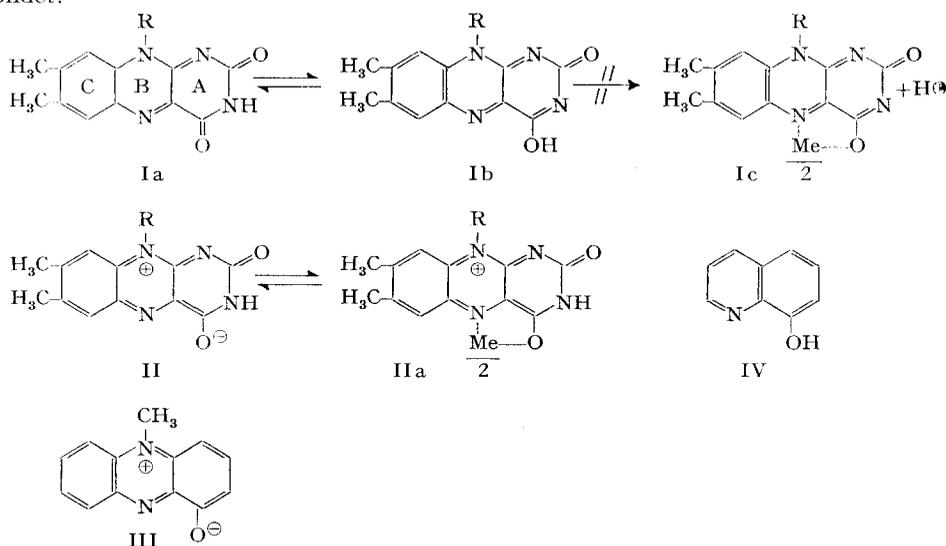


49. Studien in der Lumiflavin-Reihe VII¹⁾Zur Kenntnis der 4-Desoxyflavine
und der Struktur von Flavin-Metallchelaten

von P. Bamberg, P. Hemmerich und H. Erlenmeyer

(5. XII. 59)

In einer früheren Mitteilung²⁾ haben wir gezeigt, dass Riboflavin (Ia, R = Ribityl), das in der tautomeren Form Ib formal die Chelatgruppe des Oxins (IV) aufweist, bei pH < 8 keine stabilen Chelate vom Typus der Oxinate (Ic, Acidokomplexe) ausbildet.



Dieses Verhalten lässt zwei Deutungen zu:

1. Die Metallkomplexbildung $Ib \rightarrow Ic$ ist sterisch durch den anellierten Benzolkern stark behindert; Flavinkomplexe des Typus Ic weisen daher so geringe Stabilität auf, dass sie potentiometrisch nicht erfassbar sind. Die reale Bedeutung dieses sterischen Faktors wurde schon früher ausführlich diskutiert²⁾.

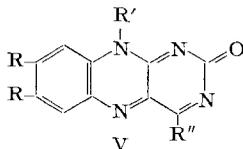
2. Der Isoalloxazin-Kern reagiert nicht in der Oxin-analogen Form Ib, sondern bildet Chelate IIa, die sich von der dem Pyocyanin (III)³⁾ verwandten Form II ableiten (reine Ion-Dipol-Komplexe) und sich acidimetrisch nicht nachweisen lassen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, anhand von Modellverbindungen zu untersuchen, ob sich Strukturen des Typus Ib überhaupt verwirklichen lassen, deren Stabilität Voraussetzung für die Chelatbildung nach $Ib \rightarrow Ic$ wäre. Wir haben die Möglichkeit zur Synthese von Isoalloxazinen (V) geprüft, die in 4-Stellung an Stelle

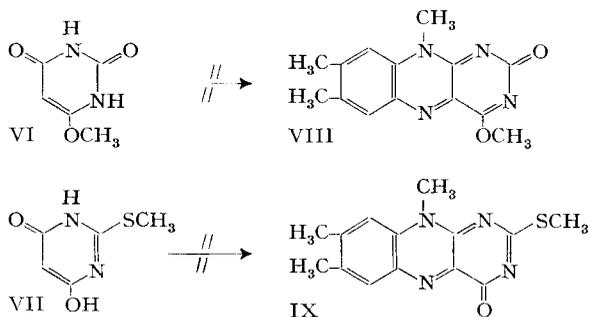
¹⁾ VI. Mitteilung: *Helv.* 43, 372 (1960).

²⁾ P. HEMMERICH & S. FALLAB, *Helv.* 41, 498 (1958).

von OH (vgl. Ib) einen stabilen, nicht tautomerisierenden Substituenten R'' aufweisen. Derart strukturierte Verbindungen, die als Desoxy-Derivate von Flavinen aufgefasst werden können, sind auch als mögliche Übergangsstufen zwischen Purinen und Flavinen biochemisch interessant.



Wir haben früher⁴⁾⁵⁾ Derivate des Lumiflavins (XX, R' = CH₃) dargestellt, die im Kern A abgewandelt waren und die sich durch Verallgemeinerung der Flavinsynthese nach TISHLER⁶⁾ (vgl. XXI → XX) erhalten liessen. In Fortführung dieser Versuche stellten wir fest, dass Barbitursäurederivate, die nicht in Triketoform reagieren können – z. B. 4-O-Methyl-barbitursäure (VI) oder S-Methyl-2-thio-barbitursäure (VII) – die TISHLER-Kondensation nicht eingehen, so dass Flavine vom Typus VIII und IX auf diesem Wege nicht erhältlich sind. Andere Beschränkungen hinsichtlich Variation der Pyrimidinkomponente weist die Flavinsynthese nach R. KUHN⁷⁾ auf (vgl. XIX → XX), was mit der Unbeständigkeit selbst einfachster Derivate des Alloxans (XIX) zusammenhängt.



Einzig das in der Literatur als Isodialursäure⁸⁾ (XIV, R = H) bekannte Oxydationsprodukt des 5-Hydroxy- bzw. 5-Amino-uracils zeigte bisher in dieser Reaktion Alloxan-ähnliches Verhalten⁹⁾. Das mit XVIIIb entstehende 4-Desoxy-lumiflavin (XVI, R' = CH₃) liess sich nicht rein erhalten. Ebenso wie das beständigere 2-Isomere, das wir früher auf anderem Wege erhielten⁵⁾, autoxydiert sich XVI, R' = CH₃ schon bei Zimmertemperatur unter Bildung von Lumiflavin (XX, R' = CH₃).

³⁾ H. HILLEMANN, Ber. deutsch. chem. Ges. 71, 34 (1938).

⁴⁾ P. HEMMERICH, S. FALLAB & H. ERLNMEYER, Hclv. 39, 1242 (1956).

⁵⁾ P. HEMMERICH & H. ERLNMEYER, Helv. 40, 180 (1957).

⁶⁾ M. TISHLER, K. PFISTER, R. D. BABSON, K. LADENBURG & A. J. FLEMING, J. Amer. chem. Soc. 69, 1487 (1947).

⁷⁾ R. KUHN & F. WEYGAND, Ber. deutsch. chem. Ges. 68, 1282 (1935).

⁸⁾ R. BEHREND & O. ROOSEN, Liebigs Ann. Chem. 257, 235 (1889).

⁹⁾ P. HEMMERICH, Helv. 41, 514 (1958).

In weiteren Versuchen erhielten wir auch bei der Kondensation von 6-Methylisodialursäure (XIV, R = CH₃)¹⁰) mit dem Aminokörper XVIII b¹¹) Lumiflavin als einzig nachweisbares Folgeprodukt. Dieser bemerkenswerte Fall der Spaltung einer C-C-Bindung durch O₂ bei Zimmertemperatur veranlasste uns zu genauerem Studium des Reaktionsverlaufs.

Einen stabilisierenden Einfluss erhofften wir vom Phenylkern als inoxydablem, resonanzfähigem, nicht tautomerisierendem Substituenten in 4-Stellung des Flavins V, R = H, R' = CH₃, R'' = C₆H₅, dessen Entstehung bei der Reaktion von N-Methylo-phenylendiamin (XVIII a) mit der noch unbekanntem 6-Phenylisodialursäure (XIV, R = C₆H₅) zu erwarten war.

Die benötigte 6-Phenylisodialursäure konnten wir über fünf Stufen, ausgehend von α -Phenylazo-benzoylessigsäure-äthylester (X, R = C₆H₅)^{12,13}) und Thioharnstoff, darstellen. Die mit Kaliumbutylat in Butanol ausgeführte Kondensation von X, R = C₆H₅ mit Thioharnstoff lieferte zunächst das 2-Thio-5-phenylazo-6-phenyl-uracil (XI, R = C₆H₅); dieses wurde sodann mit alkalischem Wasserstoffperoxyd entschweifelt zum 5-Phenylazo-6-phenyl-uracil (XII, R = C₆H₅). Die reduktive Spaltung zum Aminokörper XIII, R = C₆H₅ führten wir mit alkalischem Natriumdithionit durch. Durch Oxydation mit Brom erhielten wir schliesslich die 6-Phenylisodialursäure XIV, R = C₆H₅, als mässig wasserlösliche, gut kristallisierende, farblose Verbindung, die in ihren Eigenschaften der von R. BEHREND & H. OSTEN¹⁰) dargestellten 6-Methylisodialursäure (XIV, R = CH₃) nahe verwandt ist. So kristallisiert sie wie diese mit einem Mol Wasser und bildet mit Phenylhydrazin ein normales Hydrazon (XII a, R = C₆H₅), das durch Dehydratisierung mit Essigsäureanhydrid wieder in den Azokörper XII, R = C₆H₅ übergeführt werden kann.

Wir haben nun XIV, R = C₆H₅ in saurem Milieu mit aromatischen o-Diaminen umgesetzt, analog zu den von KÜHLING¹⁴) beschriebenen Reaktionen des Alloxans (XIX). Während das aus Isodialursäure (XIV, R = H) – wie wir fanden – mit o-Phenylendiamin (XVa) in sich bildende, sehr wenig stabile 4-Desoxyalloxazin (XXII) als Hydrat vorliegt, das durch Persäuren zu Alloxazin (XXIV) oxydiert wird, lässt sich aus 6-Phenylisodialursäure (XIV, R = C₆H₅) mit XVa 4-Phenyl-4-desoxy-alloxazin (XXIII a) erhalten, das sich als beständig erwies und unseres Wissens die erste bekannte stabile Verbindung dieser Reihe darstellt. In analoger Reaktion erhielt man XXIII b aus dem entsprechenden Diamin XVb.

Bei der Kondensation von 6-Phenylisodialursäure (XIV, R = C₆H₅) mit N-Methylo-phenylendiamin (XVIII a) in verdünnter Mineralsäure¹⁵) erhielt man vorwiegend Reduktion von 6-Phenylisodialursäure zu 6-Phenyl-5-hydroxy-uracil (XXV). Beim Arbeiten in absolut essigsäurem Milieu in Gegenwart von Borsäure nach KUHN⁷) erhielt man indessen einen tief rotbraunen, kaum luftempfindlichen Farbstoff, der sich papierchromatographisch von zwei weiteren Komponenten abtrennen liess. Sein langwelliges Abs.-Max. in Ameisensäure liegt bei 501 m μ (vgl. Fig. 2). Diese Absorp-

¹⁰) R. BEHREND & H. OSTEN, Liebigs Ann. Chem. 343, 133 (1905).

¹¹) R. KUHN & K. REINEMUND, Ber. deutsch. chem. Ges. 67, 1932 (1934).

¹²) C. BÜLOW & E. HAILER, Ber. deutsch. chem. Ges. 35, 915 (1902).

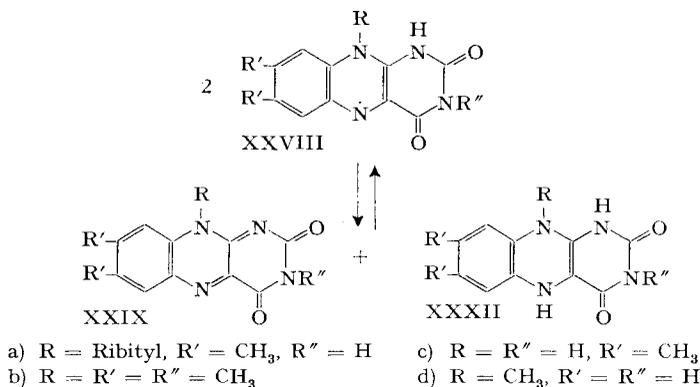
¹³) W. A. BOLHOFER, J. Amer. chem. Soc. 74, 5459 (1952).

¹⁴) O. KÜHLING, Ber. deutsch. chem. Ges. 24, 2363 (1891).

¹⁵) R. KUHN & F. WEYGAND, Ber. deutsch. chem. Ges. 67, 1409 (1934).

tion ist charakteristisch für die gewöhnlich nur unter Luftausschluss in saurer Lösung beständigen Rhodoflavinsemichinone (XXVIII).

Physikalische Daten von Rhodoflavin-semichinonen geben erstmals KUHN & WAGNER-JAUREGG¹⁶⁾ an, die das langwellige Abs.-Max. von Rhodoriboflavin-semichinon (XXVIIIa) in 10-proz. HCl bei 490 m μ fanden. MERKEL & NICKERSON¹⁷⁾ fanden 480 m μ für Rhodoriboflavin-semichinon. Die Messungen werden dadurch erschwert, dass die autoxydable Rhodoflavin-semichinon-Lösung wechselnde Mengen des entsprechenden Flavochinons (XXIX) enthält; neben der Autoxydation muss auch eine mögliche Disproportionierung in Rechnung gestellt werden (vgl. XXVIII \rightarrow XXIX und XXXII). Hierdurch wird das langwellige Maximum der Rhodo-Form scheinbar gegen kürzere Wellenlängen verschoben. BEINERT¹⁸⁾ hat in seinen Messungen erstmals Korrekturen für diesen Unsicherheitsfaktor eingeführt und kommt auf 503 m μ für das Abs.-Max. des reinen Rhodoflavin-mononucleotid-semichinons in ca. 1N HCl.



Wir fanden, dass bei der Verwendung von SnCl₂ als Redox-Puffer Rhodo-(iso)-alloxazin-semichinone in Ameisensäure oder 1 N HCl soweit stabilisiert werden, dass der von BEINERT angegebene Wert von 503 m μ in vielen Fällen direkt gemessen werden kann. Die langwellige Bande der (Iso)alloxazin-chinone im Bereich 360-420 m μ verschwindet in diesen Fällen vollständig (vgl. Fig. 2). Das reine Rhodoflavin-Spektrum stellt sich vermutlich als eine Überlagerung des Leukoflavin-spektrums¹⁹⁾ ¹⁾ und der Absorption des Radikalelektrons dar. Wir erhielten 503 m μ für 3-Methyl-rhodolumiflavin-semichinon¹⁾ (XXVIIIb) und 504 m μ für Rhodolumichrom-semichinon (XXVIIIc). Das langwellige Abs.-Max. der Rhodo-semichinon-Form ist also invariant gegen Substitution des (Iso)alloxazinkerns in 3- und 10-Stellung. Hingegen ist die Lage der langwelligen Bande abhängig von Substituenten in allen übrigen Stellungen des Kerns. So verschiebt der Wegfall der 7- und 8-ständigen Methylgruppen (XXVIIId) die Absorption um ca. 30 m μ nach kürzeren Wellenlängen: für das Rhodo-semichinon des 10-Methylflavins (XXVIIId) fanden wir 450 m μ , korr. ¹⁸⁾ ca. 470 m μ . Die Phenylgruppe im 4-Desoxy-4-phenyl-alloxazin-semichinon (XXX) erhöht diesen Wert wieder auf 480 m μ , korr. ca. 490 m μ (Fig. 2).

¹⁶⁾ R. KUHN & T. WAGNER-JAUREGG, Ber. deutsch. chem. Ges. 67, 361 (1934).

¹⁷⁾ J. R. MERKEL & W. J. NICKERSON, Biochim. Biophys. Acta 14, 303 (1954).

¹⁸⁾ H. BEINERT, J. Amer. chem. Soc. 78, 5323 (1956).

¹⁹⁾ BEINERT (vgl. ¹⁸⁾) gibt für 75-proz. reduziertes FMN in 1N HCl Abs.-Max. bei 255 m μ , 320 m μ , 480 m μ . Wir fanden (vgl. ¹⁾) für verschiedene stabilisierte, reine Leuko-(iso)alloxazine je 2 Abs.-Max. im Bereich von 255 m μ und 320 m μ in Ameisensäure.

Bemerkenswert war, dass das Rhodo-semichinon des 4-Desoxy-4-phenyl-alloxazins (XXX), ebenso wie die 7,8-Dimethyl-(iso)alloxazin-semichinone, unter den erwähnten Bedingungen (Ameisensäure, SnCl_2) längere Zeit unverändert haltbar war, im Gegensatz zu 7,8-ständig unsubstituierten Homologen, wie z. B. 10-Methyl-rhodoflavin-semichinon, das unter gleichen Umständen nach ca. 3 Std. unter Autoxydation bzw. Disproportionierung ($\text{XXVIII d} \rightarrow \text{XXIX d} + \text{XXXII d}$) wieder in die Chinonform XXIXd übergegangen war. Die Stabilität der Radikalstufe ist offenbar stark

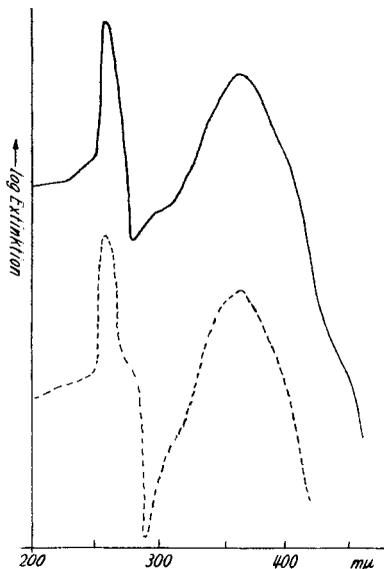


Fig. 1. UV.-Spektrum von 10-Methylflavin (XX, $R' = \text{H}$) in Ameisensäure

— aus XVIIIa + XIV, $R = \text{C}_6\text{H}_5 \rightarrow \text{XXVI}$, + H_2O_2

----- authentische Vergleichssubstanz, um 10^1 nach unten verschoben

von der Substitution abhängig, und dies nicht im gleichen Sinne wie das Flavin-Redoxpotential²⁰). Weitere Studien sind zur Aufklärung notwendig.

Auf Grund dieser Befunde möchten wir den besprochenen roten Farbstoff aus N-Methyl-o-phenylendiamin (XVIIIa) und 6-Phenylisodialursäure (XIV, $R = \text{C}_6\text{H}_5$) für 4-Phenyl-4-desoxy-rhodoflavin (XXVI) ansehen, dessen auffallende Stabilität gegen O_2 durch den resonanz-stabilisierenden und sterisch abschirmenden Einfluss der Phenylgruppe zu erklären wäre.

Die beschriebene essigsäure Lösung des Rhodo-semichinons XXVI haben wir nun auf 80° erwärmt und tropfenweise mit H_2O_2 versetzt bis zum Verschwinden der Rotfärbung. Die papierchromatographische Auftrennung des entstandenen Gemisches ergab wiederum drei Komponenten, wovon die am langsamsten laufende in ihrem Rf-Wert mit 10-Methylflavin (XX, $R' = \text{H}$) identisch war, was durch spektrophotometrischen Vergleich mit authentischem Material bestätigt wurde (vgl. Fig. 1). Die schneller laufenden Komponenten, deren Rf-Werte durch H_2O_2 nicht verändert wurden, (vgl. Tab. der Rf-Werte) liessen sich nicht unzersetzt eluieren, d. h. die

²⁰) R. KUHN & P. BOULANGER, Ber. deutsch. chem. Ges. 69, 1557 (1936).

rechromographierten Eluate waren nicht einheitlich. Möglicherweise lässt sich einer dieser gegen Hydrolyse und Wärme sehr wenig beständigen Komponenten die Struktur des gesuchten Flavochinons XXXI zuordnen.

Die Abspaltung der Phenylgruppe entspricht der CRIEGEE-Umlagerung eines intermediären Hydroperoxyds (XXVII)²¹⁾²²⁾²³⁾, so dass wir für den Mechanismus von Bildung und Zerfall der 4-Desoxyflavine die folgende Formulierung vorschlagen möchten:

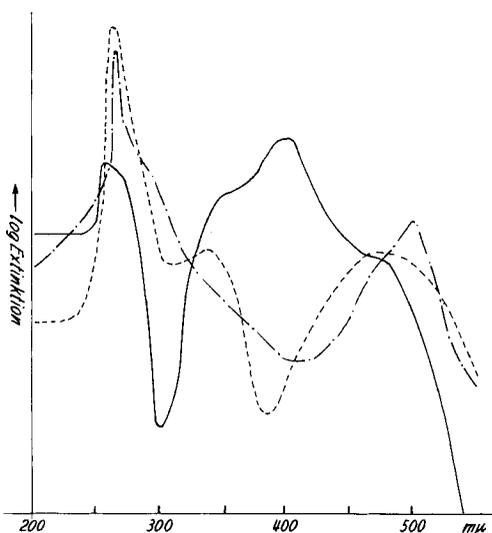
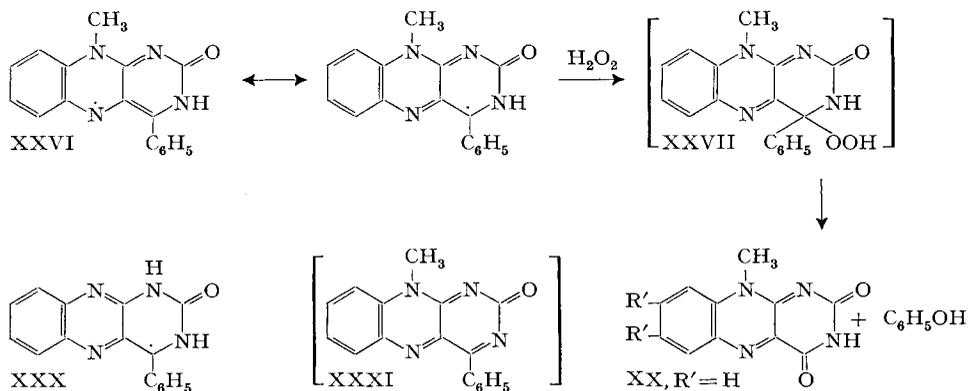


Fig. 2. UV.-Spektrien in Ameisensäure

- 4-Desoxy-4-phenyl-alloxazin-semichinon (XXX)
- 4-Desoxy-4-phenyl-flavin-semichinon (XXVI)
- 4-Desoxy-4-phenyl-alloxazin (XXIII a)

²¹⁾ R. CRIEGEE, Liebigs Ann. Chem. 560, 127 (1948).

²²⁾ H. WIELAND & J. MAIER, Ber. deutsch. chem. Ges. 64, 1205 (1931).

²³⁾ M. S. KHARASCH, A. FONO & W. NUDENBERG, J. org. Chemistry 15, 748 (1950).

Rf-Werte

Verbindung	Nr.	Rf-Wert	Farbe	Fluoreszenz
Reaktionsprodukte aus XVIIIa + XIV, R = C ₆ H ₅	1	0,16 ^e	rot	orangerot
	2	0,66 ^e	gelb	blaugrün
	3	0,88 ^e	gelb	blaugrün
Desgleichen nach Behandlung mit H ₂ O ₂	1 a	0,37 ^a 0,33 ^b 0,38 ^c 0,24 ^d	gelb	gelbgrün
	2 a	0,69 ^e	gelb	blaugrün
	3 a	0,90 ^e	gelb	blaugrün
10-Methylflavin	XX, R' = H	0,37 ^a 0,33 ^b 0,38 ^c 0,24 ^d	gelb	gelbgrün
Lumiflavin	XX, R' = CH ₃	0,45 ^a 0,42 ^b 0,49 ^c 0,23 ^e	gelb	gelbgrün
Alloxazin	XXIV	0,62 ^c 0,58 ^d	gelb	blauweiss
4-Phenyl-4-desoxy-alloxazin	XXIIIa	0,87 ^c 0,90 ^d	gelb	blauweiss
4-Phenyl-4-desoxy-7,8-dichlor- alloxazin	XXIIIb	0,74 ^c	gelb	blauweiss

Fließmittelgemische:

- a) Butanol/Dimethylformamid/Wasser 6:2:2 c) Butanol/Eisessig/Wasser 6:2:2
 b) Butanol/Dimethylformamid/2N NH₃ 6:2:2 d) Butanol/Wasser/Ameisensäure 77:13:10
 e) Butanol mit 2N HCl gesättigt

Bemerkenswert ist, dass diese Reaktionen schon bei Raumtemperatur mit messbarer Geschwindigkeit ablaufen.

Daraus ist zu folgern, dass Flavine des Typus V mit streng einwertigem Substituenten R'' in der Chinonform V ganz allgemein unbeständig sind und oxydativ unter Bildung der entsprechenden 4-Oxokörper (z. B. Ia) stabilisiert werden, wobei dies auch für solche Substituenten R'' gilt, die selbst inert und resonanzfähig sind, z. B. Phenyl.

Dieses Verhalten einwertiger Substituenten in 4-Stellung des Isoalloxazin-Kerns erklärt die Instabilität von Acidokomplexen des Typus Ic, so dass für Flavochinon-Metallchelate bei pH < 8 ausschliesslich die Struktur IIa zu diskutieren ist. Weitere Studien zur quantitativen Erfassung solcher Chelate sind im Gange.

Dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil

Zur Papierchromatographie: Papier WHATMAN Nr. 1, Laufzeit 15 Std., aufsteigend, $t = 20 \pm 2^\circ$. Als chromatographisch rein wurden Substanzen angesehen, die im sichtbaren und im UV.-Licht nur einen einheitlich absorbierenden Fleck zeigten. Als chromatographisch identisch wurden Substanzen gleicher Farbe und Fluoreszenz betrachtet, bei gleichem Rf-Wert in mindestens 3 verschiedenen Fließmittelgemischen (Fehlergrenze $\pm 0,005$).

*Zur Spektrophotometrie*²⁴⁾: Für alle Messungen wurde – falls nicht anders vermerkt – abs. Ameisensäure als Lösungsmittel verwendet.

Zur Reinigung chromatographierte man die Versuchslösung unter Verwendung von Butanol/Wasser/Ameisensäure 77:13:10 als Fließmittelgemisch. Aus dem feuchten Chromatogramm

²⁴⁾ Die Spektren wurden mit einem Gerät «UNICAM SP 500» aufgenommen.

wurden die einzelnen Komponenten gegebenenfalls zur spektrophotometrischen Untersuchung mit abs. Ameisensäure eluiert.

Zur Messung der Rhodo-(iso)alloxazin-Spektren (vgl. Fig. 2) wurden die entsprechenden (Iso)alloxazine in einem Gemisch von 90% Ameisensäure und 10% einer 0,1N wässrigen SnCl_2 -Lösung zu den Semichinonen reduziert, wobei man gegebenenfalls bis zur beginnenden Rotfärbung der Lösung kurz auf dem Wasserbad erwärmte.

2-Thio-5-phenylazo-6-phenyl-uracil (XI, $R = C_6H_5$). Zu einer Suspension von 24 g α -Phenylazo-benzoylessigsäure-äthylester (X, $R = C_6H_5$)¹³ und 6,85 g Thioharnstoff in 25 ml trockenem Butanol liess man bei Raumtemperatur während 1 Std. eine Kaliumbutylat-Lösung (3,8 g Kalium in 100 ml Butanol) tropfen. Man kochte die tiefrote Lösung 10 Std. unter Rückfluss und engte im Vakuum ein. Der rote Rückstand wurde direkt weiterverarbeitet.

Zur Analyse wurden 200 mg des Kaliumsalzes in 5 ml Eisessig mit 0,2 ml konz. HCl versetzt. Die Lösung wurde im Vakuum zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 6 ml CHCl_3 /Äthanol-(3:1) gelöst. Man schüttelte dreimal mit Wasser aus, trocknete und dampfte ein. Der Rückstand, chromatographisch reines XI, $R = C_6H_5$, wurde aus Äthanol umkristallisiert: orangefelbe Nadeln, Smp. 215–217° (Zers.).

$C_{16}H_{12}ON_4S$ Ber. C 62,33 H 3,92 N 18,18% Gef. C 62,57 H 4,18 N 18,34%

5-Phenylazo-6-phenyl-uracil (XII, $R = C_6H_5$). Das aus 24 g X, $R = C_6H_5$ erhaltene Kaliumsalz von XI, $R = C_6H_5$ wurde in 100 ml 2N NaOH gelöst und unter Rühren und Eiskühlung langsam mit 50 ml Perhydrol versetzt: langsamer Farbumschlag von Rot nach Gelb. Die Temperatur soll nicht über 40° steigen. Nach 2–3 Std. Rühren bei 30° hatte sich das schwerlösliche Natriumsalz von XII, $R = C_6H_5$ abgeschieden. Man neutralisierte auf Kongo mit 6N HCl unter Kühlen, filtrierte ab und wusch mit 2N HCl und Wasser. Man erhielt 15 g XII, $R = C_6H_5$ (63,5% bezogen auf X, $R = C_6H_5$). Zur Analyse wurde zweimal aus Äthanol umkristallisiert: gelbe Nadelbüschel, Smp. 218–225° (Zers.).

$C_{16}H_{12}O_2N_4$ Ber. C 65,75 H 4,14 O 10,95% Gef. C 65,50 H 4,04 O 11,07%

5-Amino-6-phenyl-uracil (XIII, $R = C_6H_5$). Eine Suspension von 1 g 5-Phenylazo-6-phenyluracil (XII, $R = C_6H_5$) in 20 ml 2N NaOH wurde unter Rühren auf 70° erwärmt. Dann setzte man im Laufe 1 Std. 10 g Natriumdithionit zu und rührte 1 weitere Std. bei 70°. Um das Natriumsalz von XIII, $R = C_6H_5$ zu hydrolysieren, stellte man mit konz. HCl kongosauer und neutralisierte dann mit NaHCO_3 . Nach 12-stdg. Stehen bei 0° fielen 0,67 g XIII, $R = C_6H_5$ (96,5%) in gelben Kristallen aus. Zur Analyse wurde zweimal aus Äthanol umkristallisiert: schwach gelbliche Blättchen, Smp. 235–240° (Zers.).

$C_{10}H_9O_2N_3$ Ber. C 59,10 H 4,46 O 15,75% Gef. C 59,07 H 4,81 O 15,53%

2-Thio-5-amino-6-phenyl-uracil. 1 g 2-Thio-5-phenylazo-6-phenyl-uracil wurde nach obiger Vorschrift für XIII, $R = C_6H_5$ umgesetzt. Man erhielt in fast quantitativer Ausbeute 0,7 g 2-Thio-5-amino-6-phenyl-uracil. Zur Analyse kristallisierte man zweimal aus Äthanol um: gelbe Stäbchen, beginnende Zers. 243°.

$C_{10}H_9ON_3S$ Ber. C 54,77 H 4,14 S 14,61% Gef. C 54,89 H 4,12 S 14,41%

6-Phenyl-isodialursäure (5,5,6-Trihydroxy-6-phenyl-5,6-dihydro-uracil) (XIV, $R = C_6H_5$) Eine Suspension von 1 g 5-Amino-6-phenyl-uracil (XIII, $R = C_6H_5$) in 10 ml Wasser wurde unter Rühren bei Raumtemperatur tropfenweise mit ca. 200 ml 3,5-proz. Bromwasser versetzt, bis die rotbraune Färbung bestehen blieb. Nach Filtration von einem geringen Rückstand engte man im Vakuum bis zur beginnenden Kristallisation ein. Nach 2-stdg. Stehen bei 0° filtrierte man und kristallisierte aus Wasser unter Zusatz von Aktivkohle um. Man erhielt 735 mg (59,3%) XIV, $R = C_6H_5$ in farblosen Kristallstäbchen. Zur Analyse wurde aus Äthanol umkristallisiert, Smp. 120–122°. Das bei 20°/0,01 Torr 20 Std. getrocknete Produkt enthielt 2 Mol. H_2O :

$C_{10}H_8O_4N_2 \cdot 2H_2O$ Ber. C 46,87 H 4,72 N 10,94% Gef. C 46,75 H 5,05 N 11,36%

Nach 20 Std. bei 70°/0,01 Torr verblieb nur noch $\frac{1}{2}$ Mol. H_2O :

$C_{10}H_8O_4N_2 \cdot \frac{1}{2}H_2O$ Ber. C 52,39 H 3,93 N 12,21% Gef. C 52,17 H 4,03 N 12,28%

6-Phenyl-isodialursäure-5-phenylhydrazon (XIIa, $R = C_6H_5$). Eine Lösung von 50 mg Phenylhydrazin-hydrochlorid in 5 ml Wasser wurde mit konz. HCl auf pH 3 gestellt. Man setzte 100 mg 6-Phenyl-isodialursäure (XIV, $R = C_6H_5$) zu und erwärmte 1 Std. auf 60°; hierbei fielen

hellrote Nadeln aus, die filtriert und mit heissem Wasser gut gewaschen wurden. Nach einmaligem Umkristallisieren aus Äthanol war das Produkt analysenrein; Smp. 165–172°, Ausbeute 50 mg (41,8%).

$C_{16}H_{14}O_3N_4$ Ber. C 61,93 H 4,55 N 18,05% Gef. C 62,10 H 4,61 N 17,96%

50 mg XII a, R = C_6H_5 wurden in 5 ml Essigsäureanhydrid $\frac{1}{2}$ Std. unter Rückfluss gekocht. Man dampfte im Vakuum zur Trockne ein und kristallisierte den roten Rückstand aus Äthanol. Es wurden 35 mg eines orangeroten, nadeligen Produkts erhalten, das 1 Mol H_2O weniger enthielt als das Ausgangsprodukt; es erwies sich als papierchromatographisch identisch mit XII, R = C_6H_5 . Beginnende Zersetzung bei 218°.

$C_{16}H_{12}O_2N_4$ Ber. C 65,75 H 4,14 N 19,17% Gef. C 65,93 H 4,15 N 19,43%

Versuch zur Synthese von 4-Methyl-4-desoxy-lumiflavin (XVII, R' = CH_3). 1,9 g des Azokörpers XVIII d⁴) wurden in 40 ml Eisessig bei Raumtemperatur unter Normdruck mit Pd-Kohle-Katalysator zu XVIII b hydriert (Ber. H_2 -Aufnahme 330 ml, gef. 320 ml). Man filtrierte anschliessend direkt zu 0,9 g 6-Methyl-isodialursäure (XIV, R = CH_3)¹⁰) und 0,1 g H_3BO_3 und schüttelte 24 Std. bei Raumtemperatur unter N_2 . Das Reaktionsgemisch färbte sich tiefgrün. Der erhaltene Farbstoff wurde mit abs. Isopropyläther in 3 Fraktionen gefällt, die alle chromatographisch uneinheitlich sowie luft- und wärmeempfindlich waren. Nach längerem Stehenlassen an der Luft oder bei kurzem Erwärmen unter Zusatz weniger Tropfen Perhydrofl erhielt man aus allen drei Fraktionen neben Verharzungsprodukten Lumiflavin (XX, R' = CH_3), das chromatographisch in 3 verschiedenen Fließmittelgemischen identifiziert wurde (vgl. Tabelle der Rf-Werte).

4-Desoxy-alloxazin (XXII). 0,7 g o-Phenylendiamin (XVa), 1,1 g Isodialursäure (XIV, R = H)⁸) und 0,1 g H_3BO_3 wurden in 10 ml Eisessig 15 Std. bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach 1-stdg. Stehen bei 0° wurde vom entstandenen hellbräunlichen Niederschlag filtriert. Nach Trocknung bei 100°/0,01 Torr Rohausbeute 0,5 g (36,6%).

$C_{10}H_6ON_4 \cdot 1 H_2O$ Ber. C 55,6 H 3,7 N 25,9% Gef. C 55,0 H 3,8 N 25,4%

Das Produkt ist, wie alle Alloxazine, in neutralen Mitteln gänzlich unlöslich und liess sich infolge seiner Empfindlichkeit nicht weiter reinigen. Es bildet mit verdünnten Alkalien gelbe, mässig wasserlösliche Salze, die sich beim Erwärmen unter Auftreten einer charakteristischen, tiefen Grünfärbung zersetzen. Auch mit konz. HCl erhält man eine tiefgrüne Lösung, aus der sich beim Verdünnen mit Wasser rote Flocken abscheiden. Im Chromatogramm läuft XXII infolge Zersetzung nicht einheitlich, enthält jedoch kein Alloxazin (XXIV). Dieses entsteht erst bei Behandlung des Desoxy-Körpers mit H_2O_2 in HCOOH in der-Wärme und-wurde durch-Vergleich mit authentischem Material in 2 verschiedenen Fließmittelgemischen papierchromatographisch identifiziert (vgl. Tabelle der Rf-Werte).

4-Phenyl-4-desoxy-alloxazine (XXIII a, b). 1 g 6-Phenyl-isodialursäure (XIV, R = C_6H_5) (3,9 mMol) wurde in 10 ml Eisessig gelöst und die äquimolare Menge des entsprechenden aromatischen o-Diamino-Körpers (XVa, b) zugegeben. Man versetzte mit 30 mg H_3BO_3 und erwärmte $\frac{1}{2}$ Std. auf dem Dampfbad. Nach Abkühlen auf 20° filtrierte man vom grünstichig-gelben Niederschlag und fällte aus NaOH/Eisessig unter Zusatz von wenig Aktivkohle um. Die 4-Phenyl-4-desoxy-alloxazine bilden sehr stabile Solvate und halten bei der Trocknung bei 100°/0,01 Torr teilweise noch Lösungsmittel zurück.

4-Desoxy-4-phenyl-alloxazin (XXIII a) aus XIV, R = C_6H_5 und XVa: 0,6 g (54,7%) gelblich-grüne Kristallnadeln.

$C_{16}H_{10}ON_4$ Ber. C 70,06 H 3,68 N 20,43% Gef. C 69,72 H 3,82 N 20,51%

4-Desoxy-4-phenyl-7,8-dichlor-alloxazin (XXIII b) aus XIV, R = C_6H_5 und XVb²⁵): 0,4 g (29,4%) grünelbe Nadeln.

$C_{16}H_8ON_4Cl_2 \cdot \frac{1}{2} H_2O$ Ber. C 54,7 H 2,3 Cl 20,1% Gef. C 54,6 H 2,3 Cl 20,2%

Die 4-Phenyl-4-desoxy-alloxazine waren chromatographisch einheitlich (vgl. Tabelle der Rf-Werte) und zeigten in essigsaurer Lösung im UV.-Licht die für Alloxazine typische, hellviolettblaue Fluoreszenz. In NaOH-Lösung erhielt man die typischen gelben, aus warmem Wasser in Nadeln kristallisierenden Na-Salze.

²⁵ D. W. WOOLLEY, J. exp. Medicine 93, 13 (1951).

*Reaktion von N-Methyl-o-phenylendiamin*²⁶⁾ (XVIIIa) mit 6-Phenylisodialursäure (XIV, R=C₆H₅). – a) In 2N HCl: 1 g N-Methyl-2-nitranilin²⁶⁾ wurde in 10 ml 2N HCl gelöst und mit 10-proz. Pd-Kohle bei Normaldruck und Raumtemperatur zum Aminokörper XVIIIa hydriert (H₂-Aufnahme ber. 489 ml, gef. 490 ml). Man filtrierte vom Katalysator direkt zu 1,8 g vorgelegter 6-Phenyl-isodialursäure. Es wurde 1 Std. unter Rückfluss gekocht, wobei ein farbloses Produkt ausfiel, während sich die Lösung rot färbte. Nach dem Abkühlen wurde vom entstandenen 5-Hydroxy-6-phenyl-uracil (XXV) filtriert. Zur Analyse fällt man aus 2N NH₃/2N HCl unter Zusatz von Aktivkohle um. Ausbeute: 1,2 g (82,5%).

C₁₀H₈O₃N₂ Ber. C 58,7 H 3,9 N 13,7% Gef. C 58,8 H 3,9 N 14,1%

b) In Eisessig: Man wiederholte den oben beschriebenen Ansatz, wobei als Lösungsmittel 20 ml Eisessig mit einem Zusatz von 30 mg H₃BO₃ verwendet wurde. Man schüttelte 20 Std. bei Raumtemperatur unter N₂ und erwärmte anschliessend 1/2 Std. auf dem Dampfbad. Nach 10-stdg. Stehen der rotbraunen Reaktionslösung bei 0° filtrierte man von 20 mg 5-Hydroxy-6-phenyl-uracil (XXV). Die chromatographische Auftrennung des Filtrats zeigte eine rote und zwei gelbe Komponenten (1, 2 und 3, vgl. Tabelle der Rf-Werte). Die rote Komponente (1) liess sich mit HCOOH unzersetzt eluieren und zeigte das typische UV.-Spektrum eines Rhodoflavins (vgl. Fig. 2, XXVI).

Versetzte man die rote Reaktionslösung bei 80° mit wenigen Tropfen Perhydrol, so trat Farbumschlag nach Gelb ein. Die gelbe Lösung wies bei der papierchromatographischen Auftrennung 3 Komponenten auf (1a, 2a und 3a, vgl. Tabelle der Rf-Werte), wovon die mit dem kleinsten Rf-Wert in 4 verschiedenen Fließmittelgemischen in Farbe, Fluoreszenz, Rf-Wert und UV.-Spektrum (vgl. Fig. 1 und Tabelle der Rf-Werte) mit 10-Methylflavin (XX, R' = H) identisch war.

Die Mikroanalysen verdanken wir dem Mikroanalytischen Laboratorium der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel (Drs. H. GYSEL und W. PADOWETZ). Herrn Dr. B. PRIJS danken wir für die Mithilfe bei der Abfassung des Manuskripts.

SUMMARY

The general instability of desoxy-isoalloxazines has been confirmed by studying the formation and decomposition of 4-phenyl-4-desoxy-isoalloxazines and -alloxazines. It has been shown, that the former (4-desoxy-flavins) may be synthesized in the semiquinonoid radical state. These radicals react with O₂ or H₂O₂ with fission of the 4-substituents to give the analogous 4-oxo-compounds by a hydroperoxide rearrangement. In view of this instability, the oxinate like structure of flavin metal chelates may be excluded.

Anstalt für Anorganische Chemie der Universität Basel

²⁶⁾ E. H. USHERWOOD & M. A. WHITELEY, J. chem. Soc. 723, 1084 (1923).