

233. Studien in der Lumiflavin-Reihe V¹⁾

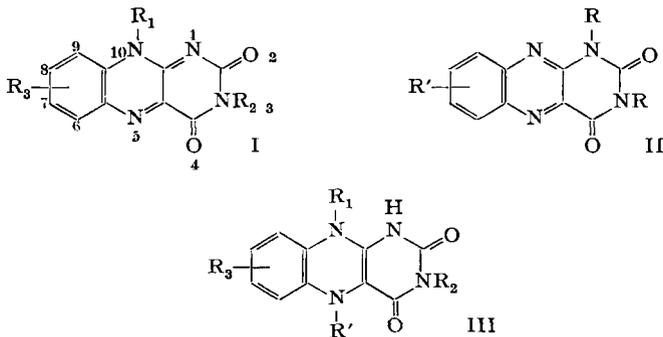
Spezifische Reaktivität

8-ständiger Substituenten am Isoalloxazin-Kern²⁾; Flavin-Dimere

von P. Hemmerich, B. Prijs und H. Erlenmeyer

(27. VIII. 59)

Im Rahmen unserer Untersuchungen zur struktur- und koordinations-chemischen Charakterisierung von Flavin-Metallchelaten³⁾ als Flavoenzymmodellen haben wir uns erstmals mit dem Studium der chemischen Reaktivität des Isoalloxazin-Systems (I)²⁾ eingehender befasst. In einer früheren Mitteilung⁴⁾ beschrieben wir stabile Derivate des Leuko-isoalloxazins (III) und Substitutionsreaktionen an den 2- bzw. 4-ständigen Oxogruppen des Leuko-isoalloxazinkerns.



Bei diesen Untersuchungen beobachteten wir häufig das irreversible Auftreten tiefgrüner, äusserst stark grün fluoreszierender Produkte, vor allem beim Arbeiten in alkalischem Milieu in Gegenwart wasserentziehender Mittel. Umsetzungen von Lumiflavin- und Leukolumiflavin-Derivaten mit Phosphorhalogeniden in Pyridin⁵⁾ oder basenkatalysierte Methylierungen dieser Verbindungen in Dimethylformamid nahmen daher nicht den normalen Verlauf⁶⁾. Ähnliche tiefgrüne Produkte erhielten wir bei Versuchen zur Darstellung von 2-⁴⁾ und 4-Desoxyflavinen⁷⁾.

In reiner Form konnten wir solche Produkte erstmals durch Behandlung von Riboflavin (A, R = Ribityl, R' = H) und Lumiflavin (A, R = CH₃, R' = H) mit K₂CO₃ in heissem Dimethylformamid fassen. Beim Arbeiten unter Stickstoff erhält

¹⁾ IV: Helv. **42**, 1604 (1959).

²⁾ Die Bezeichnungen «Isoalloxazin» und «Flavin» werden in der Lit. synonym gebraucht. Wir verwenden jeweils die Bezeichnung, welche den Zusammenhang besser verdeutlicht. Vgl. R. KUHN & A. H. COOK, Ber. deutsch. chem. Ges. **70**, 761 (1937).

³⁾ Vgl. P. HEMMERICH & S. FALLAB, Helv. **41**, 499 (1958).

⁴⁾ Vgl. P. HEMMERICH & H. ERLIENMEYER, Helv. **40**, 181 (1957).

⁵⁾ Vgl. demgegenüber die Reaktion von Lumiflavin mit P₂S₅ in Pyridin⁴⁾.

⁶⁾ Vgl. VI. Mitt. dieser Reihe, erscheint demnächst.

⁷⁾ Vgl. VII. Mitt. dieser Reihe, erscheint demnächst.

man zunächst in irreversibler Reaktion schwarzgrüne Festkörper, welche langsam an der Luft, schneller beim Digerieren mit warmem verd. H_2O_2 , braunrote bis rotviolette Farbe annehmen. Dieser letztere Übergang ist reversibel: Beim Zusatz von $Na_2S_2O_4$ in alkalischem Milieu erhält man zunächst die grüne Form zurück, welche sich mit einem Überschuss des Reduktionsmittels nach orange gelb aufhellt.

Das Auftreten dieser tief grün gefärbten Übergangsform entspricht den bekannten Übergängen bei der Reduktion von Flavinen, wie sie erstmals von KUHN & STRÖBELE⁸⁾ («Verdoflavine») beobachtet und formuliert worden sind. Demzufolge dürfte es sich auch hier um einen Chinon-Semichinon-Übergang handeln.

Die roten Pigmente werden in schön kristalliner, papierchromatographisch reiner Form aus 40- bis 60-proz. $HClO_4$ als Perchlorate erhalten. Sie sind nur in 6- bis 10-n. Mineralsäuren und starken organischen Säuren gut löslich. Beim Verdünnen dieser Lösungen mit Wasser scheiden sich die freien Basen in roten Flocken wieder ab. Der Niederschlag hellt sich in alkalischem Milieu stark auf infolge Bildung von ebenfalls unlöslichen Salzen. Von neutralen Lösungsmitteln vermag nur Dimethylsulfoxyd die Pigmente merklich zu lösen. Es entstehen orangefarbene, grünlich fluoreszierende Lösungen, welche bei Zugabe von Wasser nach rotviolett umschlagen. Dies deutet darauf hin, dass die Pigmente in Dimethylsulfoxyd als Salze vorliegen. Bei Zusatz von NaOH tritt wieder Aufhellung von rotviolett nach rotorange auf. Die zugehörigen Spektren geben wir in Fig. 1 wieder.

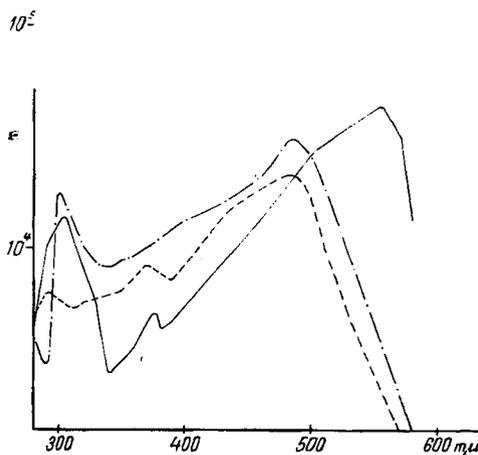


Fig. 1. Pigment B' aus Riboflavin

--- in $(CH_3)_2SO$
 — in H_2O , pH = 4,5
 - - - in H_2O , pH = 12

Die Pigmente werden selbst bei stundenlangem Kochen mit überschüssiger NaOH nicht merklich unter Ringöffnung hydrolysiert, nehmen dabei aber allmählich – infolge Einwirkung reduzierender Verunreinigungen – die grünschwärze Semichinon-Farbe an. Die Verfärbung wird durch Zusatz von H_2O_2 verhindert bzw. rückgängig gemacht. Diese Alkali-Beständigkeit ist mit einer echten Flavin(Isoalloxazin-)Struk-

⁸⁾ R. KUHN & R. STRÖBELE, Ber. deutsch. chem. Ges. **70**, 753 (1937).

tur (I) unvereinbar⁹⁾. Sie findet sich hingegen bei 1,3-unsubstituierten Alloxazinen (II, R = H)¹⁰⁾, woraus zu schliessen ist, dass unsere chinoiden Pigmente im Pyrimidin-Teilkern Alloxazin-Profil aufweisen.

Weiteren Aufschluss über die Struktur der roten Pigmente gaben Gruppenbestimmungen: N-10-ständiges Methyl bleibt bei ihrer Bildung unverändert, hingegen ist nur noch eine C-Methyl-Gruppe pro Flavinkern vorhanden¹¹⁾. Dass die 8-ständige CH₃-Gruppe abgewandelt wird, folgt daraus, dass 8-Halogen-7-methyl- (vgl. X) bzw. 8-Amino-7-methyl-flavine keine analoge Reaktion eingehen, ebenso wenig 8-unsubstituierte Flavine wie 10-Methylflavin und 10-Methylflavin-7-sulfosäure³⁾⁶⁾. Auch 8-Methylalloxazine, z. B. Lumichrom, reagieren nicht analog.

Hingegen erhält man ausgehend von 3-Methylumiflavin (A, R = R' = CH₃) einen entsprechenden Farbstoff, der jedoch gegen heisse NaOH nicht mehr beständig ist. Ein ähnliches Ansteigen der Alkali-Empfindlichkeit mit der Einführung von N-Methylgruppen findet sich beim Alloxazin¹²⁾.

Variiert man die beschriebene Reaktion von Lumiflavin mit K₂CO₃ in heissem Dimethylformamid durch Zusatz von Dimethylsulfat, so erhält man einen roten Farbstoff, der sich papierchromatographisch in drei Komponenten von gleicher roter Farbe und orangeroter Fluoreszenz zerlegen lässt: Von diesen sind die beiden langsam laufenden Flecke identisch mit den aus Lumiflavin bzw. 3-Methylumiflavin ohne Zusatz von Dimethylsulfat erhaltenen Farbstoffen. Es liegt daher nahe anzunehmen, dass es sich bei dem dritten Bestandteil um einen noch höher methylierten Körper analoger Struktur handelt. Voraussetzung hierfür ist, dass bei der Bildung der roten Pigmente eine zusätzliche methylierbare cyclische NH-Gruppe in 1-Stellung des Flavinkerns auftritt. Wohl infolge der erwähnten Hydrolysen-Empfindlichkeit¹²⁾ liess sich dieser permethylierte Farbstoff jedoch nicht rein erhalten.

Bei Behandlung mit naszierendem Wasserstoff erhält man aus den roten Pigmenten gelbe, extrem – unter Rückbildung der roten Pigmente – autoxydable Leukokörper. Einen anderen, farblosen Typus von Leukoverbindungen, wohl in 5-Stellung formyliert¹³⁾ und daher stabiler, erhält man durch Hydrierung mit Pd-Kohle in warmer Ameisensäure, wobei 2 Äquivalente H₂ verbraucht werden. Diese farblosen Leukoverbindungen gehen bei milder saurer Verseifung unter Autoxydation in eine orangegelbe, gelbgrün fluoreszierende Form über, welche bei gleicher Bruttozusammensetzung (s. unten) von der roten, schwach rotorange fluoreszierenden Ausgangsform auch chromatographisch verschieden ist. Diese gelbe Form lässt sich durch Erwärmen in alkalischer Lösung wieder in die isomere rote Form überführen, ist also mit dieser tautomer.

⁹⁾ Zur alkalischen Hydrolyse von Flavinen vgl. z. B. W. S. McNUTT JR., J. biol. Chemistry **219**, 366 (1956).

¹⁰⁾ Zur Alkali-Beständigkeit von Alloxazin vgl. R. KUHN & F. BAER, Ber. deutsch. chem. Ges. **67**, 898 (1934).

¹¹⁾ Die zweite C-Methylgruppe der Flavine A wird in der KUHN-ROTH-Bestimmung zwar nicht quantitativ, aber doch deutlich erfasst. Eine Kontrolle mit analysenreinem Riboflavin (M = 376) ergab z. B. (C)CH₃ 6,82%, ber. für 2 C(CH₃)-Gruppen 7,98%.

¹²⁾ Zur Alkali-Empfindlichkeit von 1,3-Dimethylalloxazin vgl. H. BREDERECK & K. PFLEIDERER, Chem. Ber. **87**, 1119 (1954).

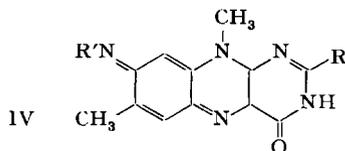
¹³⁾ Die Flavine A ergeben mit HCOOH unter reduzierenden Bedingungen stabile, farblose 5-Formyl-Leukoderivate, aus welchen sich bei milder saurer Hydrolyse die autoxydablen Leukoflavine freisetzen lassen, vgl. ⁶⁾⁴⁾.

Wesentlich für die Strukturaufklärung der beiden Tautomeren ist ihr papierchromatographisches Verhalten: Die im Vergleich mit den Ausgangsprodukten A auffallend niedrigen Rf-Werte (vgl. Tabelle und Exper. Teil) schliessen monomere Struktur aus. Aus den beschriebenen Eigenschaften und Reaktionen der roten Pigmente geht aber eindeutig hervor, dass bei der Bildungsreaktion aus A nur an der 8-Methylgruppe eine irreversible Strukturänderung erfolgt. Dieser Befund schliesst wiederum höhere Polymerisation aus, so dass wir die dimere Struktur für die einzig mögliche halten¹⁴). Wir interpretieren daher die bei der Elementaranalyse der roten Pigmente und ihrer gelben Isomeren erhaltenen Werte mit der Formel $(A)_2 - 2H$.

Aus dieser Formel und den bisher wiedergegebenen Befunden ergeben sich zwanglos die im Reaktionsschema formulierten Strukturen und Entstehungsmechanismen:

In basischem Milieu ist das «benzochinoide» Pigment B' die erste stabile Stufe im Reaktionsverlauf $A \rightarrow A' \rightarrow B \rightarrow B'$. B' mit dem «Alloxazinprofil» im Pyrimidinkern ist verständlicherweise stabiler als das «pyrimidochinoide» Tautomere B. B lässt sich hingegen — wie schon erwähnt — aus B' durch katalytische Hydrierung und anschliessende Autoxydation in saurer Lösung erhalten.

Während B in allen Eigenschaften ausser dem papierchromatographischen Verhalten, insbesondere im Spektrum mit den Ausgangsflavinen A übereinstimmt, ist B' der kürzlich von uns eingehend untersuchten Klasse der 8-Aminoflavine, vor allem dem 8-Nor-8-acetylamino-2-desoxy-lumiflavin (IV, R = H, R' = CH₃CO) und seinen Derivaten (z. B. IV, R = SCH₃, R' = H), spektral sehr nahe verwandt (vgl. Fig. 2 und 3).



Für diese postulierten wir auf Grund ihrer chemischen Eigenschaften die tautomere benzochinoide Struktur vom Typus A'¹)⁶). Das papierchromatographische Verhalten sowie die spektralen Eigenschaften der Pigmente B, B' und C (s. unten) und einer Reihe weiterer Verbindungen der (Iso)alloxazinreihe sind in der Tabelle (S. 2169) zusammengestellt.

Die isomeren Strukturen B und B' machten die Existenz einer dritten, dehydrierten Stufe von Flavin-Dimeren mit der Struktur C wahrscheinlich. Tatsächlich gelang es uns, diese dehydrierte Stufe durch Behandlung von B' mit H₂O₂ in warmem, stark saurem Milieu zu erhalten. Durch Zugabe von Na₂S₂O₄ in neutralem Milieu lässt sich aus C wieder B' zurückgewinnen. C ist sehr intensiv orangegelb gefärbt und schon in der Kälte in mässig konzentrierten Säuren und hochpolaren Lösungsmitteln löslich. Auch in verdünnten Alkalien löst es sich momentan mit orangegelber Farbe. Geringste Spuren reduzierender Substanzen genügen allerdings zur Verfärbung der alkalischen Lösung nach rotbraun, wobei sich das alkaliumlösliche B' zurückbildet.

¹⁴) Eine direkte Bestimmung des Molekulargewichts ist wegen der Unlöslichkeit der Dimeren in den hierfür anwendbaren Lösungsmitteln nicht möglich.

Papierchromatographische und spektrale Eigenschaften

	Rf-Wert	Farbe	Fluoresz. im UV.-Licht	Abs.-Max. in HCOOH
	im Papierchromatogramm			$\lambda_{\max}/\epsilon_{\max} \cdot 10^{-4}$ (m μ)
B', R = CH ₃ , R' = H «Benzochinoides Bilumiflavin»	0,20 ^{b)} 0,47 ^{a)} 0,00 ^{c)} d)	rot	rotorange	263/3,2 480/5,5
B', R = Ribityl, R' = H «Benzochinoides Biriboflavin»	0,13 ^{b)} 0,38 ^{a)} 0,00 ^{c)} d)			
B', R = R' = CH ₃	0,70 ^{a)}			
B, R = Ribityl, R' = H «pyrimidochinoides Biriboflavin»	0,63 ^{b)} 0,62 ^{a)}	gelb	gelbgrün	267/2,8 390/2,0
C, R = Ribityl, R' = H «Dehydro-biriboflavin»	0,68 ^{b)}	orange	orange	270/5,0 379/3,3 488/0,6
C, R = CH ₃ , R' = H «Dehydro-bilumiflavin»	0,95 ^{b)} 0,23 ^{c)}			
A, R = CH ₃ , R' = H Lumiflavin	1,00 ^{b)} 0,86 ^{a)} 0,46 ^{c)} 0,42 ^{a)}	gelb	gelbgrün	266/3,3 390/2,0
8- α -(p-Chlorbenzoyl)-lumiflavin (IX)	0,42 ^{a)}	rot	rotorange	261 488
8-Methoxy-7,10-dimethyl-isoalloxazin (XI)	0,43 ^{c)}	gelb	hellgrün	
8-(β -Hydroxyäthylamino)-7,10-dimethyl-isoalloxazin (XII)	0,22 ^{c)}	orange	grün	
7,10-Dimethyl-isoalloxazin-8-carbonsäure (V)	0,09 ^{a)} 0,35 ^{c)}	gelb	gelbgrün	
7-Methylalloxazin-8-carbonsäure (VI)	0,26 ^{a)} 0,48 ^{c)}	farblos	blauweiss	
<p>a) 20-proz. HClO₄ gesätt. mit n-Butanol. b) 20-proz. HClO₄/n-Butanol/Dimethylsulfoxyd 5:3:2. c) Eisessig/n-Butanol/Wasser 2:6:2. d) Dimethylformamid/n-Butanol/Wasser 2:6:2.</p>				

Das Spektrum von C (Fig. 2) ist dem von B, wie zu erwarten, nahe verwandt; jedoch liegen die ϵ_{\max} wesentlich höher und der Abfall nach höheren Wellenlängen hin ist viel langsamer.

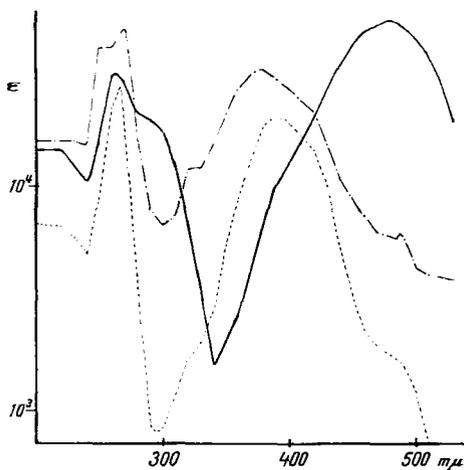
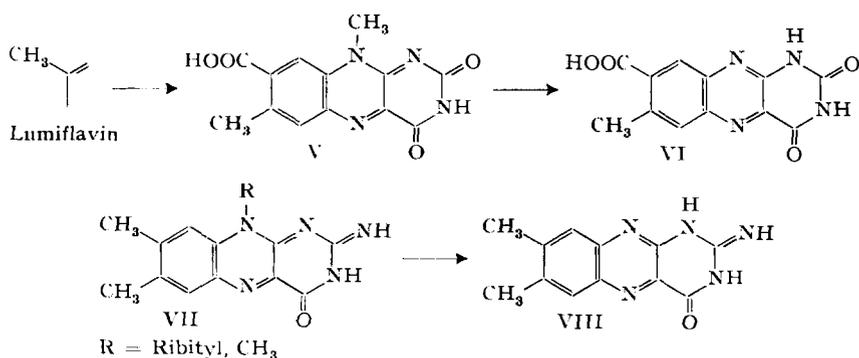


Fig. 2. Spektren verschiedener Pigmente

- Pigment B aus Riboflavin
- Pigment B' aus Riboflavin
- · - · - Pigment C aus Lumiflavin
- aufgenommen in HCOOH

Die beschriebene Dimerisierungsreaktion von 8-Methylflavinen setzt die Aktivierung der 8-Stellung des Isoalloxazins (I) im Gegensatz zu der des Alloxazins (II) voraus. In Übereinstimmung damit steht die Berechnung der Elektronenverteilung im Riboflavin durch B. & A. PULLMAN¹⁵⁾ nach der LCAO-MO-Methode. Diese Autoren finden für C-8 einen niedrigeren Wert der Elektronendichte als für C-6, C-7 und C-9.



Demzufolge war zu erwarten, dass unter geeigneten Bedingungen 8-ständiges Methyl mit elektrophilen Partnern wie aktivem Carbonyl und Nitrosyl reagieren müsse. Tatsächlich konnten wir Lumiflavin (A, R = CH₃, R' = H) in siedender

¹⁵⁾ Proc. Nat. Acad. Sci. **45**, 136 (1959).

Essigsäure mit überschüssiger HNO_2 umsetzen, wobei wir die 8-Carbonsäure V isolierten. Diese ist nicht sehr stabil: in warmer alkalischer Lösung wird sie zur 7-Methyl-alloxazin-8-carbonsäure (VI) abgebaut, analog dem von WOOD *et al.*¹⁶⁾ beschriebenen Abbau der 2-Imino-flavine VII zu 2-Iminoalloxazin (VIII).

Beim Erhitzen von V in saurer Lösung erhält man ein schwer trennbares Flavin-Alloxazin-Gemisch, welches neben den Carbonsäuren V und VI weitere (Iso)alloxazine, vermutlich die Decarboxylierungsprodukte der Säuren V und VI, enthält (vgl. Exper. Teil).

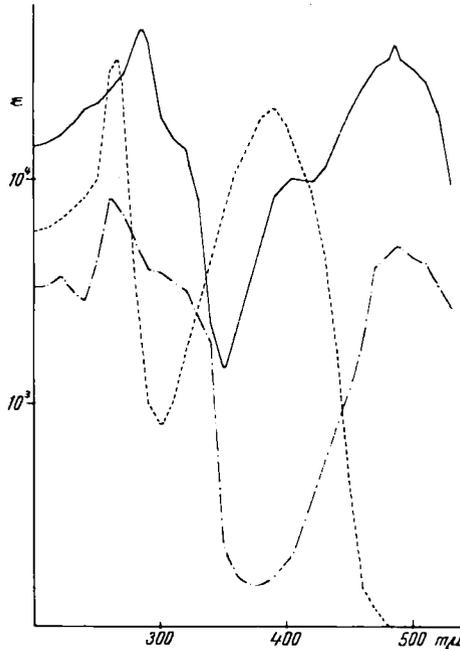


Fig. 3. Spektren verschiedener Flavinderivate in HCOOH

- IV, $\text{R} = \text{SCH}_3$, $\text{R}' = \text{H}$
 - - - Lumiflavin*)
 - · - · IX

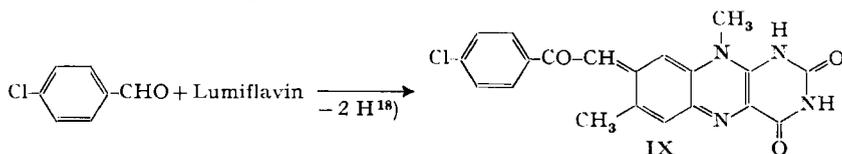
*) Übereinstimmend mit dem Spektrum von Flavin-mononucleotid in n. HCl, vgl. H. BEINERT, J. Amer. chem. Soc. **78**, 5327 (1956).

Die Labilität der N-10-Alkyl-Bindung bei 8-unsubstituierten oder elektrophil substituierten Flavinen ist eine allgemeine Erscheinung, auf welche wir in einer späteren Arbeit⁶⁾ noch näher eingehen. 8-Alkylflavine nehmen diesbezüglich eine Mittelstellung ein: ihre N-10-Alkyl-Bindung lässt sich nur noch mit Mühe spalten, so z. B. photolytisch¹⁷⁾ oder bei längerem Erhitzen mit geeigneten Katalysatoren⁶⁾. Die noch weniger elektrodefizienten 8-Aminoflavine¹⁾ zeigen keine diesbezügliche Reaktivität mehr.

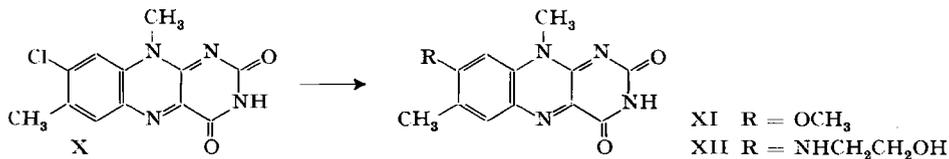
¹⁶⁾ R. M. CRESWELL, A. C. HILL & H. C. S. WOOD, J. chem. Soc. **1959**, 698.

¹⁷⁾ Vgl. z. B. S. SHIMIZU, J. Vitaminology (Japan) **1**, 39 (1955).

Einen Angriff von $\text{C}=\text{O}$ am 8-ständigen Methyl konnten wir beim Lumiflavin mit p-Chlorbenzaldehyd in konz. $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{P}_2\text{O}_5$ -Mischung bei Raumtemperatur nachweisen: Die zunächst tiefrote Lösung verfärbt sich im Laufe einiger Tage olivgrün. Nach 2 Wochen erhält man beim Aufnehmen mit Wasser ein orangerotes, schwach orange fluoreszierendes Produkt, welches organisch gebundenes Cl enthält und mit Alkali unlösliche, gelbe Salze bildet. Das Spektrum der chromatographisch reinen Verbindung ist im Bereich von 240–600 $\text{m}\mu$ mit demjenigen der roten Pigmente B' fast vollkommen identisch und entspricht somit einer benzochinoiden Struktur. Den hohen Laufwerten in neutralen Fließmitteln zufolge muss es sich jedoch um ein monomeres Flavin handeln. Auf Grund dieser Eigenschaften möchten wir vorläufig die Struktur IX vorschlagen¹⁸⁾.



Die Aktivierung der 8-Stellung im Isoalloxazin-System zeigt sich weiterhin darin, dass 8-Chlor-7,10-dimethyl-isoalloxazin (X)¹⁾ sich – wie wir fanden – durch nucleophile Reagenzien leicht in dieser Stellung substituieren lässt. So führen die Umsetzungen mit Natriummethylat bzw. Aminoäthanol zu 8-Methoxy- (XI) bzw. 8-(2'-Hydroxyäthyl-amino)-isoalloxazin (XII).



Zusammenfassend ergibt sich die Feststellung, dass im natürlichen Flavin die 8-Methylgruppe als reaktives nucleophiles Zentrum neben der N-3-Stellung zu berücksichtigen ist. Das Fehlen der 8-Methylgruppe muss daher trotz nur geringen sterischen und elektronischen Veränderungen in der Molekel von erheblicher Auswirkung auf das physiologische Verhalten sein, wie dies durch die Antimetabolit-Eigenschaften der 8-Chlorflavine¹⁹⁾ belegt wird. Die 8-Methylgruppe trägt weiterhin stark zur Stabilisierung der N-10-R-Bindung bei, d. h. bei fehlendem + I-Effekt²⁰⁾ in 8-Stellung wird das Elektronenpaar am N-10 wesentlich stärker zur Resonanz herangezogen⁶⁾.

Weiterhin ist die Frage nach der möglichen biochemischen Bedeutung der dimeren Flavinpigmente aufzuwerfen. Trotz ihrer Schwerlöslichkeit sind die «Bi-flavine» vermutlich unter geeigneten Lösungs- oder Kolloidverteilungs-Bedingungen elektromotorisch aktiv, so dass prinzipiell eine Mitwirkung solcher Partikeln bei der biologischen Wasserstoff-Übertragung möglich ist.

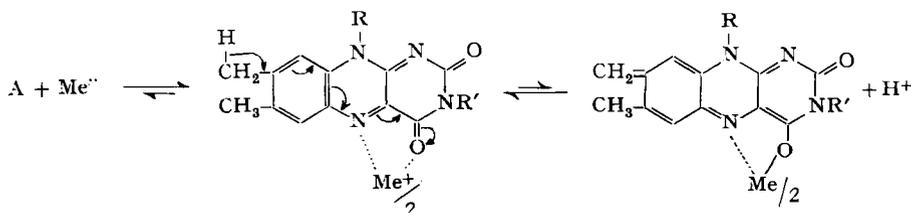
¹⁸⁾ Die dehydrierende Wirkung von $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{P}_2\text{O}_5$ -Gemisch findet sich z. B. bei der Oxazolsynthese von W. E. CASS, J. Amer. chem. Soc. **64**, 755 (1942).

¹⁹⁾ Vgl. z. B. R. KUHN, F. WEYGAND & E. F. MÖLLER, Ber. deutsch. chem. Ges. **76**, 1044 (1943).

²⁰⁾ C. K. INGOLD, Structure and Mechanism in Organic Chemistry, New York 1953, S. 247.

Eines der wichtigsten Flavoprotein-Substrate, die auch elektronisch dem Flavin nahe verwandten Pyridinnucleotide (Coenzyme I, II), sind allem Anschein nach ebenfalls zur Ausbildung von Dimeren befähigt, wie vor kurzem WALLENFELS & GELLRICH²¹⁾ in einer Studie an Modellsystemen überzeugend darlegten. Die genannten Autoren vermuten eine katalytische Wirkung von Molybdo-Flavoproteinen²²⁾ auf die Bildung von dimeren Pyridiniumsalzen *in vivo*.

Eine metallkatalysierte Dimerisierung von Flavinen *in vivo* lässt sich in gleicher Weise vermuten. Der Übergang $A \rightleftharpoons A'$ müsste dann in folgender Weise formuliert werden:



Weitere Studien sollen die Möglichkeit einer solchen Katalyse abklären.

Dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil

Zum papierchromatographischen Nachweis der Verbindungen. – Alle uns bekannten monomeren Flavine und Alloxazine lassen sich auf Papier mit Hilfe wässriger Fließmittelgemische, welche als organische Komponente Butanol, Tetrahydro-furan oder Dioxan enthalten, gut chromatographieren²³⁾. Zur Erhöhung der Löslichkeit – insbesondere bei hochpolaren Flavinen wie z. B. 8-Aminoflavinen¹⁾ – empfiehlt sich Zusatz von Dimethylformamid, Dimethylsulfoxyd oder niedermolekularen Carbonsäuren. Im Falle der letzteren wirkt die parallel laufende Veresterung des Fließmittels allerdings oft störend.

Die nachstehend beschriebenen Farbstoffe laufen in allen diesen Fließmitteln nicht, machen vielmehr das Arbeiten in stark mineralisaurem Milieu erforderlich. Am besten bewährt haben sich Gemische der Zusammensetzung 20-proz. HClO_4 mit n-Butanol gesättigt und 20-proz. HClO_4 / $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ /n-Butanol 5:2:3.

Die erhaltenen Rf-Werte sind in der Tabelle (S. 2169) zusammengestellt.

Pigmente B'. – *Pigment B' (R = CH₃, R' = H) aus Lumiflavin.* Eine Suspension von 1 g Lumiflavin (A, R = CH₃, R' = H) und 1 g K_2CO_3 in 10 ml Dimethylformamid wird in Stickstoffatmosphäre unter Rühren auf dem Ölbad erwärmt. Bei ca. 100° tritt allmählich Farbumschlag nach Tiefgrün auf. Nach 2stdg. Erhitzen auf 120–130° sind papierchromatographisch nur noch Spuren von Ausgangsmaterial nachweisbar. Die schwarzgrüne Suspension wird siedendheiss filtriert. Den Rückstand, welcher an der Luft allmählich rot wird, nimmt man in heisser 20-proz. HClO_4 auf, unter Zusatz von wenigen ml 3-proz. H_2O_2 . Nach ca. halbstündigem Digerieren auf dem Wasserbad liegt der suspendierte Festkörper in körniger, karmin- bis braunroter Form vor. Nach Filtration, Neutralwaschen mit verd. Natriumacetatlösung und Trocknung bei 100°/12 Torr erhält man 0,66 g fast reines, rotbraunes Produkt.

Aus 60-proz. heisser HClO_4 Acetone erhält man ein Perchlorat in schönen, karminroten Nadeln, welche mit 20-proz. HClO_4 , Aceton und Äther gewaschen werden. Nach 12stdg. Trocknen bei 100°/0,01 Torr sind sie stark hygroskopisch.

²¹⁾ K. WALLENFELS & M. GELLRICH, Chem. Ber. **92**, 1406 (1959).

²²⁾ Vgl. z. B. H. R. MAHLER, Adv. Enzymol. **17**, 233 (1956).

²³⁾ Die Chromatogramme werden vorzugsweise im Dunkeln entwickelt, vgl. im weiteren¹⁾, S. 1608.

Die Analysenresultate²⁴⁾ entsprechen der Zusammensetzung (Lumiflavin-H)₂·2HClO₄·2H₂O.

C₂₆H₂₈O₁₄N₈Cl₂ Ber. C 41,7 H 3,8 N 15,0 Cl 9,5 (N)CH₃ 4,0 (C)CH₃ 4,0%
 Gef. „ 41,0 „ 3,6 „ 14,4 „ 9,8 „ 4,4 „ 4,2%¹¹⁾

Wäscht man die Kristalle auf dem Filter mit 2-n. NH₄OH neutral, so nehmen sie rotbraune Farbe an. Durch 24stdg. Trocknung bei 160°/0,001 Torr lässt sich das Hydratwasser bis auf 1/4 Mol. pro Flavinkern entfernen. Die Kristalle zeigen jetzt die Zusammensetzung (Lumiflavin-H)₂·1/2 H₂O und sind trotz ihrer Wasserunlöslichkeit sehr hygroskopisch.

C₂₆H₂₂O₄N₈·1/2 H₂O Ber. C 60,16 H 4,47 N 21,55% Gef. C 60,08 H 4,01 N 21,36%

Der Farbstoff bildet unter Aufhellung noch Orange mit verd. NaOH ein unlösliches Salz. Der Farbumschlag lässt sich am besten beobachten beim Versetzen der orangegelben Lösung des Farbstoffs in Dimethylsulfoxyd mit dem gleichen Vol. Wasser (Umschlag nach Rotviolett) und dann mit 1 Tropfen 2-n. KOH (Umschlag nach Orange), vgl. Fig. 1.

Eine Probe des Farbstoffs wurde 8 Std. mit 2-n. NaOH zum Rückfluss erwärmt, wobei ein langsamer Farbumschlag nach Schwarzgrün auftritt, welcher durch Zusatz eines Tropfens Perhydrol wieder aufgehoben wird. Aus der Suspension liess sich der Farbstoff mit geringen Verlusten wieder zurückgewinnen⁹⁾ 10).

Pigment B' (R = Ribityl, R' = H) aus Riboflavin. In analogem Verfahren erhält man aus Riboflavin (A, R = Ribityl, R' = H) einen Farbstoff, der nach zweimaliger Kristallisation aus 40-proz. HClO₄ in schönen karminroten Nadeln vorliegt. Nach Neutralwaschen mit 2-n. NH₄OH und 12stdg. Trocknung bei 130°/0,01 Torr zeigt er die Zusammensetzung (Riboflavin-H)₂·1/2 H₂O.

C₃₄H₃₈O₁₂N₈·1/2 H₂O Ber. C 53,8 H 5,2 N 14,8% Gef. C 53,7 H 4,9 N 14,8%
 Löst man das Perchlorat ohne zu neutralisieren in heissem 90-proz. wässrigem Dimethylsulfoxyd und fällt aus der heissen Lösung durch Zugabe von Äthanol, so erhält man den Farbstoff mit 1 Mol. (CH₃)₂SO solvatisiert. Zur Analyse wurde bei 100°/0,01 Torr getrocknet.

C₃₄H₃₈O₁₂N₈·C₂H₆OS Ber. C 52,2 H 4,9 N 13,5% Gef. C 51,8 H 5,0 N 13,6%

Pigment B' (R = R' = CH₃) aus 3-Methylumiflavin²⁵⁾. Ausgehend von 3-Methylumiflavin (A, R = R' = CH₃) erhielten wir in analoger Weise nach Kristallisation aus 60-proz. HClO₄, wobei man zur Vervollständigung der Abscheidung in der Wärme mit dem gleichen Vol. Wasser verdünnte, nach Neutralwaschen und Trocknung wie oben den analogen Farbstoff der Zusammensetzung (Methylumiflavin-H)₂·1/2 H₂O.

C₂₈H₂₆O₄N₈·1/2 H₂O Ber. C 61,4 H 5,2% Gef. C 61,1 H 4,9%

Dieses Pigment ist gegen heisse NaOH nicht mehr beständig.

Die Pigmente B' werden in wässriger Suspension bei Zimmertemperatur durch Na₂S₂O₄ zu Semichinonen reduziert, welche in alkalischer Lösung grün, in neutraler und saurer Lösung braunrot bis orangerot vorliegen.

Redox-Verhalten der Pigmente. — 1. **Pigment B** (R = Ribityl, R' = H) aus Riboflavin. In einer heizbaren Schüttelbirne wurden 0,22 g des roten «Riboflavins» (B', R = Ribityl, R' = H) in 20 ml abs. HCOOH suspendiert und mit ca. 50 mg 10-proz. vorhydrierter Pd-Kohle bei Atmosphärendruck und 80° Luftbad-Temperatur hydriert. Die H₂-Aufnahme betrug 14,0 ml, ber. für 2 Äquiv. H₂ 14,3 ml (M = 759). Man filtrierte heiss auf einer kleinen Glasfritte, wusch mit heisser abs. HCOOH nach und dampfte das nur schwach rötlich gefärbte Filtrat im Vakuum ein. Der fast farblose Rückstand¹³⁾ wurde ca. 5 Min. mit 4-n. HCl erwärmt, wobei intensive rotviolette «Rhodoflavin»-Färbung²⁶⁾ und -Fällung auftrat. Nach dem Abkühlen versetzte man mit ca. 5 ml 3-proz. H₂O₂ und filtrierte den nunmehr hell orangegelben Niederschlag ab. Zur Reinigung löste man nochmals in warmer 6-n. HCl und fällte durch Zusatz von Wasser. Man erhielt 0,08 g feine gelbe, hygroskopische Kristallstäbchen, welche nach Trocknung bei 120°/0,01 Torr dieselbe Zusammensetzung zeigten wie das rote Ausgangsmaterial, nämlich (Riboflavin-H)₂·1/2 H₂O.

C₃₄H₃₈O₁₂N₈·1/2 H₂O Ber. C 53,8 H 5,2 N 14,8% Gef. C 53,3 H 5,2 N 14,7%

²⁴⁾ Zu den Schwierigkeiten bei der Verbrennungsanalyse der Verbindungen vgl. 1), S. 1607.

²⁵⁾ R. KUHN & H. RUDY, Ber. deutsch. chem. Ges. **67**, 1125, 1298 (1934).

²⁶⁾ Diese Färbung ist charakteristisch für die Reoxydation von Leukoflavinen in saurem Milieu, vgl. 4) ⁸⁾.

Die Kristalle sind im Gegensatz zum Ausgangsmaterial in kalter HCOOH gut löslich, ebenso in heissem Dimethylsulfoxyd und Dimethylformamid mit grünelber Fluoreszenz.

Versetzt man eine wässrige Suspension der Kristalle mit 2-n. NaOH, so tritt momentan Auflösung ein, gefolgt von der Abscheidung eines hellgelben, flockigen Niederschlages, der sich vorübergehend auflöst und beim Erwärmen nach Orangebraun umschlägt. Nach Ansäuern erhält man rotbraune Flocken, chromatographisch und spektrophotometrisch identisch mit dem Ausgangsprodukt B' (R = Ribityl, R' = H).

Mit Na₂S₂O₄ reagiert B (R = Ribityl, R' = H) in wässriger Suspension erst beim Erwärmen, unter Bildung eines ockerfarbenen Semichinons.

2. *Verbindung C (R = Ribityl, R' = H) aus Riboflavin*. 0,1 g des roten Biriboflavins (B', R = Ribityl, R' = H) wird in 5 ml 6-n. HCl gelöst, mit 0,5 ml Perhydrol versetzt und auf dem Wasserbad erwärmt²⁷⁾, bis die zunächst tiefrote Lösung sich nach gelborange aufgehellt hat. Beim Verdünnen der siedenden Lösung mit Wasser scheiden sich reichlich feine orangegelbe Kristallnadeln ab. Zur Reinigung wird die Umfällung aus 6-n. HCl unter Zusatz von 1 Tropfen Perhydrol wiederholt. Nach Auswaschen mit Wasser und Aceton und Trocknung bei 25°/12 Torr erhält man 0,07 g orangegelbe, Cl-haltige Stäbchen. Zur Analyse wurde bei 20°/0,01 Torr getrocknet.

C₃₄H₃₆O₁₂N₆, 2 HCl Ber. C 49,7 H 4,7 N 13,6% Gef. C 49,2 H 4,6 N 13,3%

Bei schärferer Trocknung (100°/0,01 Torr) des schwach hygroskopischen Dihydrochlorids bildet sich unter Rotfärbung und teilweiser Zersetzung das Ausgangsmaterial B' zurück.

Die Kristalle sind ziemlich gut löslich in HCOOH, Dimethylsulfoxyd und Dimethylformamid, die Lösungen sind orangegelb und zeigen orangegelbe Fluoreszenz. In 2-n. NaOH lösen sich die Kristalle momentan; die zunächst dunkelgelbe, klare Lösung trübt sich beim Stehen unter Abscheidung orangeroter Flocken. Sofortige Reduktion erhält man beim Behandeln der wässrigen Suspension von C mit wenig Na₂S₂O₄, wobei zunächst rotes B' (R = Ribityl, R' = H), dann olivbraunes Semichinon entsteht. Das so erhaltene B' ist spektrophotometrisch und chromatographisch mit dem Ausgangsprodukt identisch.

Die Redox-Übergänge verlaufen auch in Suspension sehr schnell.

Spektrale Eigenschaften der Pigmente. – Die Spektren der Pigmente B, B' und C wurden im Bereich von 230–600 mμ in abs. HCOOH aufgenommen²⁸⁾ und mit den Spektren von Lumiflavin (A, R = CH₃, R' = H), 8-Acetylamino-8-nor-2-desoxy-lumiflavin (IV, R = H, R' = CH₃CO), 8-Nor-8-amino-2-desoxy-2-methylmercapto-lumiflavin (IV, R = SCH₃, R' = H) sowie dem Spektrum des Kondensationsprodukts IX aus p-Chlorbenzaldehyd und Lumiflavin verglichen (siehe Fig. 2 und 3). Wir führen die Daten der gefundenen Absorptionsmaxima in der Tabelle (S. 2169) an. Das Pigment B, welches wie beschrieben leicht in B' übergeht, zeigt im Spektrum eine Schulter bei 488 mμ, welche auf Verunreinigung durch B' zurückzuführen sein kann.

Reaktionen von 8-Nor-8-chlor-lumiflavin (X)¹⁾. – 1. *8-Methoxy-7,10-dimethyl-isoalloxazin (XI)*. 0,1 g X wurden mit einer Lösung von 30 mg Na in 50 ml abs. CH₃OH 3 Std. zum Sieden erhitzt. Die zunächst klare gelbbraune Lösung dunkelt allmählich unter geringfügiger Abscheidung gelblicher Flocken, von welchen abfiltriert wurde. Das Filtrat nahm man nach Abdampfen im Vakuum mit 2-n. NaOH auf, filtrierte und goss in siedende 2-n. Essigsäure. Es scheiden sich feine orangegelbe Nadeln ab, welche chromatographisch rein sind und sich vom Ausgangsprodukt durch mehr grünliche Fluoreszenz und tiefer orangegelbe Farbe unterscheiden. Ausbeute 52 mg (53%). Zur Analyse wurde die Umfällung wiederholt. Nach Trocknung bei 100°/0,01 Torr enthielt die Verbindung noch 1/2 Mol. Wasser.

C₁₃H₁₂O₃N₄, 1/2 H₂O Ber. C 55,5 H 4,7 N 19,9 (O)CH₃ 5,3 (N)CH₃ 5,3%
Gef. „ 55,7 „ 4,4 „ 20,2 „ 4,8 „ 4,7%

2. *8-β-Hydroxyäthylamino-7,10-dimethyl-isoalloxazin (XII)*. 0,1 g X wurde mit 10 ml Äthanolamin 2 Std. unter häufigem Umschütteln auf dem Wasserbad erwärmt. Das gelbe Ausgangsmaterial geht im Laufe von 30 Min. vollständig in Lösung, es tritt dabei zunächst Verfärbung nach Rot und dann Abscheidung orangeroter Kristalle auf. Man engte im Vakuum auf ca. 2 ml

²⁷⁾ Flavine vom Typus A werden unter diesen Bedingungen nicht verändert.

²⁸⁾ Aufgenommen mit einem UNICAM-Spektrophotometer Typ SP 500.

ein, filtrierte, wusch mit verd. Essigsäure und Aceton und erhielt 58 mg (54%) chromatographisch reines Produkt, welches man zur Analyse aus 2-n. NaOH mit Eisessig umfällte. Dabei kristallisiert im Laufe mehrerer Std. bei 0° die Verbindung XII in feinen, ziegelroten Nadeln, die 12 Std. bei 160°/0,01 Torr getrocknet wurden.

$C_{14}H_{15}O_3N_5$ Ber. C 55,80 H 5,02 N 23,25% Gef. C 55,42 H 5,42 N 22,98%

Bei Versuchen zur Umsetzung von X mit Natriumacetat in Eisessig oder geschmolzenem Natriumacetat blieb das Ausgangsmaterial unverändert.

Reaktion von Lumiflavin (A, R = CH₃, R' = H) mit HNO₂. – 0,5 g Lumiflavin wurden in 50 ml Eisessig 3 Tage unter Rückfluss erhitzt, wobei man zu Anfang und nach je 8–12 Std. je 0,2 g NaNO₂ zusetzte und die Reaktion papierchromatographisch verfolgte. Schon nach 2–3 Std. zeigt das Chromatogramm im System Eisessig/n-Butanol/Wasser 2:6:2 neben dem Ausgangsmaterial einen zweiten, ebenfalls orangegelben, gelb fluoreszierenden Fleck vom ungefähr halben Rf. Die Umsetzung war nach 3 Tagen fast vollständig. Nach Einengen im Vakuum nahm man mit 2-n. HCl auf und filtrierte vom Niederschlag. Nach Auswaschen mit Wasser und Aceton erhielt man 0,41 g eines gelben Flavins, welches auf Grund seiner guten Löslichkeit in NaHCO₃ und 2-n. NH₄OH als Carbonsäure anzusprechen war. Zur Reinigung kristallisierte man das NH₄-Salz aus verd. Essigsäure-Ammoniumacetat-Lösung, wobei es sich im Laufe mehrerer Std. bei 0° in schönen, orangefarbenen Schiffchen abscheidet. Die freie Säure erhielt man durch Waschen mit 2-n. HCl zurück. Sie ist wärmeempfindlich und in Wasser äusserst schwer löslich. Nach den Analysenwerten handelt es sich um die 7,10-Dimethyl-isoalloxazin-8-carbonsäure (V).

$C_{13}H_{10}O_4N_4$ Ber. C 54,5 H 3,5 N 19,6% Gef. C 54,5 H 4,0 N 19,1%

Beim Versuch, die freie Säure aus heisser HCOOH umzukristallisieren, erhielt man ein Substanzgemisch, in welchem sich neben V die nachstehend beschriebene Alloxazincarbonsäure VI, sowie je ein weiterer gelb bzw. blauweiss fluoreszierender Fleck feststellen liess, welche vermutlich den Decarboxylierungsprodukten von V und VI, 7,10-Dimethylflavin und 7-Methylalloxazin, zuzuordnen sind.

Eine Probe von V wurde in 2-n. KOH gelöst und 1/2 Std. auf dem Wasserbad auf ca. 70° erwärmt. Die warme Lösung wurde bis zur beginnenden Ausfällung mit 2-n. HCl versetzt. Der so erhaltene, nur noch schwach gelbe Niederschlag enthält kein V mehr. Im Papierchromatogramm erhält man einen scharfen Fleck von blauweisser Fluoreszenz, die charakteristisch für Alloxazine ist. Zur Analyse wurde aus wässrigem Dimethylformamid umkristallisiert und 12 Std. bei 100°/0,01 Torr getrocknet. Die gefundenen Werte treffen auf 7-Methyl-alloxazin-8-carbonsäure (VI) zu.

$C_{12}H_8O_4N_4$ Ber. C 52,9 H 3,0 N 20,6% Gef. C 52,4 H 3,7 N 20,7%

Reaktion von Lumiflavin mit p-Chlorbenzaldehyd. – 0,2 g Lumiflavin (A, R = CH₃, R' = H) und 0,2 g p-Chlorbenzaldehyd wurden zusammen in 5 ml konz. H₂SO₄ gegeben und ca. 1 Std. geschüttelt, bis eine homogene, tiefrote Lösung entstanden war. Danach setzte man 0,5 g P₂O₅ zu und verschloss den Kolben unter N₂. Nach 2wöchigem Stehen im Dunkeln bei 20–25° war ein Farbumschlag nach Olivgrün aufgetreten. Man nahm nun den Kolbeninhalt schnell mit ca. 50 ml Eiswasser auf und filtrierte. Der karminrote Rückstand wurde mit 2-n. NaOH gut gewaschen zur Entfernung unverbrauchten Ausgangsmaterials, wobei Farbumschlag nach Orangegelb auftritt. Beim Neutralwaschen mit verd. Essigsäure bildet sich die karminrote Farbe wieder zurück. Nach Trocknung mit Aceton kristallisierte man zweimal aus abs. HCOOH/Dimethylformamid. Die so erhaltenen roten Kristallstäbchen zeigten nach 12stdg. Trocknung bei 120°/0,01 Torr annähernd die auf die Formel IX stimmenden Werte.

$C_{20}H_{15}O_3N_4Cl$ Ber. C 60,8 H 3,8 N 14,2 Cl 9,0%
Gef. „ 60,4 „ 4,5 „ 13,6 „ 7,2%

Dem mikroanalytischen Laboratorium der CIBA AKTIENGESSELLSCHAFT (Drs. H. GYSEL und W. PADOWETZ) danken wir für die Ausführung der schwierigen Mikroanalysen, insbesondere für die Gruppenbestimmungen.

Fr. H. KULL sind wir für experimentelle Mitarbeit zu Dank verpflichtet.

SUMMARY

The 8-methyl group of riboflavin and lumiflavin is shown to be activated, in agreement with B. & A. PULLMAN'S LCAO-MO-model. Chemical evidence for this is given by reactions of 8-chloro-7,10-dimethyl-flavin with nucleophilic agents, of 8-methylflavins with NO and CO groups, and by the base-catalysed dimerisation of 8-methylflavins giving rise to a new class of flavin-like pigments. The particular redox-behaviour of these "biflavins" is described and their possible biochemical importance is discussed.

Anstalt für Anorganische Chemie der Universität Basel

234. Substitution und Elimination durch Aluminiumoxyd: 3-Benzoyloxycholesten-(1) und 1-Benzoyloxy-cholesten-(2)

von Ch. Tamm und R. Albrecht

(27. VIII. 59)

Die Reduktion von Cholesten-(1)-on-(3) (I) mit LiAlH_4 verläuft praktisch stereospezifisch, indem man etwa 70% Cholesten-(1)-ol-(3 β) (II) und nur etwa 5,5% Cholestanol-(3 α) erhält¹⁾ 2) 3). Ein ähnliches Verhalten zeigt I gegenüber NaBH_4 , wo Cholestanol-(3 β) das Hauptprodukt darstellt⁴⁾. Behandlung von Cholesten-(1)-on-(3) (I) mit Al-Isopropylat führt zu einem komplexen Stoffgemisch, in welchem ebenfalls Cholesten-(1)-ol-(3 β) (II) die Hauptkomponente ist³⁾. In keinen von diesen Reaktionen hatte sich das epimere Cholesten-(1)-ol-(3 α) (VII) in fassbaren Mengen gebildet. Die Herstellung dieses noch unbekanntem Allylkohols gelang jetzt auf folgende Weise:

Wurde reines krist. 3 β -Benzoyloxy-cholesten-(1) (IV) an «neutralem» Al_2O_3 der Aktivitätsstufe I⁵⁾ nach der üblichen Durchlaufmethode⁶⁾ chromatographiert, so konnte man nur noch sehr wenig Ausgangsmaterial unverändert zurückgewinnen. Statt dessen waren mindestens drei neue krist. Produkte, nämlich Cholestadien-(1,3) (IX), 3 α -Hydroxy-cholesten-(1) (VII) und Subst. CHT 208, sowie ein schwer trennbares Kristallgemisch entstanden. Für die weitere Untersuchung dieser und der weiter unten beschriebenen analogen Reaktionen wurde die Behandlung mit Al_2O_3 standardisiert, indem eine Lösung der Benzoate in Petroläther nach der Adsorption an das Al_2O_3 noch 18 Std. bei 22° stehengelassen⁷⁾ und erst dann die Elution vor-

1) Pl. A. PLATTNER, A. FÜRST & H. ELS, *Helv.* **37**, 1399 (1954).

2) W. BERGMANN, M. KITA & D. J. GIANCOLA, *J. Amer. Chem. Soc.* **76**, 4974 (1954).

3) R. ALBRECHT & CH. TAMM, *Helv.* **40**, 2216 (1957).

4) NaBH_4 sättigt gleichzeitig die Δ^1 -Doppelbindung ab.

5) Es wurde Aluminiumoxyd (Al_2O_3) der Fa. M. WOELM, Eschwege, Deutschland, verwendet. Zur Standardisierung der Aktivitäten vgl. H. BROCKMANN & H. SCHODDER, *Ber. deutsch. Chem. Ges.* **74**, 73 (1941); G. HESSE, I. DANIEL & G. WOHLLEBEN, *Angew. Chem.* **64**, 103 (1952).

6) T. REICHSTEIN & C. W. SHOPPEE, *Disc. Farad. Soc. Nr. 7*, 305 (1949).

7) Vermutlich lassen sich durch Schütteln der Lösungen mit Al_2O_3 kürzere Reaktionszeiten erzielen.