

## 150. Spektren und Strukturen der am Flavin-Redoxsystem beteiligten Partikeln

Studien in der Flavinreihe IX [1]<sup>1)</sup>

von K. H. Dudley<sup>2)</sup>, A. Ehrenberg<sup>3)</sup>, P. Hemmerich<sup>4)</sup> und F. Müller<sup>5)</sup>

(S. V. 64)

In einer parallel laufenden Mitteilungsreihe [2] [3] berichten wir über Studien zur Wechselwirkung des Flavin-(Isoalloxazin-) Kerns<sup>6)</sup> mit *d*-Metallionen. Unseren Resultaten zufolge können viele spektrale Eigenschaften nativer Metallflavoproteine der mitochondrialen Atmungskette durch die spezifische Metallaffinität des Flavosemichinon-Radikals<sup>6)</sup> [4] erklärt werden. Zur Ermöglichung eindeutiger Zuordnung der Spektren, welche bei der Reaktion einerseits des Flavochinons<sup>6)</sup> mit Donor-Metallionen [5], andererseits des Flavosemichinons<sup>6)</sup> mit redox-inaktiven Metallionen [2] [3] [6] erhalten werden, erscheint es nötig, die Spektren des metallfreien Systems in all seinen Varianten noch eingehender zu studieren. Über Lichtabsorptionsspektren liegen bisher hierzu fast nur Untersuchungen an den Flavocoenzymen selbst vor, und zwar aus den Arbeitskreisen von BEINERT [7] einerseits und MASSEY *et al.* [8] andererseits, sowie eine Studie von HARBURY *et al.* [9] an einfachen Modellen und MO-theoretische Studien [10] [11]. Wir haben diese Studien ausgedehnt auf Modellsubstanzen, deren Lösungen nach Möglichkeit nur eine der im amphoteren Flavin-Redoxsystem (vgl. Reaktionsschema 1) auftretenden Strukturen bei geeignetem pH und Redoxpotential enthalten. Unsere Beobachtungen bestätigen grösstenteils die von den früheren Autoren angegebenen Zuordnungen und ergeben darüber hinaus zahlreiche weitere Aussagen über die Struktur der beteiligten Flavin-Partikeln, welche auch die theoretischen Voraussagen relativ gut erfüllen.

Die Untersuchung dieser Strukturen stellt einen Beitrag zur Erforschung folgender molekular-biologischer Probleme dar:

- 1) Coenzym-Apoenzym Fixierung in Flavoproteinen;
- 2) mögliche Beteiligung «energiereicher» Flavinformen bei der oxydativen Phosphorylierung;

<sup>1)</sup> Die Zahlen in eckigen Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis, S. 1382.

<sup>2)</sup> National Science Foundation Postdoctoral Fellow No. 43 065.

<sup>3)</sup> Medicinska Nobelinstitutet, Biokemiska Avdelningen, Karolinska Institutet, Stockholm 60, Schweden.

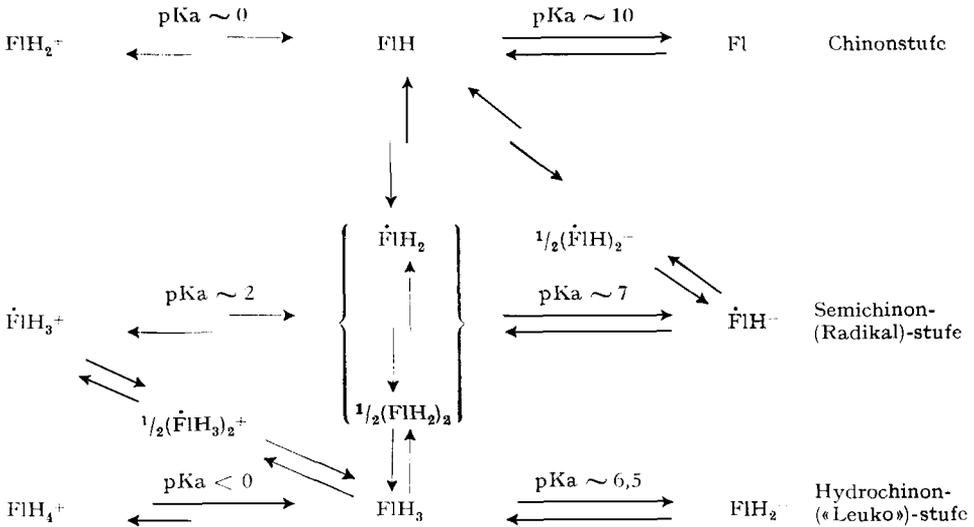
<sup>4)</sup> Institut für anorganische Chemie der Universität Basel.

<sup>5)</sup> Teile dieser Arbeit sind der Diss. F. MÜLLER, Basel 1964, entnommen.

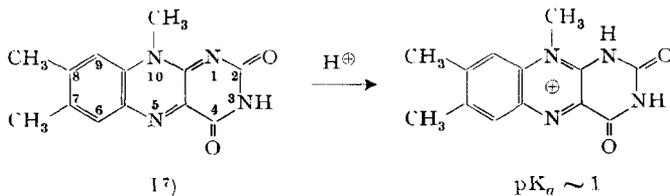
<sup>6)</sup> Bezeichnungen: vgl. Reaktionsschema 1; Flavin  $\equiv$  Isoalloxazin = 3,10*H*-Benzo[*c*]pteridin-2,4-dion (Chem. Abstr.); Flavin im oxydierten Zustand = Flavochinon (FlH); Flavin im reduzierten Zustand = Flavohydrochinon («Leukoflavin», FlH<sub>2</sub>); Flavinradikal = Flavosemichinon F(IH<sub>2</sub>); FMN = Flavin-Mononucleotid; FAD = Flavin-Adenosin-Dinucleotid. ESR = Elektronen-Spin-Resonanz.

3) Stabilisierung der Flavinradikale in nativen Enzymen durch Metallionen und funktionelle Apenzyme.

Reaktionsschema 1. Die wesentlichsten Säure-Basen-, Ladungstransfer- und Disproportionierungsgleichgewichte im Flavin-Redoxsystem



A: Die spektralen Erscheinungsformen des Flavochinons<sup>6)</sup>. Flavochinon («FIH», I)<sup>6)7)</sup> ist schwach amphoter ( $pK_{FIH_2}^H \sim 0$  [12],  $pK_{FIH}^H \sim 10$  [13]). Durch die Protonierung wird die längstwellige Bande hypsochrom, die nächste bathochrom verschoben: Beide überlagern sich nun zu einer Bande erhöhter Intensität bei  $390 m\mu$ , so dass ein scheinbar nur noch zweibandiges Gesamtspektrum beobachtet wird (Fig. 1). Wir haben nun N- und O-ständig alkylierte Flaviniumsalze hergestellt<sup>8)</sup> (II, III, IV und V, vgl. Tab. 1). Während II (Kation) mit unsubstituiertem  $FIH_2^+$  spektral praktisch identisch ist, zeigen III, IV und V eine bathochrome Verschiebung (vgl. Tab. 1).



Daraus folgt: N(1) – und nicht etwa N(5) oder O(2/4) – ist die basischste Stelle am Flavochinon (I). Dieses Ergebnis stimmt mit der berechneten Ladungsverteilung der  $\pi$ -Elektronen ausgezeichnet überein [10] [11].

7) Die Strukturformeln sind im allgemeinen in den Tabellen enthalten und sind nur in speziellen Fällen im Text wiedergegeben.

8) Über den Syntheseweg berichten wir in einer separaten Mitteilung.

Tabelle 1. Bestimmung der in Lösung vorwiegenden Tautomer-Formen des Flaochinons durch Spektren-Vergleich

Nr.	Formel	$\lambda_{max}$ (m $\mu$ )			
		Neutral (FIH)	Kation (FIH <sub>2</sub> <sup>+</sup> )	Di-Kation (FIH <sub>3</sub> <sup>2+</sup> )	Anion (FI <sup>-</sup> )
I		446, 370, 270, 230 <sup>a)</sup>	<b>390, 264, 222<sup>b)</sup></b>	444, 270, 222 <sup>c)</sup>	444, 350, 270, 230 <sup>d)</sup>
II		420 (S.), 378, 264, 222 <sup>a)</sup>	<b>390, 262, 218<sup>e)</sup></b>	448, 272, 218 <sup>e)</sup>	
III			402, 262, 218 <sup>e)</sup>	448, 276, 220 <sup>e)</sup>	
IV			394, 262, 218 <sup>e)</sup>		
V			398, 266, 220 <sup>e)</sup>	452, 276, 222 <sup>e)</sup>	

Tabelle 1. Fortsetzung

VI		448, 350, 266, 222 <sup>a)</sup>	390, 262, 218 <sup>c)</sup>	447, 350 <sup>d)</sup> §
VII		387, 340, 257, 247, 217 <sup>f)</sup>	390, 260, 214 <sup>b)</sup>	432, 340, 266 <sup>d)</sup>
VIII		382, 340, 250, 218 <sup>f)</sup>		426, 340, 262, 224 <sup>d)</sup>
IX		386, 340, 250, 220 <sup>f)</sup>		390, 340, 254, 218 <sup>d)</sup>

(S.) = Schulter.

a) Phosphat-Puffer pH = 7,0.

b) 6N HCl.

c) konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

d) 2N NaOH.

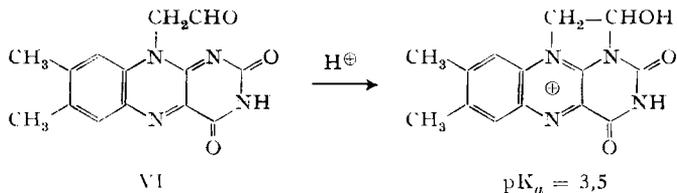
e) Sulfat-Puffer pH = 2,0.

f) Methanol abs.

§) Lösung unbeständig.

Die UV.-Banden sind in diesem Zusammenhang uninformativ und wurden nicht in allen Fällen ausgemessen. Als signifikant analog (in erster Näherung) angesehene Spektren wurden fett gedruckt.

Hiermit deckt sich ferner die Beobachtung METZLERS [12], derzufolge der Aldehyd VI, das Perjodat-Abbauprodukt des Riboflavins, 100fach stärker basisch ist als I infolge Ringschlusses:



O-Alkylierung ergibt verständlicherweise einen bathochromen Effekt infolge Erhöhung der Resonanz im Pyrimidin-Teilkern (vgl. III, Tab. 1). N(1)-Alkylierung gibt bei V (Tab. 1) denselben Effekt; wahrscheinlich infolge Behinderung der Coplanarität des  $\text{CH}_3\text{N}(1)$ , wodurch die anti-auxochrome Wirkung der Acylimidgruppe herabgesetzt wird. Ebenfalls spektral praktisch identisch mit  $\text{FlH}_2^-$  ist das Kation des Lumichroms VII (Tab. 1), welches somit in 10-Stellung – unter bathochromer Verschiebung des Spektrums – protoniert wird.

Wird jedoch die 5-Stellung am Flavochinon protoniert, so hat dies allenfalls einen bathochromen Effekt zur Folge. Dies ist der Fall bei doppelter Protonierung von FlH, welche in konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  eintritt und für alle (Iso)alloxazine charakteristisch unter Farbvertiefung abläuft (Fig. 1). Dass es sich hier um eine reine Säure-Basen-Reaktion handelt und nicht um einen Elektronentransfer, wie er bei aromatischen Systemen mit  $\text{SO}_3$  oft eintritt, folgern wir auf Grund des Fehlens eines Elektronenspin-Resonanzsignals und der quantitativen Reversibilität beim Verdünnen mit  $\text{H}_2\text{O}$ . Ferner gehorcht diese Färbung dem BEER'schen Gesetz, und in konz.  $\text{D}_2\text{SO}_4$  werden die H-

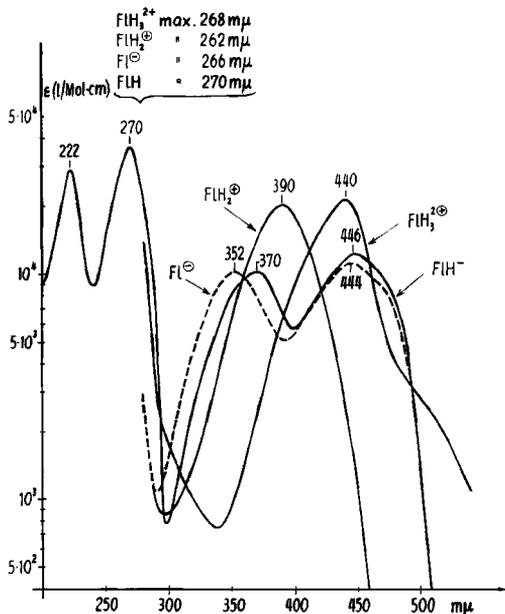


Fig. 1. Absorptionsspektren des Flavochinons (Riboflavins) als Funktion der H-Ionenaktivität  
Konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $\text{FlH}_3^{2+}$ ); 6N HCl ( $\text{FlH}_2^+$ ); pH 2-8 ( $\text{FlH}$ ); pH 13 ( $\text{Fl}^-$ )

Tabelle 2. Variationen des Flavinsystems, welche im Sinne einer Verkürzung des Flavinchromophors wirken

Nr.	Formel	1. $\lambda_{max}$ (m $\mu$ )	Nr.	Formel	1. $\lambda_{max}$ (m $\mu$ )
I		446 <sup>a)</sup> 473 (S.), 449 <sup>b)</sup>	XII		395 <sup>a)</sup>
X		436 <sup>a)</sup>	XIV		398 <sup>a)</sup>
XI		430 <sup>a)</sup>	XV		394 <sup>b)</sup>
XIII		442 <sup>a)</sup> 480, 456 <sup>b)</sup> c)	XVI		354 <sup>b)</sup>

(S.) = Schulter.

a) Phosphat-Puffer pH 7,0.

b) CHCl<sub>3</sub>.

c) Wie der Vergleich der CHCl<sub>3</sub>-Lösungen zeigt, liegt hier eher ein bathochromer Effekt vor. Die 2-Carbonyl-Funktion wirkt demnach anti-auxochrom.

Tabelle 3. Variationen des Flavinsystems, welche im Sinne einer «Verlängerung» des Flavinchromophors wirken

Nr.	Formel	I. $\lambda_{max}$ (m $\mu$ )	Nr.	Formel	I. $\lambda_{max}$ (m $\mu$ )
I		446 <sup>a)</sup> 473 (S.), 449 <sup>b)</sup>	XXI		498 <sup>a)</sup>
XVII		448 <sup>a)</sup>	XXII		530 (S.), <sup>a)</sup> 494
XVIII		454 <sup>a)</sup>	XXIII		454 <sup>a)</sup>
XIX		480 (S.), <sup>a)</sup> 456	XXIV		478 <sup>a)</sup>
XX		492 <sup>a)</sup>	XXV		526 <sup>a)</sup>
XXVI		512 <sup>b)</sup>	XXXII		486 (S.), <sup>a)</sup> 466

Tabelle 3. Fortsetzung

XXVII		504 <sup>a)</sup>	XXXIII		460 <sup>a)</sup>
XXVIII		510 <sup>a)</sup>	XXXIV		492 (S.) <sup>a)</sup> 468
XXIX		508 <sup>a)</sup>	XXXV		470 <sup>a)</sup>
XXX		490 <sup>a)</sup>	XXXVI		500 (S.) <sup>a)</sup> 470
XXXI		478 (S.) <sup>a)</sup> 451	XXXVII		442 <sup>a)</sup> (c) 480, 456 <sup>b)</sup>

(S.) = Schalter; a) Phosphat-Puffer pH 7,0; b) CHCl<sub>3</sub>; c) Vgl. Tab. 2, XIII.

Atome in 6- und 9-Stellung des Flavins nicht durch Deuterium substituiert [14], so dass Protonierung an diesen Stellungen auszuschliessen ist.

Im Gegensatz zur Protonierung hat die Deprotonierung  $\text{FlH} \rightarrow \text{Fl}^-$  in erster Näherung keinen Einfluss auf das Flavochinon-Spektrum (Fig. 1). Demzufolge können die beiden *p*-Elektronen, mit welchen N(3) zum  $\pi$ -Elektronen-System beitragen kann, nicht stark delocalisiert sein. Dies steht im Einklang mit der für ein cyclisches Säureimid auffällig geringen Acidität des FlH.

Der Diacylimid-Teil hat demnach eine schwach anti-auxochrome Wirkung: Der Wegfall eines Acylimid-Carbonyls wirkt bathochrom (vgl. XIII, Tab. 2). Dasselbe folgt auch aus der Betrachtung der Spektren des sukzessive verkürzten (Tab. 2) und des sukzessive verlängerten Flavins-Chromophors (Tab. 3). Besonders auffallend sind die spektralen Veränderungen bei Ersatz von O durch S im Flavochinon (Fig. 2). XX (Tab. 3) und XXV (Tab. 3) liegen als echtes Thiochinon bzw. Chinonoxim vor. So ist das 3-Alkylderivat von XX spektral mit der Muttersubstanz nahezu identisch unterhalb pH 9, nicht aber das S-CH<sub>3</sub>-Derivat XXIII (Tab. 3, Fig. 2, 3). Das gleiche gilt für das 4-Thioflavin XXII, wo insbesondere das an N(1) protonierte Kation sich vom Kation des S-CH<sub>3</sub>-Analogen (XXIV) stark unterscheidet (vgl. Fig. 3). Auffallend ist weiter die stark negative Solvatochromie der 2-«Desoxy»-flavine (4-Benzopteridone (Fig. 4)) sowie der 2-Thioflavine und deren bei Raumtemperatur ablaufende oxydative Entschwefelung (Fig. 5).

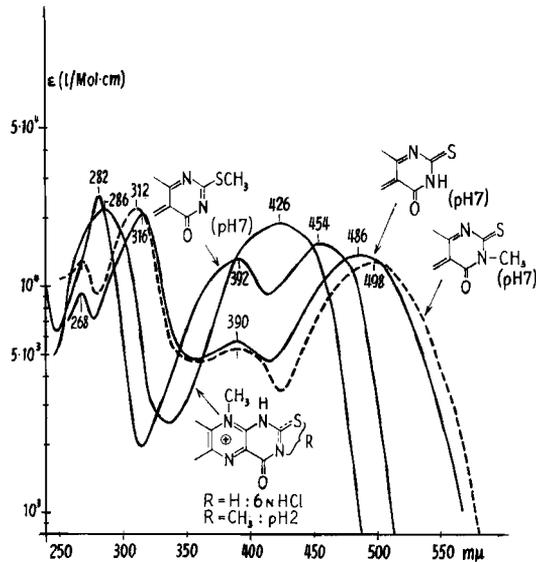


Fig. 2. Tautomerie der 2-Thioflavine. Optischer Vergleich mit *N*- und *S*-Methylderivaten in neutraler (0,1 N Phosphat, pH 7) und kationischer Form (6 N HCl)

Die CH<sub>3</sub>S-Verbindung liegt auch schon in 0,1 N Sulfat, pH 2, vollständig protoniert vor. Dissoziation des NH(3) ändert das 2-Thioflavin-Spektrum nicht

Die Desoxyflavine sind spektral nahezu identisch mit dem Stammkörper (Fig. 6), daher waren auch für die Flavochinon-iminolester (XXXVII, Tab. 3; XXXVIIa) nur unwesentliche spektrale Abweichungen zu erwarten. Solche Ester sind hochempfind-

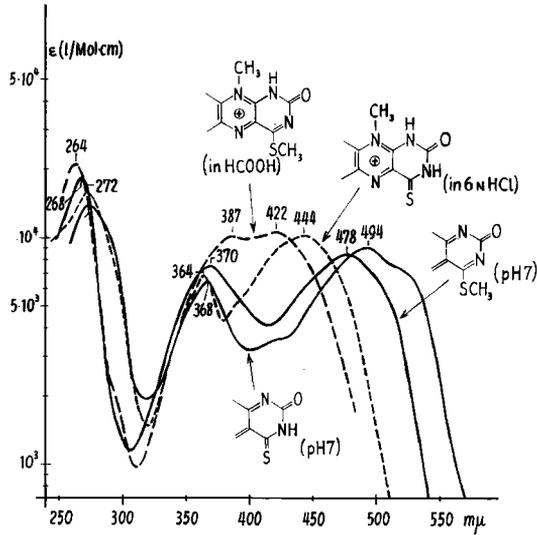


Fig. 3. Analog Fig. 2, für 4-Thioflavine

Die  $\text{CH}_3\text{S}$ -Verbindung kann als Kation nur in  $\text{HCOOH}$  abs. erhalten werden; in aq. saurem Milieu (schon bei pH 2) erfolgt schnelle Hydrolyse unter Bildung von Lumiflavin, siehe Fig. 7. Dissoziation von  $\text{NH}(3)$  ändert das 4-Thioflavin-Spektrum nicht, die alkalische Lösung wird aber sehr schnell autoxydativ entschweifelt

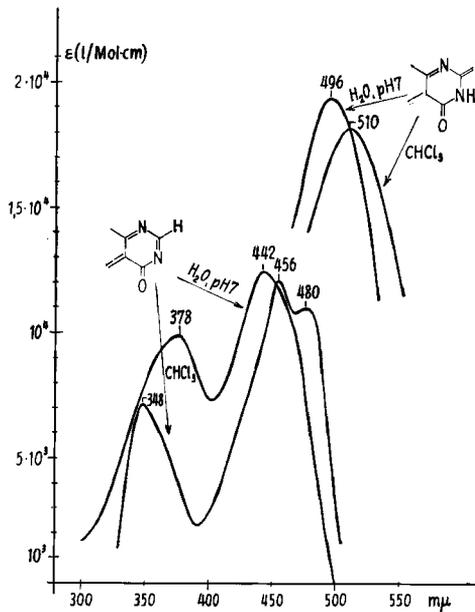


Fig. 4. Solvatochromie bei «2-Desoxy»lumiflavin (XIII) und 2-Thio-tetra-O-acetylriboflavin (XX)

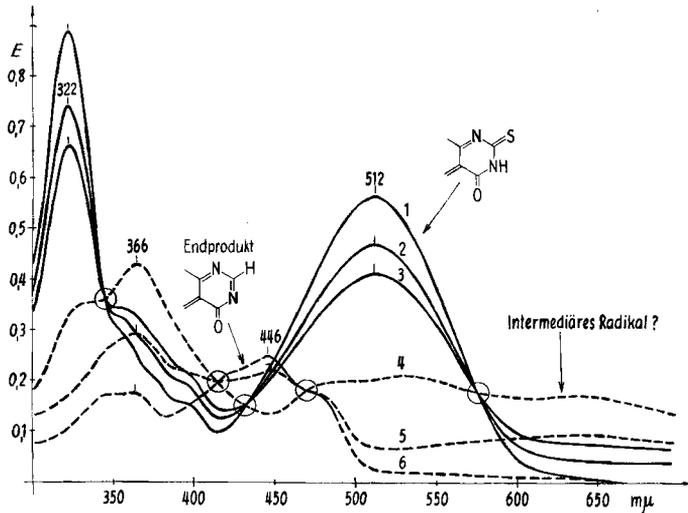


Fig. 5. Oxidative Entschwefelung (Kurven 2-6) von 2-Thiolumiflavin (Kurve 1)

$10^{-3}M$  2-Thiolumiflavin in  $CHCl_3$  wurde im Scheidetrichter mit  $10^{-1}M$  wässrigem  $H_2O_2$  geschüttelt; zur spektrophotometrischen Verfolgung der Reaktion entnahm man der obigen  $CHCl_3$ -Lösung Proben von je 1 ml, welche 1:10 verdünnt wurden. Die ersten 4 und letzten 3 Spektren sind je isobestisch. Der Zerfall der Zwischenstufe ist sehr langsam. Die ersten Spektren 1, 2, 3 sind im Abstand von je ungefähr 5 Min., 1, 4, 5, 6 hingegen im Abstand von mehreren Stunden gemessen.

Das Endprodukt kann kristallin erhalten werden [15]

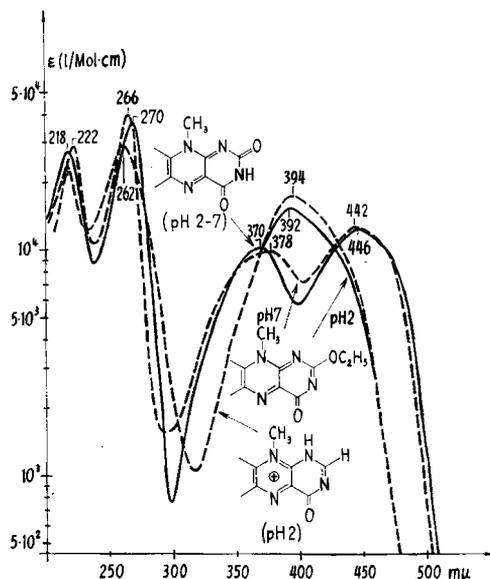
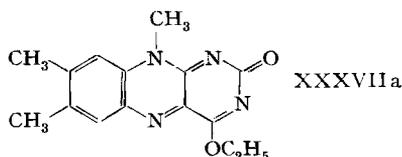


Fig. 6. Differenzierung der optisch nahezu identischen «Keto»- und 2-«Iminol»-Formen des Flavins auf Grund der Basizität

2-Iminol-Derivate liegen in  $0,1N$  Sulfat-Puffer pH 2,0 vollständig protoniert, freie Flavine hingegen neutral vor

lich gegen Hydrolyse, so dass wir sie lange Zeit nicht in Substanz fassen konnten<sup>8)</sup>. In Lösung lassen sie sich durch die spektrophotometrische Verfolgung ihrer Protonierung voneinander und vom Stammkörper unterscheiden: Alle 2-ständig, streng einwertig substituierten Benzopteridine, also XIII und XXXVII (Tab. 3), liegen bei pH 2 vollständig als Monokationen vor (Fig. 6). Die 4-Isomeren hingegen, z.B. XXXVIIa und XXIV (Tab. 3), werden so leicht hydrolysiert, dass sich Kationen spektral nur in wasserfreiem Milieu nachweisen lassen. Analoges Verhalten zeigen die



leichter isolierbaren analogen Thioäther<sup>8)9)</sup> [15] (XXIII, XXIV, Fig. 3, 7). Die beiden Hauptbanden der 4-Iminol(thio)ester-Kationen fallen nicht ganz zusammen wie beim  $\text{FlH}_2^+$ ; man erhält ein Doppelmilimum im Bereich von 400  $\mu$  (Fig. 3).

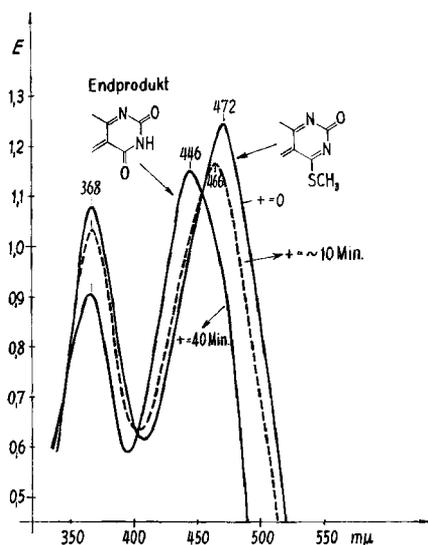


Fig. 7. Hydrolyse von 4-Methylthioflavin XXIV in 0,1N Sulfat, pH 2.  
Es entsteht Lumiflavin (I)

*B: Die spektralen Erscheinungsformen des Flavohydrochinons<sup>6)</sup>.* Flavin ist bekanntlich im reduzierten Zustand keineswegs farblos [17]. Die Untersuchung konzentrierter Lösungen [8] – z. B. von 3-Äthyl-tetra-O-acetylriboflavin [2] in  $\text{CHCl}_3$  – lässt eine Endabsorption erkennen, welche sich bis über 500  $\mu$  erstreckt (Fig. 8). Zwischen 560  $\mu$  und 516  $\mu$  gibt es sogar einen Bereich, wo die Molextinktion des «Leukoflavins» diejenige des Flavochinons übersteigt. Konzentrierte Flavinlösungen sind daher bei vollständiger Reduktion tiefer rötlich gefärbt als im oxydierten Zustand. Diese Färbung tritt im Bereich  $0 < \text{pH} < 6$  auf, d. h. nur beim neutralen «Leuko»-

<sup>9)</sup> Zur möglichen biochemischen Bedeutung solcher «energiereicher» Verbindungen vgl. [16].

flavin, welches wir daher besser als Flavohydrochinon bezeichnen. MASSEY & PALMER [8] haben diese Färbung beim  $\text{FMNH}_2$  in  $\text{H}_2\text{O}$  auf Sandwich-Polymere zurückgeführt. Wir haben aber festgestellt, dass beim 3-Äthyl-tetra-O-acetyl-dihydroriboflavin XXXVIII in  $\text{CHCl}_3$  dieselbe Färbung auftritt und dem BEER'schen Gesetz gehorcht (Tab. 4). Durch die Polymerisation in polarer Lösung wird dieser Effekt demnach nur verstärkt. Wir erklären diese Endabsorption durch das FRANCK-CONDON-Verbot<sup>10)</sup> des  $\pi, \pi^*$ -Überganges zum ersten Anregungszustand des Flavohydrochinons, welchen wir bei  $\lambda > 400 \text{ m}\mu$  annehmen. Wir legen dabei zugrunde, dass das Flavohydrochinon im Grundzustand in der 5, 10-Achse gewinkelt ist, im ersten elektronischen Anregungszustand hingegen planar (Reaktionsschema 2). Im gewinkelten Zustand hat N(5) pyramidale Konfiguration, die nichtbindenden Elektronen haben partiellen s-Charakter.

Reaktionsschema 2. Inversion um Flavohydrochinon

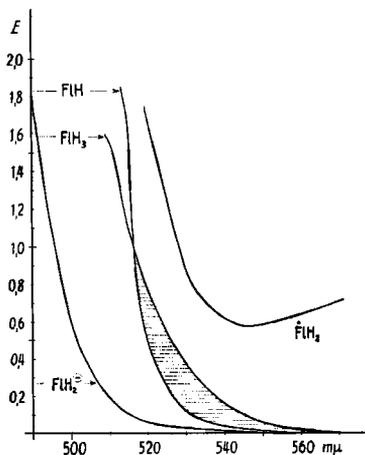
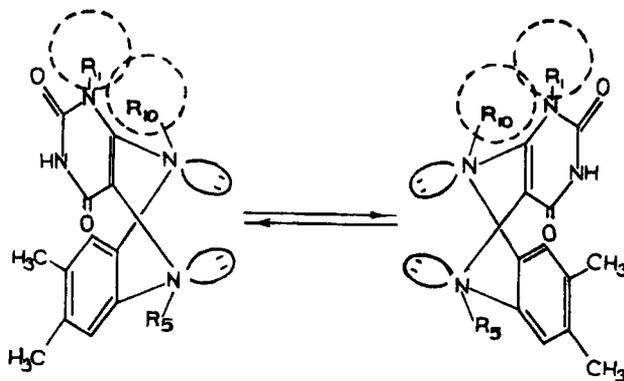


Fig. 8. Flavohydrochinon-Endabsorption

$10^{-2} \text{ M}$  Tetraacetylriboflavin: in  $\text{CHCl}_3$  (FIH); halb reduziert ( $\text{FIH}_2$ ); dasselbe total red. mit  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  ( $\text{FIH}_3$ ); dasselbe nach Zusatz von 2 Äq. Triäthylamin ( $\text{FIH}_2^-$ )

<sup>10)</sup> Vgl. z. B. H. A. STAAB, Einführung in die theoretische organische Chemie, S. 301, Verlag Chemie, Weinheim 1959.

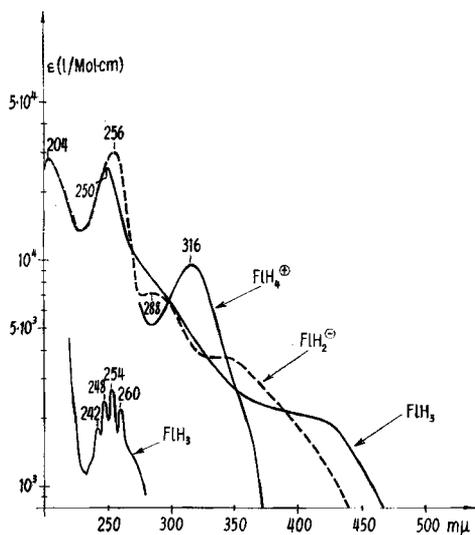


Fig. 9. Flavohydrochinon-Spektren in Abhängigkeit von der H-Ionenaktivität  
 Tetraacetylriboflavin: red. mit  $TiCl_3$  in 6N HCl ( $FIH_4^+$ ); kat. reduziert in 0,1N Sulfat pH 2 ( $FIH_3$ ); dasselbe in 0,1N Borat pH 9 ( $FIH_2^-$ );  
 unten links: Schwingungsstruktur der Hauptbande in Methanol

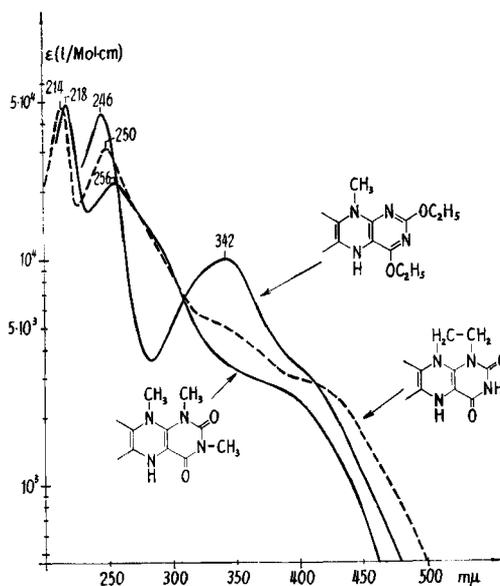


Fig. 10. UV-optischer Vergleich verschieden alkylierter Flavohydrochinone in Methanol abs., erhalten durch katalytische Reduktion der Flavochinonium-Salze II, III, V

Das Spektrum von II ist identisch mit dem des freien Flavohydrochinons  $FIH_3$ , vgl. Fig. 9

Tabelle 4. Konzentrations-Unabhängigkeit der «Leukon-Flavin-Endabsorption in  $\text{CHCl}_3$  ( $\lambda$  in  $m\mu$ )  
(Extinktion bei 700  $m\mu$  ( $E_{700}$ ) in allen Fällen = 0,00)

Formel	Konzentration	$E_{560}$	$E_{540}$	$E_{460}$	$E_{400}$
 XXXVIII	$8 \cdot 10^{-2} \text{ M}$	0,20	0,78		
	$4 \cdot 10^{-2} \text{ M}$	0,10	0,38		
	$2 \cdot 10^{-2} \text{ M}$	0,04	0,16		
	$10^{-2} \text{ M}$	0,025	0,08		
	$5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$	0,015	0,04		
	$5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$			0,40	0,99
	$2,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$			0,20	0,50
	$1,25 \cdot 10^{-4} \text{ M}$			0,10	0,25

rakter, während sie im planaren Zustand reinen *p*-Charakter annehmen. Blockiert man die nichtbindenden Elektronen an N(5) durch Protonierung, so entfällt die Endabsorption ebenso (Fig. 9), wie wenn man dem System ein Proton (an N(1)) entnimmt: In beiden Fällen wird der gewinkelte Zustand des Systems stabilisiert infolge Verminderung der Resonanz zwischen N(5) und dem Pyrimidin-Teilkern des Flavohydrochinons. Für die Winkelung des Flavohydrochinons gibt es noch eine Reihe weiterer Indizien:

a) 1-Alkylierte Flavohydrochinone (vgl. Tab. 5) haben eine geringere Endabsorption (Fig. 9, 10), d.h. die Winkelung ist begünstigt, wie zu erwarten, da die *peri*-Substituenten sich nicht spannungsfrei in der Molekel-Ebene orientieren können. Häuft man noch voluminösere Substituenten an, so z.B. beim 1,3,7,8,10-Pentamethyl-5-benzyl-flavohydrochinon XLIII (Tab. 5, 7), so sinkt  $E_{400}$  auf  $8001 \text{ Mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , obwohl der direkte induktive Effekt der Alkylsubstituenten sich allenfalls gegenteilig auswirkt: Beim zugehörigen planaren Radikalkation LXV (Fig. 11) bringt die 5-ständige Benzylgruppe eine bathochrome Verschiebung und Extinktionserhöhung mit sich. Die Extinktion bei  $> 400 \text{ m}\mu$  der 100-proz. reduzierten Flavinvlösung kann daher als direktes Mass der Flavohydrochinon-Koplanarität angesehen werden.

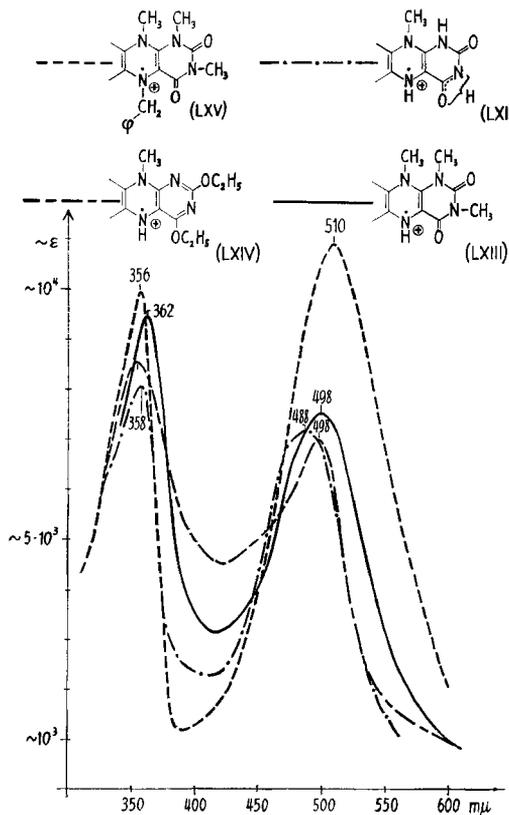


Fig. 11. Optischer Vergleich der Flavosemichinon-Kationen verschieden alkylierter Flavine, erhalten durch Reduktion von Flavochinon-Kationen mit  $\text{TiCl}_3$  bzw. Autoxydation von Flavohydrochinonen

Tabelle 5. UV.-Spektren von «Leuko»-Flavinen; zur Darstellung vgl. *exper. Teil*

Formel	Nr.	1. $\lambda_{max}$ (m $\mu$ )	2. $\lambda_{max}$ (m $\mu$ )	3. $\lambda_{max}$ (m $\mu$ )	
	XXXVIII	$\sim 350$ (S.) <sup>a)</sup>	288 <sup>a)</sup>	256 <sup>a)</sup>	} FIH <sub>2</sub> <sup>-</sup>
	R = H, Alkyl	$\sim 400$ (S.) <sup>b)</sup>	$\sim 280$ (S.) <sup>b)</sup>	254 <sup>b)</sup>	
		$\sim 400$ (S.) <sup>c)</sup>	$\sim 280$ (S.) <sup>c)</sup>	250 <sup>c)</sup>	} FIH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
		—	316, 250 <sup>e)</sup>	250 <sup>e)</sup>	
	XXXIX	$\sim 400$ (S.) <sup>e)</sup>	$\sim 280$ (S.) <sup>e)</sup>	252 <sup>e)</sup>	
	XL	$\sim 370$ (S.) <sup>b)</sup> $\sim 370$ (S.) <sup>e)</sup>	$\sim 280$ (S.) <sup>b)</sup> $\sim 280$ (S.) <sup>e)</sup>	256 <sup>b)</sup> 250 <sup>c)</sup>	
	XLI	$\sim 400$ (S.) <sup>b)</sup>	336 <sup>b)</sup>	252 <sup>b)</sup>	
	XLII	$\sim 480$ <sup>b)</sup>	346 <sup>b)</sup>	260 <sup>b)</sup>	
	XLIII	$\sim 350$ (S.) <sup>b)</sup> $\sim 350$ (S.) <sup>d)</sup>	280 (S.) <sup>b)</sup> —	246 <sup>b)</sup> 248 <sup>d)</sup>	

(S.) = Schulter.

<sup>a)</sup> Borat-Puffer pH 9,0.<sup>b)</sup> abs. Methanol.<sup>c)</sup> Sulfat-Puffer pH 2,0.<sup>d)</sup> Phosphat-Puffer pH 7,0.<sup>e)</sup> 6N HCl.

b) 1-ständig spannungsfrei alkylierte (vgl. XXXIX, Fig. 10, Tab. 5) oder 1-unsubstituierte Dialkylflavohydrochinone (vgl. XLI, Fig. 10, Tab. 5) haben hingegen eine ebenso starke oder stärkere Endabsorption wie  $FlH_3$  XXXVIII (Tab. 5, Fig. 9). Der Vergleich der UV.-Spektren von  $FlH_3$  und seinen O,O-Diäthylderivaten XLI (Fig. 10, Tab. 5) beweist andererseits, dass  $FlH_3$  (z. B. XXXVIII) in der Diketoforn vorliegt. Dies ist in Übereinstimmung mit den IR.-Spektren von 5-Acylflavohydrochinonen (XLVII–LX) (Tab. 6) [18] und auch des freien  $FlH_3$  in  $CHCl_3$ : Dieses weist 2 Carbonylbanden bei  $1650$  bzw.  $1695\text{ cm}^{-1}$  auf, welche bei der Alkylierung verschwinden, bzw. in den Bereich der Skelettschwingungen verschoben werden (Fig. 12).

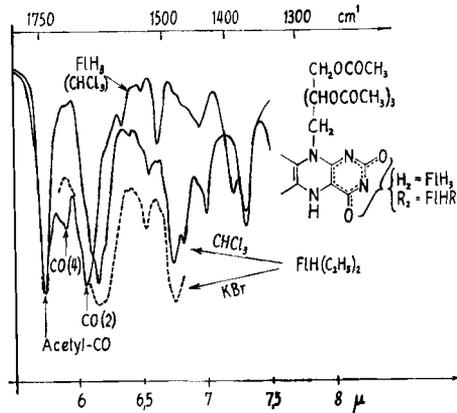


Fig. 12. IR.-Spektren (CO-Region) des Flavohydrochinons in  $CHCl_3$ ,  $10^{-2}M$ -Lösungen wie Fig. 8 ( $FlH_3$ ); dasselbe nach vollständigem Umsatz mit  $C_2H_5J$  und Triäthylamin ( $FlH(C_2H_5)_2$ ): Die 4-CO-Bande wird ausgelöscht, daher vollständige 4-O-Alkylierung anzunehmen

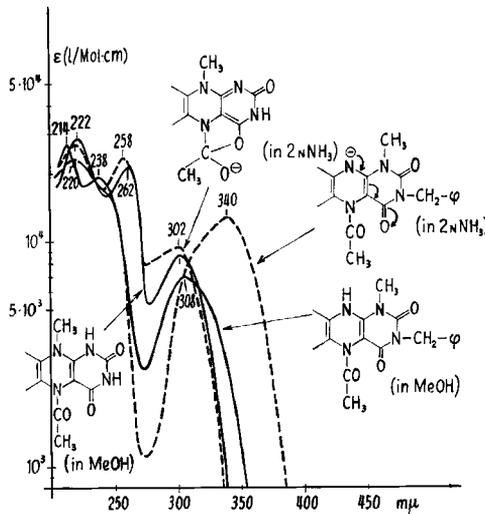


Fig. 13. Optischer Vergleich von XLVI und L: Dissoziation von  $NH(10)$  gibt bathochrome Verschiebung, Dissoziation von  $NH(1)$  nicht

Tabelle 6. UV.-Spektren von 5-Acyl-7,8-dimethyl-aleukoflavininen in abs. Methanol

Nr.	Substituenten in --Stellung:				1. $\lambda_{max}$ (m $\mu$ ) $\epsilon \cdot 10^{-4}$ l Mol $^{-1}$ cm $^{-1}$	2. $\lambda_{max}$ (m $\mu$ ) $\epsilon \cdot 10^{-4}$ l Mol $^{-1}$ cm $^{-1}$	3. $\lambda_{max}$ (m $\mu$ ) $\epsilon \cdot 10^{-4}$ l Mol $^{-1}$ cm $^{-1}$	$\epsilon \cdot 10^{-4}$ l Mol $^{-1}$ cm $^{-1}$
	10	1	3	4				
XLVII	CH <sub>3</sub>	H	H	=O	302	262	220	2,93
XLVIII	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	=O	302	260	218	3,86
IL	CH <sub>3</sub>	--	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	308	242	216	2,2
L	H	CH <sub>3</sub>	Bz	=O	308	238	212	2,76
LI	>CH <sub>2</sub>	>CH <sub>2</sub>	H	=O	300	236	209	3,05
LII	>CH <sub>2</sub>	>CHOH	H	=O	300	234	212	2,93
LIII	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	H	H	=O	304	262	220	3,28
LIV	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Bz	=O	310	252 (S.)	214	3,48
LV	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	=O	308	250 (S.)	214	2,3
LVI	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	=O	303	250 (S.)	212	2,37
LVII	CH <sub>2</sub> COOEt	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	=O	300	250 (S.)	212	2,77
LVIII	CH <sub>3</sub>	--	--	OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	296	--	218	3,84
LIX	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	--	H	OTs	302	260 (S.)	222	3,39
LX	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	--	--	OTs	~314	--	228	6,2

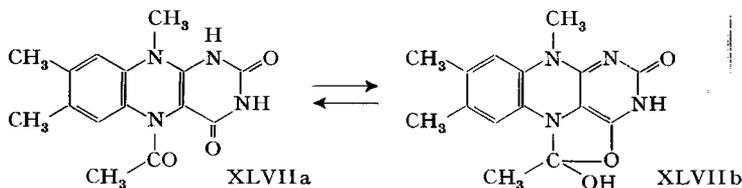
(S.) = Schulter; Bz = Benzyl; Ts = Tosyl.

Alle im Pyrimidinkern substituierten Derivate zeigen gegenüber den Stammkörpern eine stark hypochrome Verschiebung bzw. Auslöschung der Hauptbande im Bereich 250 m $\mu$ . Diese Spektren sagen daher über die Tautomererhältnisse nichts aus; zur Deutung vgl. Text.

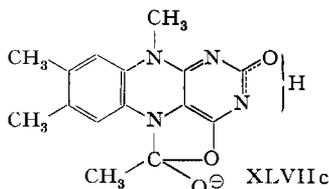
c) 5-Acylflavohydrochinone (XLVII-LX) (Fig. 13, Tab. 6) haben überhaupt keine Endabsorption. Demnach muss die Delokalisation der nichtbindenden Elektronen an N(5) zum Kern hin unter dem Einfluss der Acylgruppe abnehmen.

Dies kann geschehen:

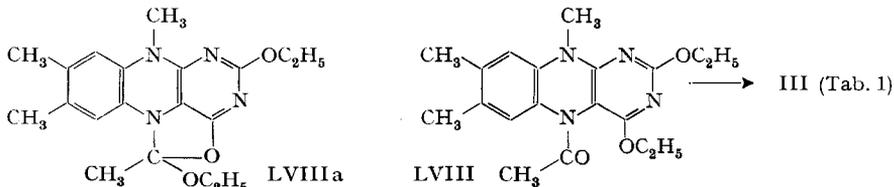
1) infolge Delokalisation derselben Elektronen zum Acyl-CO hin;  
 2) infolge Stabilisierung der gewinkelten Molekelform. Die erste Möglichkeit setzt jedoch Koplanarität von Kern und exocyclischem Acyl-CO voraus. Diese Konformation ist jedoch, wie auch das Kalottenmodell zeigt, sterisch extrem ungünstig. Die Struktur der 5-Acylflavohydrochinone wird am besten erklärt durch Annahme am Gleichgewicht beteiligter «Cyclol»-Strukturen (XLVIIa, XLVIIb) [18]<sup>11)</sup>, die in der 5,10-Achse starr gewinkelt sind. Solche Strukturen sind



in diesem Fall energetisch günstig, da die zu kompensierende 5-Säureamid-Resonanz und die 3,4-Iminolisierungsenergie gering sind. Direkte Beweise für diese Struktur sind darin zu erblicken, dass die Spektren von Anion und Neutralkörper bei XLVII praktisch identisch sind (nicht hingegen bei L, Tab. 6) (Fig. 13) und dass 5-Acylflavohydrochinone trotz relativ sehr hoher Acidität ( $pK_{AcFH_2}^H = 5,2$ ) keine deutliche Ag-Affinität zeigen [13]. Die negative Ladung des Acylflavohydrochinon-Anions kann daher nicht an einem Imidstickstoff lokalisiert sein. Dies zwingt zur Annahme der Struktur XLVIIc für das 5-Acetylflavohydrochinon-Anion.



Cyclolstrukturen für die O-Alkylderivate von XLVII, also zum Beispiel LVIIIa, welche früher postuliert wurden [18], sind jedoch nicht zutreffend, da LVIII sich in III überführen lässt,

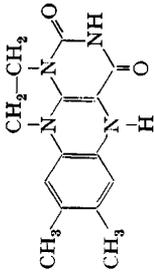
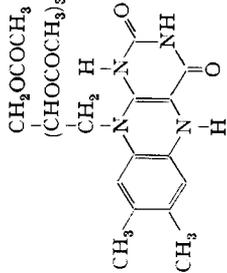
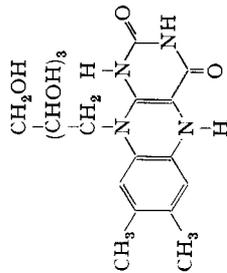


wie wir fanden<sup>8)</sup>. Bemerkenswert ist ferner, dass die Hauptbande  $\lambda_{max} \sim 250 m\mu$  bei den freien Flavohydrochinonen eine charakteristische Vibrations-Struktur aufweist (Fig. 9), nicht jedoch bei den Acylderivaten.

d) Weiter folgt aus dem Vergleich der  $FH_2$ -Molextinktionen (Tab. 7) von Flavohydrochinonen bei  $450 m\mu$ , dass auch der Adenosylrest des  $FADH_2$  eine Erhöhung der Endabsorption und damit der Flavohydrochinon-Koplanarität bewirkt. Dies ist ein neues Indiz dafür, dass die beiden heteroaromatischen Systeme im FAD in Sandwich-Konfiguration vorliegen, auch in der reduzierten Form, in Übereinstimmung mit den Resultaten von HARBURY *et al.* [9] und WEBER [23].

<sup>11)</sup> Zur Beständigkeit solcher *ortho*-Amide vgl. [19].

Tabelle 7. Vergleich der Molextinktionen bei 450 m $\mu$  von Flavohydrochinonen verschiedener Planarität  
 Die angegebenen älteren Literaturwerte müssen auf Flavohydrochinon-Anionen bezogen werden, da  $pK_{FH_2}^H = 6,2$  [22]

Nr.	Formel	$\epsilon_{450} \cdot 10^{-3} \text{ l Mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	
		$FH_3^-$	$FH_2^-$
XXXIX		1,52 <sup>a)</sup> 1,58	
XXXVIII		0,89	0,82 0,75 0,62
XXXVIIa			0,61 [20]

Fortsetzung Tabelle 7

XXXVIIIb	FMNH <sub>2</sub> <sup>a)</sup>	1,39	1,29	0,90 0,87 [21]	0,60
XXXVIIIc	FADH <sub>2</sub> <sup>b)</sup>	1,57	1,52	1,06 0,98 [21]	0,78
XLI		1,01			
XL		0,69 0,68 <sup>a)</sup> 0,66 <sup>b)</sup>			
XI.III		0,00 <sup>b)</sup>			

<sup>a)</sup> Methanol abs.;

<sup>b)</sup> Chloroform.

C: Die spektralen Erscheinungsformen des Flavosemichinons<sup>6</sup>). Das Flavosemichinon ist die Radikalstufe des chinoiden Flavinsystems<sup>6</sup>). Wie beim Benzosemichinon, so existiert auch hier ein Dimerisationsgleichgewicht («Flavochinhydrone»-Bildung) und ein Disproportionierungsgleichgewicht (vgl. Reaktionsschema 1 und Tab. 8). Die Thermodynamik des Systems in wässrig-alkoholischer Lösung, unter Vernachlässigung assoziierter Partikeln, hat HEMMERICH [2] besprochen. Die schon eingangs erwähnten jüngsten Arbeiten von MASSEY *et al.* [8] haben gezeigt, dass die Zuordnung von Spektren der Radikalpartikeln infolge der geringen freien Radikalkonzentration in dem sehr komplexen System in wässriger Lösung auf grosse Schwierigkeiten stösst. Flavosemichinon und Flavochinhydrone absorbieren im langwelligeren Teil des Spektrums (über 500 m $\mu$ ). BEINERT [7] ordnete als erster die Bande von  $\sim 600$  m $\mu$  im halbreduzierten Flavin bei pH 6,1 dem neutralen Flavosemichinon  $\dot{\text{F}}\text{IH}_2$ , die Absorption im nahen Infrarot hingegen dem Chinhydrone ( $\text{FIH}_2$ )<sub>2</sub> zu. EHRENBERG [25] und MASSEY *et al.* [8] wiesen als erste unabhängig voneinander nach, dass in wässriger Lösung neben ( $\text{FIH}_2$ )<sub>2</sub> auch noch Assoziate [ $\dot{\text{F}}\text{IH}_3$ - $\text{FIH}_3$ ]<sup>+</sup>, [ $\dot{\text{F}}\text{IH}$ - $\text{FIH}$ ]<sup>-</sup> usw. zu berücksichtigen sind, welche bei kürzeren Wellen absorbieren, mit der Absorption des monomeren  $\dot{\text{F}}\text{IH}_2$  überlappend. Wir haben daher Bedingungen gesucht, unter welchen die Bildung von Assoziaten ausbleibt, was am Fehlen einer Absorption im Bereich von 1000 m $\mu$  zu erkennen ist. Tetra-O-acetylriboflavin [24] und seine 3-Alkylderivate [2] in Chloroform – zweiphasisch reduziert mit S<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>2-</sup> aq. – genügen dieser Anforderung. Fig. 8 und 14 zeigen die spektrale Änderung dieses Systems im Bereich von 500 bis 700 m $\mu$ . Unter diesen Umständen entsteht neben  $\text{FIH}$  und  $\text{FIH}_3$  nur  $\dot{\text{F}}\text{IH}_2$  als Zwischenstufe ( $\sim 10\%$  vom Gesamtflavin bei 50% Reduktion). Die BEINERT'sche Zuordnung erwies sich damit als richtig. Setzt man dem System Säure zu, so komproportioniert es nahezu vollständig unter Bildung des Flavosemichinonkations gemäss  $\text{FIH} + \text{FIH}_3 + 2\text{H}^+ \rightarrow 2\dot{\text{F}}\text{IH}_3^+$  (vgl. Fig. 11). Die ersten Absorptionsmaxima des Radikalkations  $\dot{\text{F}}\text{IH}_3^+$  liegen bei 486 m $\mu$  und 358 m $\mu$  in CHCl<sub>3</sub>/HCOOH

Fig. 14. Absorption des Flavosemichinons im langwelligeren Spektralbereich in unpolarem Medium (Chloroform), Abhängigkeit der Disproportionierung von der H-Ionenaktivität

10<sup>-2</sup>M Tetraacetylriboflavin bzw. 3-Äthoxycarbonylmethyl-lumiflavin: A) in CHCl<sub>3</sub>, ca. 50% red. mit Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> aq. ( $\dot{\text{F}}\text{IH}_2$ ); B) dieselbe CHCl<sub>3</sub>-Lösung 0,1N an Triäthylamin ( $\dot{\text{F}}\text{IH}^-$ ), zugleich Abnahme der Radikalkonzentration (Zunahme der Disproportionierung); C) dieselbe CHCl<sub>3</sub>-Lösung nach vollständigem Umsatz mit C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>J (O-Alkylierung) ( $\dot{\text{F}}\text{IR}_2$ ); D) verglichen mit N,N-Dialkyl-lumiflavosemichinon, erhalten durch Autoxydation von XL in CHCl<sub>3</sub>

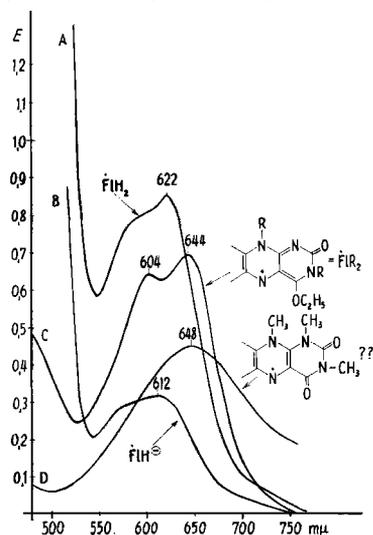


Tabelle 8. Übersicht über die Spektren der in Abhängigkeit von Redox-Zustand und pH vorkommenden Flavin-Partikeln  
(alle Messungen mit Tetra-O-acetylriboflavin [24].)

(Vgl. die analoge Tabelle für FMN bei BEINERT [7])

Redox-Zustand	Neutral	Kation	Anion
Flavochinon $\lambda_{max}$ (m $\mu$ )	446, 370, 270, 230 <sup>a)</sup> (FIH)	390, 264 <sup>b)</sup> (FIH <sub>2</sub> <sup>+</sup> ) 444, 270, 222 <sup>c)</sup> (FIH <sub>3</sub> <sup>2+</sup> )	444, 350, 270, 230 <sup>d)</sup> (FI <sup>-</sup> )
Flavohydrochinon $\lambda_{max}$ (m $\mu$ )	~400 (S.), ~280 (S.), 250 <sup>e)</sup> (FIH <sub>3</sub> )	316, 250 <sup>b)</sup> (FIH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	~350 (S.), 288, 256 <sup>f)</sup> (FIH <sub>2</sub> <sup>-</sup> )
Flavosemichinon <sup>g)</sup> $\left\{ \begin{array}{l} \text{monomer} \\ \lambda_{max} \text{ (m}\mu\text{)} \\ \text{«dimer»} \\ \lambda_{max} \text{ (m}\mu\text{)} \end{array} \right.$	570 <sup>a)</sup> 622, 590 (S.) <sup>h)</sup> >800 <sup>a)</sup> (FIH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	488, 358, 258 <sup>b)</sup> } (FIH <sub>2</sub> <sup>+</sup> ) 486, 348 <sup>h)</sup> } ?	612 ? <sup>i)</sup> (FIH <sup>-</sup> ) ?

(S.) = Schulter.

a) Phosphat-Puffer pH 7,0.

b) 6N HCl.

c) konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

d) 2N NaOH.

e) Sulfat-Puffer pH 2,0.

f) Borat-Puffer pH 9,0.

g) CHCl<sub>3</sub>.

h) CHCl<sub>3</sub>/HCOOH.

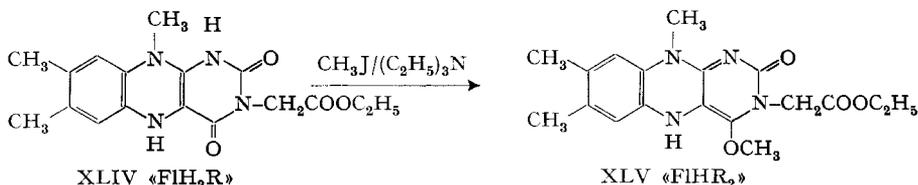
i) CHCl<sub>3</sub>, 2 · 10<sup>-3</sup>M an Triäthylamin.

k) Nur sichtbares Spektrum analysierbar.

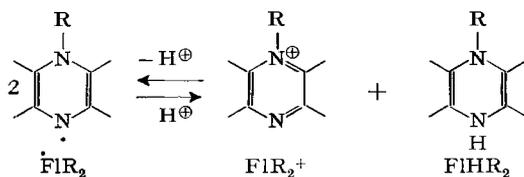
oder HCl aq. für Tetra-O-acetylriboflavin (Fig. 11). Die zweite Absorptionsbande des  $\dot{\text{F}}\text{IH}_3^+$  bei  $358 \text{ m}\mu$  wird bei Gegenwart von Flavochinon leicht mit der zweiten Bande des neutralen Flavochinons ( $370 \text{ m}\mu$ ) verwechselt. Das Spektrum des  $\dot{\text{F}}\text{IH}_3^+$  legt die Vermutung nahe, dass sich bei Entnahme eines Elektrons aus dem Leukoflavin die Struktur nur im Sinne einer Planarisierung ändert: Das Semichinon ist im übrigen dem Hydrochinon strukturell näher verwandt als dem Chinon. Dies ist im Zusammenhang mit den später zu besprechenden Spektren der Flavin-Metall-Assoziate [5] wichtig: Das Spektrum nativer Metallflavoproteine ist dem  $\dot{\text{F}}\text{IH}_3^+$ -Spektrum zunächst verwandt, nicht dem  $\text{F}\text{IH}$ - oder  $\dot{\text{F}}\text{IH}_2$ -Spektrum [5].

Setzt man dem in Chloroform gelösten halbreduzierten Flavin hingegen eine Base zu (Triäthylamin), so nimmt die Radikalbande bei  $600 \text{ m}\mu$  ebenfalls stark ab: Wahrscheinlich nimmt die Disproportionierung zu (Fig. 14). Dies würde übereinstimmen mit dem in wässriger Lösung pH-metrisch [2] und ESR.-spektroskopisch<sup>12)</sup> [25] nachgewiesenen Maximum der Disproportionierung (Minimum der Radikalkonzentration) bei neutralem bis schwach alkalischem pH. Dieses Maximum wird aufgehoben durch Zusatz von *d*-Metallionen [2].

Wir haben nun weiter versucht, den Einfluss eines polaren Mediums auf die Absorption des neutralen Semichinons  $\dot{\text{F}}\text{IH}_2$  kennenzulernen. Zu diesem Zweck mussten wir die Disproportionierung unterdrücken können, da sich anders in Wasser die störende Bildung von Ladungstransfer-Assoziaten nicht vermeiden lässt. Wir haben daher 3-Äthoxycarbonylmethyl-lumiflavin XLIV [2] in  $\text{CHCl}_3$  mit wässrigem  $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$  bis zur vollständigen Reduktion geschüttelt und der  $\text{CHCl}_3$ -Phase dann  $\text{CH}_3\text{J}/(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$ -Gemisch zugesetzt und bei  $40^\circ$  vorsichtig gerührt, unter möglichst geringer



Phasenvermischung. Nach 2 Stunden zeigte die Chloroform-Phase dünnschichtchromatographisch nach Luftzutritt nur noch Spuren vom Ausgangsflavin. Wir haben Grund zu der Annahme, dass die Methylierung ausschliesslich an O(4), und Beweise dafür, dass sie nicht an N(1) erfolgt<sup>8)</sup> (durch Säure wird die  $\text{CH}_3$ -Gruppe quantitativ abhydrolysiert), woraus sich Struktur XLV ergibt. Trennt man die  $\text{CHCl}_3$ -Phase ab und lässt Luft oder  $\text{J}_2$  Zutreten, so zeigt sich die Autoxydation in einer Verfärbung nach Tiefgrün. Die zugehörigen Spektren zeigt Fig. 14. Man sieht, dass die Flavo-



<sup>12)</sup> Wir danken J. G. ERIKSON<sup>8)</sup> für die Mitarbeit bei den ESR.-Messungen.

chinon-Absorption  $< 500 \text{ m}\mu$  nun allenfalls von ähnlicher Grössenordnung ist wie die Radikal-Absorption  $> 500 \text{ m}\mu$ . Nach Aufnahme von 1 Oxydations-Äquivalent bleibt die Reaktion in  $\text{CHCl}_3$  stehen, nicht jedoch in Wasser. Daraus geht hervor, dass die Oxydation des Flavosemichinons durch  $\text{J}_2$  nicht direkt erfolgen kann, sondern wahrscheinlich nur über vorausgehende Disproportionierung, welche nur unter Verbrauch von H-Ionen, d. h. nicht in unpolarem, basischem Milieu ablaufen kann. Anders jedoch die Autoxydation des Radikals: Bei Luftzutritt zur  $\text{CHCl}_3$ -Lösung wird das Semichinon langsam, in wässrigem Milieu schnell abgebaut.

Wir haben nun die Extinktion bei  $630 \text{ m}\mu$  verglichen mit der Intensität des ESR.-Signals der so erhaltenen Lösung und fanden dabei vollständige Proportionalität zwischen der Extinktion und ESR.-Signalintensität, welche bei 50% Oxydation (d. h. nach Verbrauch von 1 Äquivalent  $\text{J}_2$ ) maximal ist. Es liegt somit nur *eine* Radikal-Spezies vor, und dieser ist die Bande im Bereich  $600 \text{ m}\mu$  zuzuordnen.

Wir haben weiter – immer unter Luftausschluss – das Chloroform einer konzentrierten Lösung von XLV durch Methanol ersetzt und danach wässrigen Phosphatpuffer zugegeben. Die grüne Farbe schlägt in diesem polaren Milieu dabei nach Blauviolett um (zugehöriges Spektrum siehe Fig. 15). Auch hier ist die Absorptionsintensität bei  $600 \text{ m}\mu$  der ESR.-Signalhöhe proportional, während im nahen IR. keine Absorption gefunden wird. Man findet demnach beim Flavosemichinon eine negative Solvatochromie. Das Absorptionsmaximum des  $\dot{\text{F}}\text{IR}_2$  aq. bei  $590 \text{ m}\mu$  deckt sich ferner ausgezeichnet mit den experimentellen Zuordnungen BEINERT's ( $565 \text{ m}\mu$ ) [7] und den Rechnungen KARREMAN's [10] und GRABE's [11] ( $576 \text{ m}\mu$ ) für das unsubstituierte Radikal  $\dot{\text{F}}\text{IH}_2$ .

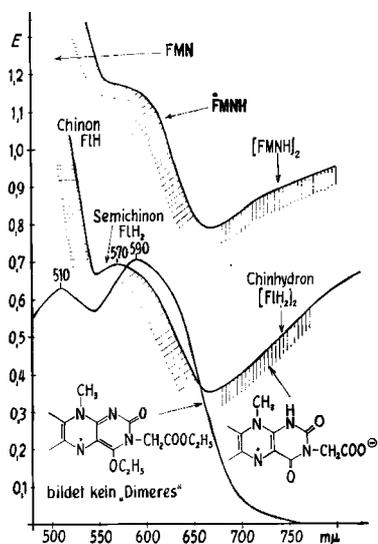


Fig. 15. Absorption des Flavosemichinons (Flavin-Totalkonz.  $10^{-2} \text{ M}$ ) in wässriger Lösung,  $\text{pH}$  ca. 5, im langwelligeren Spektralbereich

«Dimerisierende» und nicht dimerisierende (dialkylierte) neutrale Flavosemichinone, erhalten durch Autoxydation von Flavohydrochinonen (vgl. Fig. 11)

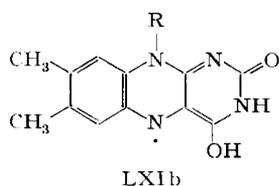
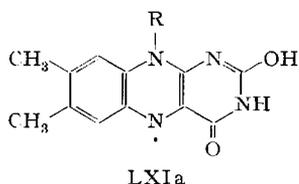
Tab. 9 gibt die Absorptionsmaxima der primären Autoxydationsprodukte von Flavohydrochinonen  $\text{FIR}'\text{H}$  in Medien verschiedener Polarität wieder, soweit Löslichkeit und Stabilität gegen Disproportionierung die Messung zulassen. Alkylsub-

stitution am N(3) hat auch hier praktisch keinen Einfluss auf das Spektrum. Um so mehr Einfluss hat die weitere Alkylierung:

a) Ist der zweite Alkylrest am Sauerstoff fixiert (vgl. XLV), so erhält man in Wasser wie in  $\text{CHCl}_3$  eine bathochrome Verschiebung des  $\dot{\text{F}}\text{IR}_2$ -Spektrums von  $\sim 20 \text{ m}\mu$  gegenüber unsubstituierten Analogen, während die Form des Spektrums unverändert bleibt. Diese tiefgrünen Radikale sind in unpolarer Lösung auch an der Luft ziemlich stabil (Fig. 14).

b) Ist der zweite Alkylrest jedoch an N(1) fixiert, so lassen sich in neutraler Lösung überhaupt keine stabilen Radikale erhalten: Bei Neutralisation der wässrigen Lösung des roten Radikalkations  $\dot{\text{F}}\text{IHR}_2^+$  von XL tritt Farbumschlag nach Hellgelb ein und das ESR.-Signal verschwindet.

Daraus ist zu schliessen, dass freies Flavonradikal  $\dot{\text{F}}\text{H}_2$  vorwiegend in einer der beiden möglichen Monohydroxy-Formen LXIa, LXIb vorliegt; dieses Ergebnis ist



mit allen älteren Literaturdaten verträglich.

Tabelle 9. Langwellige Absorption des monomeren neutralen Flavosemichinons in Abhängigkeit von Milieu-Polarität und (Di)-alkylsubstitution am Pyrimidin-Kern

	$\text{R}_2$				$\lambda_{\text{max}}$ (m $\mu$ )
	N(1)	N(3)	O(2)	O(4)	
	? $\leftarrow$	H?	? $\leftarrow$	H?	622, 588 (S.) <sup>a)</sup>
	H	$\text{C}_2\text{H}_5$	—	—	628, 588 (S.) <sup>a)</sup>
	H	$\text{CH}_2\text{COO}^-$	—	—	570 <sup>b)</sup>
	—	? $\text{C}_2\text{H}_5$	?	$\text{C}_2\text{H}_5$	644, 604 <sup>a)</sup> / $\sim 620$ (S.), 592 <sup>b)</sup> / 609, 584 <sup>c)</sup>
	—	$\text{C}_2\text{H}_5$	—	$\text{C}_2\text{H}_5$	642, 600 <sup>a)</sup> / $\sim 620$ (S.), 596 <sup>b)</sup>
	—	$\text{CH}_2\text{COOEt}$	—	$\text{CH}_3$	645, 600 <sup>a)</sup> / $\sim 620$ (S.), 590 <sup>b)</sup>
d)	$\text{CH}_3$	$\text{CH}_3$	—	—	646 <sup>a)</sup> / 646 <sup>c)</sup>
$\dot{\text{F}}\text{MNH}$	? $\leftarrow$	H?	? $\leftarrow$	H?	575 <sup>b)</sup>

(S.) = Schulter.

<sup>a)</sup>  $\text{CHCl}_3$ .

<sup>c)</sup> Äthanol.

<sup>b)</sup> Phosphat-Puffer pH 7,0.

<sup>d)</sup> Nicht paramagnetisch, vgl. Text.

In unpolarer Milieu geben auch 1,3-dialkylierte Flavohydrochinone tief farbige Autoxydationsprodukte, welche HEMMERICH, PRIJS & ERLÉNMEYER [18] erstmals erhalten und als Flavosemichinone angesprochen haben. Wir fanden jedoch, dass diese Färbungen auch unter bestem Ausschluss von Luft und Licht schnell ausbleichen und weder ESR.-Absorption, noch para-

magnetische Suszeptibilität aufweisen, welche mit der Extinktion der langwelligen Bande parallel ginge. Ferner zeigen diese Färbungen stark *positive* Solvatochromie (Toluol,  $\text{CHCl}_3$ ) und werden durch Wasser unter Aufhellung nach Gelb irreversibel zerstört. Die langwellige Absorptionsbande des Autoxydationsproduktes von XL hat zwar ein Maximum bei 646  $\mu\mu$ , aber nicht die charakteristische Schulter der echten Radikale (Fig. 14). Mit der strukturellen Abklärung dieser gefärbten Produkte sind wir noch beschäftigt.

**Experimentelles.** – Zur Aufnahme der Elektronenspektren standen Geräte BECKMAN DB, für die IR.-Spektren BECKMAN IR 8 zur Verfügung. ESR.- und Suszeptibilitäts-Messungen wurden mit den in der Literatur [25] [26] beschriebenen Apparaturen durchgeführt.

$\text{O}_2$ -freie Lösungen wurden mit  $\text{V}^{2+}$ -deoxygenierten Inertgasen gewonnen. Lösungen autoxydabler «Leuko»flavine wurden in  $\text{CHCl}_3$  durch kurzes Schütteln mit stets frisch vorbereitetem 0,1N  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  aq., gesättigt mit NaCl, erhalten. Sofern im UV. gemessen wurde, nahm man die Reduktion in Methanol unter  $\text{H}_2$  mit Pd auf Silicagel als Katalysator vor. Die unter  $\text{H}_2$  verschlossenen Küvetten wurden vor der Messung kurz zentrifugiert, bis sich der Katalysator quantitativ abgesetzt hatte. Flavosemichinon-Lösungen wurden durch vorsichtige Oxydation von «Leuko»flavinen mit  $\text{O}_2$  oder  $\text{J}_2$ , teils auch durch Reduktion von Flavochinonen mit  $\text{SnCl}_2$  in 6N HCl erhalten, oder aber durch Zusammengeben äquimolarer «Leuko»flavin- und Flavochinon-Lösungen. Alle Messungen wurden in 1-cm-Küvetten vorgenommen, wenn nicht anders erwähnt.

Zum Vergleich von ESR.- und optischer Absorption wurden «Leuko»flavin-Lösungen in  $\text{CHCl}_3$  in  $\text{N}_2$ -gespülte THUNBERG-Küvetten gegeben. Die Flavin-Totalkonzentration war bei disproportionierenden Systemen (z. B. Tetra-O-acetylriboflavin)  $10^{-2}$  M, bei nicht disproportionierenden (vgl. Text, z. B. XLV) ca.  $2 \cdot 10^{-4}$  M. Dazu gab man aus einer AGLA-Mikrosyringe mit angesetztem Teflon-Mikroschlauch steigende Mengen von  $\text{O}_2$ -freiem  $\text{CHCl}_3$ , welches je gleiche Konzentrationen von  $\text{J}_2$  und Triäthylamin enthielt, bis zu 2 Äquivalent bezogen auf Totalflavin, unter angenäherter Wahrung des Gesamtvolumens. Nach jeweiliger Zugabe wurde die Konstanz der optischen Dichte bei 600  $\mu\mu$  abgewartet (ca. 3 Min.). Je 1 ml Lösung wurde dann mittels  $\text{N}_2$ -gefüllten Pipetten in  $\text{N}_2$ -gespülte ESR.-Küvetten transferiert. Nach Zugabe von 1 Äq.  $\text{J}_2$  ändert sich  $E_{600}$  und die ESR.-Signalhöhe nicht mehr bei weiterer  $\text{J}_2$ -Zugabe, bei  $\text{O}_2$ -Zutritt findet man jedoch eine langsame Abnahme beider Grössen, welche der  $\text{O}_2$ -Einwirkungsdauer ungefähr proportional ist. Dasselbe Experiment in polarer Lösung wurde durch Einwage von kristallinem XLV in Methanol und Verdünnen mit 0,1N Phosphat-Puffer pH 7 ausgeführt. Eine beträchtliche Anfangs-Autoxydation ist bei der Handhabung der Kristalle nicht zu vermeiden. Diese wurde durch anärober Rückextraktion in  $\text{CHCl}_3$  auf Grund der danach gemessenen  $E_{600}$  rechnerisch korrigiert.

Zur Synthese der im Text beschriebenen Substanzen: 3-Äthyl-tetra-O-acetylriboflavin (XXXVIII) und Lumiflavin-3-essigsäure (XLIV) vgl. [2].

7,10-Dimethyl-8-chlor-isoalloxazin (X) vgl. [27].

5-Acetyl-1,5-dihydrolumiflavin (XLVII), 5-Acetyl-3-methyl-1,5-dihydrolumiflavin (XLVIII) und 5-Acetyl-3,4-dimethyl-1,5-dihydrolumiflavin (II) vgl. [18].

7,8-Dimethyl-10-formyl-isoalloxazin (VI) vgl. [28].

Lumichrom (VII), 1-Methyl-2-chinoxalon-3-carbonsäureureid (XIV) vgl. [29].

10-Methyl-isoalloxazin (XI), 1-Methyl-6,7-dimethyl-2-chinoxalon (XVI) und analoge -3-carbonsäure (XV) vgl. [30].

8-Methyl-2,4-pteridindion vgl. [31].

Riboflavin und FAD<sup>6</sup>), Produkte der FLUKA A.G., St. Gallen. Die Substanzen waren dünn-schichtchromatographisch rein; der molare Extinktionskoeffizient des FAD wurde von WHITBY [20] übernommen.

Zur Synthese aller übrigen Verbindungen vgl. <sup>8</sup>) und [15].

Für diese Studien standen Mittel der NATIONAL SCIENCE FOUNDATION (K. DUDLEY), der NATIONAL INSTITUTE OF ARTHRITIS AND METABOLIC DISEASES, Public Health Service, Research Grant AM-5895 (A. EHRENBERG) und des SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG (P. HEMMERICH) zur Verfügung, für welche wir danken. A. EHRENBERG und P. HEMMERICH danken ferner dem STATENS NATURVETENSKAPLIGA FORSKNINGSRÅD, Schweden, für die Ermöglichung eines Studiaufenthaltes für P. HEMMERICH in Stockholm.

## SUMMARY

For a better understanding of structure and properties of heteroaromatic species involved in flavin catalysed electron transfer, an investigation has been made with suitable isoalloxazine models of flavo-coenzymes, *e. g.* 2- and 4-thio- and -imino-flavins, N- and O-alkylated flavins as well as N,N-, N,O-, O,O-dialkylated and unsubstituted leucoflavins and flavinium salts. From analyses of UV-, visible, IR- and ESR-spectra at different redox-states, pH's and solvent polarities, the following conclusions can be drawn:

1) *In the oxidised state* ("flavoquinone") flavin appears in the "diketo" form only. It is protonated at N(1). Its two "iminol-esters" (term to be preferred over "enol-ethers") do not differ markedly in the visible and UV. absorption from the parent compound, but can be differentiated by their basicities. Both are "high energy" forms of flavin, the 2-isomers being more stable than the 4-isomers.

2) *In the reduced state* ("flavohydroquinone") concentrated flavin solutions are, by long wave end-absorption, rendered more deeply coloured than in the oxidized state. The intensity of this absorption in the 500-700  $m\mu$  range appears to be a measure of molecular planarity.

The flavohydroquinone, too, occurs preferentially in the diketo form. It dissociates primarily at N(1). However, it is preferentially alkylated at the oxygen functions, its iminol-esters being relatively low in energy.

The coplanar state of flavohydroquinone must be assumed to be a vibrationally excited one. In this state the prototropic energy ("iminolisation energy") may be still lowered or even reversed in sign.

3) *The radical state* ("flavosemiquinone") appears to differ from the reduced state by its coplanarity.

3-Alkylation does not alter the properties of the radical, while 1-alkylation does so profoundly. Therefore, it is concluded that flavosemiquinone prevails in the monohydroxy (mono-iminol) form. In this respect its structure is more similar to the reduced than to the oxidized state.

The "dimerisation" of the radical (formation of "flavoquinhydrone") can be suppressed by the use of non-polar solvents as well as by the introduction of suitable substituents in the pyrimidine nucleus. This suppression goes along with suppressed disproportionation of the radical.

Institut für Anorganische Chemie an der Universität Basel

Medicinska Nobelinstitutet

Biokemiska Avdelningen Karolinska Institutet

Stockholm 60

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] VIII: P. HEMMERICH, *Helv.* **43**, 1942 (1960).
- [2] P. HEMMERICH, *Helv.* **47**, 464 (1964).
- [3] Vorläufige Mitt.: P. HEMMERICH, D. V. DERVARTANIAN, C. VEEGER & J. D. W. VAN VOORST, *Biochim. biophys. Acta* **77**, 504 (1963).
- [4] P. HEMMERICH in «Wirkungsmechanismen von Enzymen», 14. Mosbacher Colloquium der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, April 1963, S. 183, Springer-Verlag, Heidelberg.

- [5] P. HEMMERICH, Zum Verhalten des Riboflavins gegen Metallionen IV, Habilitationsschrift, Basel 1963, Publikation in Vorbereitung.
- [6] P. HEMMERICH, *Experientia* **16**, 534 (1960).
- [7] H. BEINERT, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 5323 (1956).
- [8] V. MASSEY & G. PALMER, *J. biol. Chemistry* **237**, 2347 (1962); Q. H. GIBSON, V. MASSEY & N. M. ATHERTON, *Biochem. J.* **85**, 369 (1962).
- [9] H. A. HARBURY, K. F. LA NOUE, P. A. LOACH & R. M. AMICK, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **45**, 1708 (1959).
- [10] G. KARREMAN, *Bull. math. Biophysics* **23**, 55 (1961).
- [11] B. GRABE, Diss. Uppsala 1960; *Arkiv Fysik* **17**, 97 (1960); *Biopolymers, Symposia I*, 283 (1964).
- [12] C. H. SUELTER & D. E. METZLER, *Biochim. biophysica Acta* **44**, 23 (1960).
- [13] P. BAMBERG & P. HEMMERICH, *Helv.* **44**, 1001 (1961).
- [14] G. ERIKSSON & A. EHRENBERG, *Acta chem. scand.*, im Druck.
- [15] Vorl. Mitt.: F. MÜLLER, P. HEMMERICH & H. ERLÉNMEYER, *Experientia* **18**, 498 (1962).
- [16] E. C. SLATER, A. KEMP JUN. & J. M. TAGER, *Nature* **201**, 781 (1964).
- [17] H. BEINERT in «*The Enzymes*», Academic Press, New York und London 1960, S. 358.
- [18] P. HEMMERICH, B. PRIJS & H. ERLÉNMEYER, *Helv.* **43**, 372 (1960).
- [19] H. OTT, A. J. FREI & A. HOFMANN, *Tetrahedron* **19**, 1675 (1963).
- [20] L. G. WHITBY, *Biochem. J.* **54**, 437 (1953).
- [21] P. CERLETTI & N. SILIPRANDI, *Arch. Biochem. Biophysics* **76**, 214 (1958).
- [22] L. MICHAELIS & G. SCHWARZENBACH, *J. biol. Chemistry* **123**, 538 (1938).
- [23] G. WEBER, *Biochem. J.* **47**, 114 (1950).
- [24] R. KUHN & TH. WAGNER-JAUREGG, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **66**, 1577 (1933).
- [25] A. EHRENBERG, *Arkiv Kemi* **19**, 97 (1962).
- [26] A. EHRENBERG, *Arkiv Kemi* **19**, 119 (1962).
- [27] P. HEMMERICH, B. PRIJS & H. ERLÉNMEYER, *Helv.* **42**, 1604 (1959).
- [28] H. H. FALL & H. G. PETERING, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 377 (1956).
- [29] W. S. McNUTT, *J. biol. Chemistry* **210**, 511 (1954).
- [30] R. KUHN & K. REINEMUND, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **67**, 1932 (1934).
- [31] P. HEMMERICH, Metallkomplexbildung und nukleophile Addition bei 8-Alkyl-4-pteridonen, Proc. III. Intern. Pteridin-Symposium, Stuttgart 1962, Pergamon Press, London, im Druck.

---

### Errata

*Helv.* **47**, 1008 (1964), Abhandlung Nr. 110 von C. A. GROB, H. P. FISCHER, W. RAUDENBUSCH & J. ZERGENYI, soll es zweite Zeile von unten bis S. 1009 zweite Zeile von oben lauten: «indem das Verhältnis der RG Äthyl/Methyl 60, jenes von Isopropyl/Äthyl noch 13 und jenes von *t*-Butyl/Isopropyl nur noch 1,1 beträgt. Dasselbe gilt für *anti*-Alkyl-phenylketonoxim-tosylate **7** (Tab. 2), bei welchen das Verhältnis *t*-Butyl/Isopropyl 1,2 beträgt<sup>8)</sup>». – S. 1013, Fussnote 15, lies «Imino-diazonium-Ionen **30**, X =  $-\text{N}\equiv\text{N}^{\oplus}$ », statt R =  $\text{N}\equiv\text{N}^{\oplus}$ .

---