp. 275 – 280°C, farblose Kristalle, die laut Elementaranalyse 0.25 mol Essigsäure einschließen. – IR (KBr): C(6)=O 1718, C(4)=O 1660, $\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$ 1643 cm^{-1} . – UV (Methanol): λ_{max} 297 (log ϵ 3.89), 235 (4.31), 214 nm (4.40); in 6 N HCl: λ_{max} 308 (log ϵ 3.88), 241 (4.23), 210 (4.40). – $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\tau = 2.25 - 3.28$ (m, 4 arom. H), 5.30 – 6.32 (m, 1-, 2-H), 6.67 (s, 5- CH_3), 7.73 (s, $\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$), 8.32 (d, 1- CH_3). – MS (175°C, 70 eV); m/e (% des Basispeaks): 312 M^+ (6), 269 $\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{CO}$ (100), 228 (54), 171 228 – CH_3NCO (30), 143 171 – CO (61), 116 143 – HCN (17).

$\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_3 \cdot 0.25\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ (327.3) Ber. C 60.54 H 5.23 N 17.12

Gef. C 60.47 H 5.17 N 17.22 Mol.-Masse 312 (MS)

8-Acetyl-6-methyl-2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H,8H-benzo[*g*]pyrimido[1,2,3-*ij*]pteridin-5,7-dion (**11c**) wurde analog aus **10c** dargestellt, Ausb. 60% farblose, bei 305 – 310°C schmelzende Kristalle. – IR (KBr): C(7)=O 1702, C(5)=O 1655, $\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$ 1642 cm^{-1} . – UV (Methanol): λ_{max} 310 (log ϵ 3.86), 235 (4.26), 214 nm (4.36); in 6 N HCl: λ_{max} 319 (log ϵ 3.94), 248 (4.20), 210 (4.35). – $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_5]\text{Pyridin}$): Die aromatischen Protonen sind von den α - und γ -Wasserstoffen nicht deuterierten Pyridins verdeckt, $\tau = 6.48$ (s, 6- CH_3), 6.32 – 6.66 (m, 1- und 3- CH_2). – MS (125°C, 70 eV); m/e (% des Basispeaks): 312 M^+ (5), 271 (17), 270 $\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{CO}$ (100), 269 $\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{CO}$ (31), 256 $\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{NCO}$ (36), 213 270 – CH_3NCO (2), 185 213 – CO (10), 171 (14), 157 (27), 130 (21), 43 CH_3CO (98).

$\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_3$ (312.3) Ber. C 61.53 H 5.16 N 17.94

Gef. C 60.48⁴⁰⁾ H 5.14 N 17.54 Mol.-Masse 312 (MS)

Quantitativer Mikronachweis von Formaldehyd nach l. c.¹⁷⁾ bei der Photoreaktion von **3a**: Zwei 2-ml-Proben einer nahezu gesättigten wäßrigen Lösung von **3a** (2.6×10^{-4} M) wurden mit 445-nm-Licht bestrahlt, bis keine gelbgrüne Fluoreszenz mehr sichtbar war. Nach Zugabe von je 250 mg Chromotropsäure (1,8-Dihydroxynaphthalin-3,6-disulfonsäure) wurde das Wasser im Ölbad bei 130°C abgedampft. Einengen unter vermindertem Druck führt zu großen Verlusten an Formaldehyd. Nach Zugabe von 5 ml konz. Schwefelsäure wurde 30 min auf 100°C erhitzt und nach Abkühlen auf 50 ml Endvolumen aufgefüllt. Die Proben zeigten in 1-cm-Küvetten gegen eine Blindlösung von Chromotropsäure und 7,8-Dimethylalloxazin Extinktionen von 0.112 und 0.114, die der Entstehung von 13.8 und 14.1 μg Formaldehyd entsprechen. Die Ausbeute lag daher bei 88 und 90% und kann als nahezu quantitativ bezeichnet werden.

Photodecarboxylierung und -cyclisierung von **2a**, **c**: 100 mg **2a** bzw. **c** wurden in einem Gemisch von 100 ml Essigsäure und 100 ml Acetanhydrid bei 20°C unter Stickstoff mit einer Quecksilberhochdrucklampe Philips HPK 125 und Solidexfilter bestrahlt, bis kein Ausgangsmaterial mehr UV-spektroskopisch nachweisbar war. Nach einstündigem Stehenlassen wurde die Reaktionsmischung unter vermindertem Druck zur Trockne eingedampft. Der Rückstand besteht aus **11a** bzw. **b**, wie durch dünnschichtchromatographischen Vergleich mit authent. Material und UV-Spektren nachgewiesen wurde.

Bei der analogen Umsetzung von **2b** konnte kein **11c** nachgewiesen werden.