

gramme wird wiederum die Lichtdurchlässigkeit gemessen. Auf den erhaltenen Diagrammen werden nun die Pikhöhen ausgemessen und auf der Graukeilkurve der zugehörige  $\log E$  abgelesen, der auf der Eichkurve die Konzentration an 3,4-Benzpyren in mg/100 ml Lösung ergibt. Dieser Wert muss noch mit dem Faktor der Fleckengrößen aus der Konzentrationsreihe und dem gemessenen Chromatogrammfleck multipliziert werden, wobei der Mittelwert aus Vorder- und Rückseite ermittelt wird; das gleiche gilt für die Lichtdurchlässigkeit. Der so erhaltene Wert ergibt nach Umrechnung der aufgetragenen Mengen, nämlich 100  $\mu$ l auf dem Chromatogramm und 5  $\mu$ l auf der Verdünnungsreihe, die wahre Konzentration in mg/100 ml Lösung.

Werden bei der Bestimmung immer die gleiche Anlage benutzt und die Belichtungseinheiten eingehalten, so lässt sich die Eichkurve für weitere Bestimmungen verwenden. Im anderen Fall müssen Graukeil und Eichkurven neu ermittelt werden.

Wir danken der Abteilung Wissenschaftliche Fotografie der Farbenfabriken BAYER AG, Leverkusen, insbesondere den Herren Dres. KLEIN, EGGERS und LANGNER, die freundlicherweise die photometrischen Messungen durchgeführt haben.

#### ZUSAMMENFASSUNG

3,4-Benzpyren wird auf Chromatogrammen durch gleichzeitige Messung von Fluoreszenzintensität und Fleckengröße bestimmt, wodurch die bei alleiniger Berücksichtigung der Fleckengröße auftretenden, erheblichen Fehler vermieden werden.

Heinz Kastien, Gasshof  
6014 Littau/Luzern

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] R. FISHER, *Nature* 161, 764 (1948).  
 [2] A. PIETZSCH, Die Papierchromatographie cancerogener Kohlenwasserstoffe, *Pharmazie* 7, 24 (1957).  
 [3] TH. WIELAND & W. KRACHT, *Angew. Chem.* 69, 5, 172 (1957).

### 273. Thione, Imine, Oxime und Azine des Riboflavins Nucleophile Substitutionsreaktionen am Flavinkern<sup>1)</sup>

Studien in der Flavinreihe, 10. Mitteilung<sup>2)</sup>

von F. Müller<sup>3)</sup> und P. Hemmerich

(12. VIII. 66)

Die Vielfalt der möglichen Flavocoenzym-Wirkungsmechanismen im breiten Spektrum der bekannten Flavoproteine zeigt sich in den jüngsten synoptischen Darstellungen [1a] [2] komplexer denn je. Zum Verständnis des Chemismus der Flavin-abhängigen biologischen Oxydation gibt es erst wenige Anhaltspunkte [2]. Dies ist zweifellos

<sup>1)</sup> Zur Nomenklatur: Flavin = Isoalloxazin = 10-substituiertes Benzo[g]pteridin-2,4-dion.

<sup>2)</sup> Vorläufige Mitteilung: [1]; 9. Mitteilung dieser Reihe vgl. [9].

<sup>3)</sup> Derzeitige Adresse: Medicinska Nobelinstitutet, Biokerniska avdelningen, Solnavägen 1, Stockholm 60, Schweden.

<sup>4)</sup> Teilauszug aus der Diss. F. MÜLLER, Basel 1964.

unter anderem darauf zurückzuführen, dass für Studien am proteinfreien Flavin-Modell nur äusserst hydrophile Flavinderivate zur Verfügung standen, nämlich Flavinmononucleotid (FMN), Flavinadeninucleotid (FAD) und Riboflavin (Vitamin B<sub>2</sub>). Demgegenüber ist aber das Aktivzentrum vieler, wenn nicht der meisten Flavinproteine als eher lipophiles Milieu anzusprechen: Dies kommt zum Beispiel drastisch beim Spektrum der Dihydroliponamid-Dehydrogenase (vgl. z. B. [3]) zum Ausdruck, welches mit dem Spektrum des in Chloroform gelösten Flavin-Chromophors identisch ist, jedoch von demjenigen in wässriger Lösung stark abweicht [4].

Ein tieferes Verständnis von Struktur und Reaktivität des proteingebundenen Flavins verlangt daher lipophile Modellflavine. Eine solche Abänderung kann verwirklicht werden durch Einführung unpolarer Seitenketten in die Molekeln der natürlichen Flavine oder durch Abwandlung ihrer funktionellen Gruppen unter Erniedrigung von deren Polarität.

In Weiterverfolgung unserer Vorarbeiten [5-7] konnten wir nun beliebige Reste in den Pyrimidonteil des Flavinkerns (I) in 2- und 4-Stellung einführen, und zwar sowohl in der Lumiflavin-Reihe (I, R'' = CH<sub>3</sub>) wie in der Riboflavin-Reihe (I, R'' = Ribityl). Diese Synthesen werden derzeit auf die Flavinmononucleotid-Reihe (I, R'' = Ribityl-5-phosphat) ausgedehnt [8].

In der vorliegenden Arbeit werden die Synthesen und chemischen Eigenschaften dieser neuen Flavine beschrieben. Ihre optischen Daten haben wir schon gemeinsam mit DUDLEY & EHRENBURG [9] mitgeteilt und interpretiert; weiterhin wurde mit McCORMICK & ARSENIS [10] über ihre enzymatische Phosphorylierung berichtet. Untersuchungen sind im Gange über die aus der Elektronenspinresonanz-Hyperfeinaufspaltung abzuleitenden Strukturen der analogen Flavosemichinone<sup>5)</sup> sowie über die Elektronenspinresonanz der zugehörigen Flavochinon-Triplettzustände [11]. Die neuen Flavine eignen sich vornehmlich zum Studium der Metallchelate der analogen Flavosemichinone (diesbezügliche optische Daten, s. Übersicht in [12]).

Unsere Synthesen gehen von den tiefroten Thioflavinen II<sub>2</sub> und II<sub>4</sub><sup>6)</sup> aus. II<sub>2</sub> wird durch Kondensation aus 2-Thiobarbitursäure erhalten [5], II<sub>4</sub> durch selektive Sulphydrierung von I. Beide Thioflavine werden leicht oxydativ unter quantitativer Rückbildung von I entschweifelt (s. Formelschema).

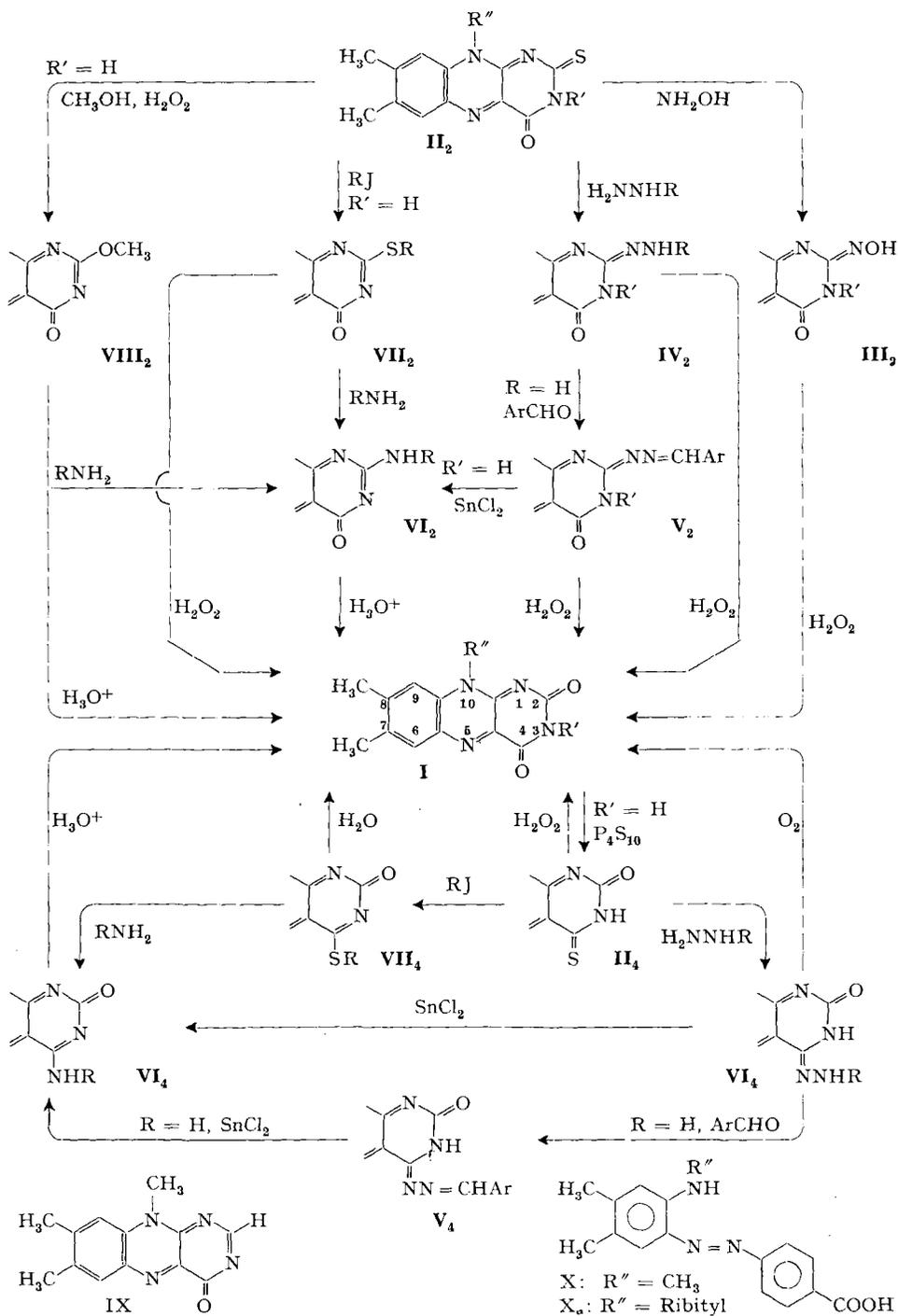
Hydroxylamin und Hydrazine H<sub>2</sub>NNR<sub>2</sub> ersetzen den Schwefel in II unter Bildung der Flavoxime III und Flavohydrazone IV, welche letztere im Falle R = H mit Aldehyden die Flavazine V ergeben. Alle diese Flavin-Derivate sind als Neutralkörper tiefviolett bis blau gefärbt. III und IV sind nur in Form ihrer Salze beständig: Die freien Basen disproportionieren sich langsam, was darauf schliessen lässt, dass es sich um eine Hydridverschiebung aus der Oxim- resp. Hydrazon-Gruppe in den Kern handelt, wonach der Kern autoxydiert und der Substituent durch Hydrolyse entfernt wird unter Rückbildung von I. Die Azine V und die Hydrazone IV lassen sich mit SnCl<sub>2</sub> in Salzsäure zu den Iminen VI (R = H) reduzieren.

Die Thione III<sub>2</sub> reagieren, anders als mit CO-Reagentien, mit «harten» Basen [13] wie z. B. Ammoniak nur schlecht. Die Umsetzung wird jedoch möglich, wenn man die

<sup>5)</sup> Wir bezeichnen die Flavin-Oxydationsstufen durchgängig als Flavochinon, Flavosemichinon, Flavohydrochinon. Zur Spinverteilung in Flavosemichinonen vgl. EHRENBURG, ERIKSSON & MÜLLER in [2], S. 37.

<sup>6)</sup> Zur Erklärung der Formelnummern, z. B. IV<sub>2a</sub>, vgl. Legende des Formelschemas.

## Formelschema

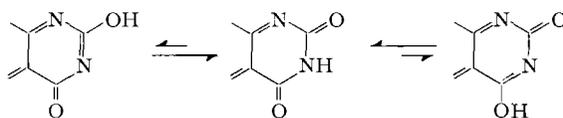


Das Formelschema ist so abgefasst, dass möglichst viele analoge Verbindungen durch die gleiche Formel ausgedrückt werden können. Die Indices 2 und 4 kennzeichnen den Substitutionsort an den betreffenden Flavinen, die Indices a, b, c kennzeichnen die Substituenten in 3- und 10-Stellung: a = Lumiflavinderivat ( $R'' = \text{CH}_3$ ,  $R' = \text{H}$ ), b = Alkyl-Lumiflavinderivat ( $R'' = R' = \text{CH}_3$ ), c = Riboflavinderivat ( $R'' = \text{CH}_2(\text{CHOH})_3\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $R' = \text{H}$ ). Für die Amine IV ist nur die – im unsubstituierten Fall bevorzugte – Amino-Tautomerform angegeben.

Thione II zuvor in die entsprechenden Thioester VII überführt. Diese Alkylierungen verlaufen unter Ausschluss von Wasser bei Raumtemperatur und im Falle von  $\text{II}_2$  sogar ohne Basenkatalyse. Dabei tritt bei  $\text{II}_2$  entgegen früheren Annahmen [6] aus unserem Laboratorium<sup>7)</sup> keine N(3)-Alkylierung ein. 3-Alkylderivate, z. B.  $\text{II}_{2a}$ , lassen sich jedoch durch direkte Kondensation aus 1-Methyl-2-thioarbitursäure gewinnen.

Die Thioester VII, die S-Alkylthioflavine oder Alkylmercapto-desoxyflavine darstellen, sind die ersten stabilen Flavine mit einer streng einwertigen Funktion im Pyrimidin-Teil. Aus derselben Verbindungsreihe haben wir inzwischen auch O-Alkylflavine  $\text{VIII}_2$  [14] [15] erhalten, ferner haben wir das Desoxyflavin  $\text{IX}_2$  [15] dargestellt. Alle diese Flavinderivate sind durch ihre Basizität gekennzeichnet: Schon in verdünnter Essigsäure sind sie vollständig protoniert und können daher von den spektral ähnlichen Stammkörpern I leicht unterschieden werden. Wir bezeichnen sie als «aktive» Flavine, da die Flavin-OR- resp. Flavin-SR-Gruppen wie aktive Ester reagieren.

Aus dieser Tatsache folgt, dass die prototrope Energie für die Umwandlungen



sehr gross sein muss. Iminol-Tautomere liefern somit zur Struktur der Flavochinone<sup>5)</sup> keinen Beitrag.

Im allgemeinen sind die 2-ständig abgewandelten Flavine stabiler als ihre 4-Isoomeren. Alle hier beschriebenen Flavin-Derivate gehen jedoch unter milden Bedingungen – saure Hydrolyse (VI) oder Luftoxydation – wieder in die Stammkörper I über. Dies ist von grossem Interesse im Zusammenhang mit dem bisher noch nicht strukturell abgeklärten Flavocoenzym der Bernsteinsäuredehydrogenase, welches kovalent am Apoprotein haftet und weder hydrolytisch noch oxydoreduktiv zu einem bekannten Flavinderivat abgebaut werden kann. Die von WANG & WANG [16] vorgeschlagene Coenzym-Apoprotein-Fixierung über die Flavinstellung 4 kann nach Kenntnis der hier beschriebenen Flavinderivate und ihrer Reaktivität nicht zutreffen. Angesichts der Resultate von KEARNEY [17], WANG & WANG [16] und der hier vorliegenden scheint daher nur noch eine Protein-Fixierung des Bernsteinsäuredehydrogenase-Flavocoenzym über den benzoiden Flavinteilern, d.h. die Stellungen 6–9, möglich, von welchen angesichts der chemischen Reaktivität der 8-Methylgruppe [18] Stellung 8 am wahrscheinlichsten ist.

<sup>7)</sup> Wir sind Prof. W. PFLEIDERER, Techn. Hochschule Stuttgart, für den Hinweis auf diese Fehlinterpretation zu grossem Dank verpflichtet.

Wir danken dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG für die gewährte materielle Hilfe. Herrn Professor Dr. H. ERLIENMEYER danken wir für das Interesse, das er dieser Arbeit entgegenbrachte. Die Mikroanalysen verdanken wir dem mikroanalytischen Laboratorium der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel (Dr. W. PADOWETZ).

## Experimenteller Teil

### 1. Allgemeines

1.1. *Zur Dünnschichtchromatographie*: Als chromatographisch rein wurden Substanzen angesehen, die im Sichtbaren und im UV. nur einen einzigen Fleck zeigten. Als chromatographisch identisch wurden Substanzen gleicher Farbe und Fluoreszenz betrachtet, wenn sie in mindestens 3 Fließmittelgemischen den gleichen Rf-Wert zeigten. Als stationäre Phase wurde MN-Kieselgel S<sup>8</sup>) verwendet.

Angewandte Fließmittelgemische: A: *n*-Butanol/Eisessig/Wasser = 6:2:2; B: *n*-Butanol/Äthanol/Wasser = 6:2:2; C: *n*-Butanol/Äthanol/2N NH<sub>3</sub> = 6:2:2.

1.2. *Spektren*: Im Bereich 700–200 nm mit einem Spektrophotometer BECKMAN DB aufgenommen, in 0,1M Pufferlösungen und zwar Phosphat (pH 7), Acetat (pH 5), Borat (pH 9), Sulfat (pH 2), NaOH (pH 13); S = Schulter. IR.-Spektren in KBr-Presslingen mit einem Gerät BECKMAN IR8 aufgenommen.

1.3. *Die Smp.* wurden auf einem KOFLER-Block bestimmt und sind korrigiert.

1.4. *Dissoziationskonstanten*: Die  $pK_a$ -Werte wurden in 0,1N NaClO<sub>4</sub> bei 20° ± 1° durch Titration mittels eines METROHM-Combitrators mit Glaselektrode XU 100 bestimmt.

### 2. Synthesen

2.1. *2-Thiolumiflavin (II<sub>2a</sub>)*: Modifikation der Lit.-Vorschrift [5]. In einen 500-ml-Sulfierkolben mit Rührer, Kühler, Kontaktthermometer und N<sub>2</sub>-Zuführung werden 150 ml Eisessig und 4 g Azosäure X [5] eingeführt und mit einem Thermostat auf 53° vorgewärmt. Nach 5 Min. gibt man 3 g 2-Thiobarbitursäure (FLUKA, St. Gallen) zu und lässt 3 Std. reagieren. Hierauf filtriert man das Gemisch noch warm, wäscht den Niederschlag mit wenig Eisessig und Äther und trocknet 3 Std. im Vakuum; 4,0 g braunviolett Pulver, Zersetzung bei 238°. Dünnschichtchromatogramm A zeigte 2 Komponenten, X und II<sub>2a</sub>, in ungefähr gleichen Teilen. II<sub>2a</sub> ist im System A violett, ohne Fluoreszenz, beim Stehen an der Luft gelb (autox. Entschwefelung), mit grüner Fluoreszenz. Aus dem Filtrat lässt sich durch Zufügen von 10 ml 60-proz. HClO<sub>4</sub> nach 12stündigem Stehen bei 0° 0,6 g Azosäure-perchlorat (X-Perchlorat) in schönen violetten Kristallen zurückgewinnen.

2 g der Verbindung (X + II<sub>2a</sub>) werden mit 50 ml 100-proz. HCOOH auf 50–60° erwärmt. Die klare rotbraune Lösung versetzt man mit dem gleichen Volumen Äther und lässt zunächst bei 0°, dann bei –15° stehen. Man filtriert die ausgeschiedenen rostbraunen Nadeln ab und wäscht sie gut mit Äther; 0,9 g II<sub>2a</sub>-Formiat, welches bei 200° HCOOH verliert und sich bei 300° zersetzt. Aus der Mutterlauge scheiden sich nach Zufügen von 5 ml 60-proz. HClO<sub>4</sub> und 12stündigem Stehen bei 0° 1,2 g X-Perchlorat ab: Gesamtausbeute an II<sub>2a</sub> = 73% d. Th. bezogen auf verbrauchte Azosäure X.

Die Base wird aus dem Salz durch Digerieren mit NaHCO<sub>3</sub> aq. in rotvioletten Nadeln erhalten. Sie löst sich gut in Chloroform und in wässrigen Basen, ist mässig löslich in Alkoholen und Eisessig und unlöslich in Äther. IR.-Spektrum:  $\nu$ NH(3) 3060;  $\nu$ CO(4) 1710 cm<sup>-1</sup>; kein  $\nu$ CO (2).

Spektren: in CHCl <sub>3</sub> :	$\lambda_{max}$ 508, 392, 324 nm
in 6N HCl (als Kation):	$\lambda_{max}$ 442, 288, nm
bei pH 13 (als Anion):	$\lambda_{max}$ 496, 372, 300 nm
bei pH 7 :	$\lambda_{max}$ 494, 354, 318 nm

C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>ON<sub>4</sub>S, HCOOH (318,4) Ber. N 17,6 S 10,0% Gef. N 17,2 S 9,7%

2-Thiolumiflavin wird leicht oxydiert. In peroxidhaltiger alkalischer Lösung geht es sehr rasch unter Entschwefelung in Lumiflavin (Ia) über, wobei die anfangs rote Lösung in rascher

<sup>8</sup>) Produkt der MACHEREY, NAGEL & Co., 516 Düren (Deutschland).

Folge violett, blaugrün, dunkelbraun und schliesslich gelb wird. Diese Reaktion tritt schon bei längerem Stehen an der Luft ein.

2.2. *3-N-Methyl-2-thio-lumiflavin* ( $II_{2b}$ ): In einem 100-ml-Sulfierkolben mit Rührer, Kühler, Kontaktthermometer und  $N_2$ -Zuführung werden 1,2 g Azosäure X in 30 ml Eisessig auf  $53^\circ$  vorgewärmt, dann gibt man 0,9 g N-Methylthiobarbitursäure [19] zu. Nach 4 Std. Rühren bei dieser Temperatur werden die abgeschiedenen Kristalle heiss filtriert und mit Äthanol und mit Äther gut gewaschen: 0,9 g (79%) braune Nadeln. Aus wässriger HCOOH Kristalle vom Smp.  $262-266^\circ$ . (Aus dem Filtrat lassen sich 0,15 g Azosäure X zurückgewinnen.) Gut löslich in Benzol, Essigester, Chloroform, Methanol und Eisessig; unlöslich in Alkali. IR.-Spektrum:  $\nu$  CO (4)  $1680\text{ cm}^{-1}$ ; kein  $\nu$ CO(2).

Spektren: bei pH 7:  $\lambda_{max}$  494, 400, 308, 268 nm; in 6N HCl (als Kation):  $\lambda_{max}$  430, 284 (S), 272 nm.

$C_{14}H_{14}ON_4S, H_2O$	Ber. C 55,2	H 5,2	N 18,4	S 10,5%
(304,2)	Gef. „ 55,1	„ 5,2	„ 18,4	„ 10,5%

In 2N HCl/Äthanol oder  $C_6H_6/CH_3COOH$  entsteht mit wenig Perhydrol unter Farbwechsel von rot nach gelb 3-Methylumiflavin (Ib), welches dünnschichtchromatographisch in den Systemen A, B und C mit authentischem Material identisch ist.

2.3. *2-Thioriboflavin* ( $II_{2c}$ ): Die Darstellung erfolgt mit Xa unter den Bedingungen der Darstellung von 2-Thiolumiflavin ( $II_{2a}$ ), aber mit 8 Std. Reaktionsdauer. Das rotviolette Rohprodukt behandelt man 20 Min. bei Raumtemperatur unter Rühren mit 50 ml 1N  $NaHCO_3$ , um die noch vorhandene 2-Thiobarbitursäure zu entfernen. Hierauf filtriert man und wäscht gut mit  $H_2O$ , Äthanol und Äther. Man erhält so 64,2% Ausbeute (berechnet auf verbrauchte Azosäure) analysenreines  $II_{2c}$  von rotvioletter Farbe. Smp.  $288-291^\circ$ . Aus dem Filtrat lassen sich durch Verdünnen mit 3fachem Volumen  $H_2O$  6,5 g Ribitylazosäure (Xa) zurückgewinnen.  $II_{2c}$  lässt sich aus 6N HCl durch Verdünnen mit  $H_2O$  umfällen; es weist dieselben chemischen und optischen Eigenschaften auf wie  $II_{2a}$ , ist jedoch wenig löslich in den meisten Solventien, mit Ausnahme von starken Basen oder Säuren.

$C_{17}H_{20}O_5N_4S, \frac{1}{2}H_2O$	Ber. C 51,2	H 5,2	N 14,0	S 7,9%
(401,5)	Gef. „ 51,3	„ 5,1	„ 14,0	„ 7,9%

2.4. *4-Thiolumiflavin* ( $II_{4a}$ ): Die Reaktion hängt sehr von der Qualität des verwendeten  $P_4S_{10}$  ab. Die nachstehende Vorschrift ist besser reproduzierbar als die früher [6] angegebene. 3 g fein pulverisiertes Lumiflavin ( $I_a$ ), in 300 ml abs. Pyridin suspendiert, werden unter Rühren und  $N_2$ -Zufuhr in einem 500-ml-Sulfierkolben zum Rückfluss erhitzt. Hierauf fügt man in kleinen Portionen innert 2 Min. 20 g aus  $CS_2$  kristallisiertes  $P_4S_{10}$  zu und kocht 4 Std. unter Rückfluss im Stickstoffstrom. In Abständen von 30 Min. werden Proben entnommen, die mit 2N HCl angesäuert und mit Chloroform extrahiert werden. Das Dünnschichtchromatogramm (System A) weist anfangs 2 Flecke auf, nämlich  $I_a$  und  $II_{4a}$ . Mit fortschreitender Reaktion verschwindet  $I_a$ , dagegen treten 2 neue Komponenten auf: Ein schnell wandernder violetter Fleck (nicht identifiziert) und das Isomere  $II_{2a}$ . Lässt man die Reaktion länger als 4 Std. laufen, so entsteht auf Kosten von  $II_{4a}$  mehr der violetten, unbekanntenen Komponente. Andererseits entstehen bei Überhitzung des Gemisches weniger  $II_{4a}$  und mehr  $II_{2a}$ . Nach beendeter Reaktion destilliert man das Pyridin im Vakuum ab, säuert den Kolbeninhalt mit 2N HCl an, filtriert den Niederschlag ab und wäscht ihn mit Wasser. Das Filtrat wird verworfen. Der Rückstand wird in 2N NaOH gelöst und mit Celit filtriert. Das rote Filtrat säuert man mit 2N Essigsäure an und extrahiert es so lange mit Chloroform bis letzteres sich nur noch gelborange färbt. Die vereinigten Chloroformlösungen (ca. 2 l) trocknet man mit  $Na_2SO_4$ , engt sie im Vakuum auf ca. 70 ml ein und lässt bei  $-15^\circ$  stehen. Im Verlaufe von 12 Std. kristallisieren 0,8 g (26%) analysenreines 4-Thiolumiflavin ( $II_{4a}$ ) in Form von violetten Würfeln. Smp.  $267-274^\circ$ . Mässig löslich in Chloroform, gut löslich in NaOH dil. IR.-Spektrum:  $\nu$ NH(3)  $2860$ ;  $\nu$ CO(2)  $1650\text{ cm}^{-1}$ ; kein  $\nu$ CO(4).

Spektren: in 6N HCl (als Kation):	$\lambda_{max}$ 444, 364, 272 nm
bei pH 7:	$\lambda_{max}$ 530(S), 494, 368, 274 nm
in $CHCl_3$ :	$\lambda_{max}$ 540(S), 498, 364, 280 nm

$C_{13}H_{12}ON_4S$ (272,4)	Ber. C 57,3	H 4,4	S 11,7%	Gef. C 57,2	H 4,5	S 11,7%
-----------------------------	-------------	-------	---------	-------------	-------	---------

$II_{4a}$  ist im Chromatogramm weniger oxydationsempfindlich als  $II_{2a}$ . In peroxidhaltiger NaOH wird 4-Thiolumiflavin ( $II_{4a}$ ) zu Lumiflavin ( $I_a$ ) entschweifelt.

2.5. *2-Oximinolumiflavin (III<sub>2a</sub>)*: 1 g II<sub>2a</sub> und 1,5 Äq. Hydroxylamin-hydrochlorid werden in 70 ml abs. Dimethylformamid gelöst und mit 1 ml Triäthylamin versetzt. Man erwärmt kurz auf 50°, lässt 4 Std. bei Raumtemperatur stehen und filtriert hierauf vom gebildeten Niederschlag ab: 0,9 g (94%) violettes Pulver, das aus Alkohol/20-proz. HClO<sub>4</sub> III<sub>2a</sub>-Perchlorat in gelben hygroscopischen Polyedern liefert.

Spektren: in 2N HCl (als Kation):  $\lambda_{max}$  456, 382, 274 nm  
in CHCl<sub>3</sub>/Et<sub>3</sub>N (99:1):  $\lambda_{max}$  526, 294 nm

C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>O<sub>2</sub>N<sub>5</sub>·HClO<sub>4</sub> Ber. C 42,0 H 3,8 N 18,8 Cl 9,5%  
(371,8) Gef. „ 42,2 „ 3,7 „ 18,8 „ 9,4%

Bei 3stdg. Behandlung bei 60° in 2N HCl wird III<sub>2a</sub> quantitativ zu I<sub>a</sub> verseift. III<sub>2a</sub> ist in neutraler wässriger Lösung nicht beständig; es ist sehr alkaliempfindlich und lässt sich aus einer Chloroform/Methanol-Lösung mit verd. Natronlauge extrahieren (violette Farbe).

2.6. *2-Lumiflavinhydrazon (IV<sub>2a</sub>, R = H)*: Eine Lösung von 2 g VII<sub>2a</sub> in 70 ml Dimethylformamid und 4 ml Hydrazinhydrat wird 3 Std. bei Raumtemperatur in einer Schlifffbirne geschüttelt, danach mit gleichem Volumen Äther versetzt und filtriert: 1,5 g (79%) dunkelviolettes Pulver. Bei der Kristallisation aus Pikrinsäure-gesättigtem Alkohol erhält man gelborange Polyeder von IV<sub>2a</sub> (R = H)-Pikrat. Das Perchlorat wird analog durch Kristallisation aus HClO<sub>4</sub> aq./Alkohol erhalten; sehr hygroscopisch.  $pK_{LH^+}^H = 5,66$ .

Spektren: in 6N HCl (als Dikation):  $\lambda_{max}$  396, 284(S), 266 nm  
in 2N CH<sub>3</sub>COOH (als Kation):  $\lambda_{max}$  462, 374, 282 nm  
in CHCl<sub>3</sub>/Et<sub>3</sub>N (99:1):  $\lambda_{max}$  512, 296 nm

C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>ON<sub>6</sub>·C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>O<sub>7</sub>N<sub>3</sub> (499,4) Ber. C 45,7 H 3,4 N 25,3% Gef. C 46,2 H 3,6 N 25,3%

VI<sub>2a</sub> (R = H) ist in wässriger Lösung bei pH 7 nicht stabil und wird von Alkali unter vorübergehender Blaufärbung zerstört. VI<sub>2a</sub> (R = H) kann auch direkt aus II<sub>2a</sub> nach obiger Vorschrift erhalten werden, jedoch in schlechterer Ausbeute.

2.7. *2-Isonicotinoylhydrazinolumiflavin (IV<sub>2a</sub>, R = COC<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N)*: 1 g II<sub>2a</sub> und 1,5 Äq. Isonicotinsäurehydratid lässt man in 70 ml abs. Dimethylformamid über Nacht bei Raumtemperatur stehen, versetzt das Gemisch mit dem gleichen Volumen Äther und filtriert: 0,9 g (69%). Nach Umkristallisation aus verd. HClO<sub>4</sub>, IV<sub>2a</sub>-Perchlorat, Smp. 300°.

Spektren: in 2N HCl (als Dikation):  $\lambda_{max}$  438, 410, 272 nm  
in 2N NaOH:  $\lambda_{max}$  518, 342 nm  
bei pH 5 (als Monokation):  $\lambda_{max}$  512, 346 nm

C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>·2 HClO<sub>4</sub> Ber. C 39,5 H 3,3 N 17,0 Cl 12,3%  
(576,4) Gef. „ 39,1 „ 3,4 „ 16,9 „ 12,3%

2.8. *2-Lumiflavin-thiosemicarbazon (IV<sub>2a</sub>, R = CSNH<sub>2</sub>)*: Hergestellt wie oben; 0,5 g VII<sub>2a</sub> und 1,5 Äq. Thiosemicarbazid ergeben 0,45 g (77,2%). Aus Alkohol braunschwarze Kristalle. Smp. 284–286°. IV<sub>2a</sub>-Perchlorat erhält man als orangefarbene Polyeder bei der Kristallisation aus Alkohol/60-proz. HClO<sub>4</sub>. IV<sub>2a</sub> löst sich mit violetter Farbe in Chloroform.

C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>ON<sub>7</sub>S<sub>1/2</sub>·H<sub>2</sub>O (338,4) Ber. C 49,8 H 4,7 S 9,5% Gef. C 49,7 H 5,0 S 9,8%

2.9. *2-Lumiflavin-p-Nitrophenylhydrazon (IV<sub>2a</sub>, R = C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-NO<sub>2</sub> (p))*: Darstellung wie oben. 0,5 g VII<sub>2a</sub> und 1,5 Äq. p-Nitrophenylhydratin ergeben 0,4 g (79%) als braunschwarzes Pulver. Zur Analyse aus 20-proz. HClO<sub>4</sub>/Alkohol umkristallisiert: gelbbraune Polyeder des Perchlorats vom Zersp. 193°.

C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>O<sub>3</sub>N<sub>7</sub>·HClO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O Ber. C 43,3 H 4,1 N 18,5 Cl 6,7%  
(527,85) Gef. „ 43,6 „ 3,7 „ 18,5 „ 7,0%

2.10. *N-Pyridiniumacetylhydraton des Lumiflavins (IV<sub>2a</sub>, R = COCH<sub>2</sub>NC<sub>5</sub>H<sub>5</sub>)*: Eine Lösung von 0,6 g VII<sub>2a</sub> in 40 ml Dimethylformamid wird zu einer Lösung von 1,5 Äq. N-Pyridiniumacetylhydratid-chlorid in 2 ml H<sub>2</sub>O gegeben. Nach einem Tag Stehen bei Raumtemperatur wird

filtriert; 0,6 g (95%) braune Polyeder vom Smp. 255–260°. Aus Alkohol/20-proz. HClO<sub>4</sub> gelbbraune Polyeder von IV<sub>2a</sub>-Perchlorat.  $pK_{LH^+}^H = 9,3$ .

Spektren: in 2N HCl (als Dikation):	$\lambda_{max}$ 430, 390, 265 nm
bei pH 5 (als Kation):	$\lambda_{max}$ 490, 305 nm
in 2N NaOH (als Zwitterion):	$\lambda_{max}$ 528, 300 nm
C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub> N <sub>7</sub> , HClO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	Ber. C 39,4 H 3,7 N 16,1 Cl 11,8%
(608,4)	Gef. „ 39,3 „ 3,7 „ 16,2 „ 11,8%

2.11. 3-N-Methyl-lumiflavin-2-hydrazon (IV<sub>2b</sub>, R = H): 3 g II<sub>2b</sub>, in 50 ml abs. Dimethylformamid gelöst, werden mit 5 ml Hydrazinhydrat 2 Std. auf 50° erwärmt. Hierauf lässt man 12 Std. bei Raumtemperatur stehen, verdünnt mit gleichem Volumen Äther und filtriert; 2,1 g (70,5%) violette Kristalle. Aus Alkohol/60-proz. HClO<sub>4</sub> orangefarbene Polyeder.

Spektren: in 2N CH <sub>3</sub> COOH (als Kation):	$\lambda_{max}$ 461, 368, 280 nm
bei pH 5	$\lambda_{max}$ 509, 301 nm

C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>ON<sub>6</sub>, HClO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O (402,8) Ber. C 41,8 H 4,7 Cl 8,9% Gef. C 41,8 H 4,7 Cl 9,1%

Die Verbindung ist nur als Salz längere Zeit beständig.

2.12. 2-Riboflavin-isonicotinoylhydrazon (IV<sub>2c</sub>, R = COC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>N): 0,2 g VII<sub>2c</sub> werden in 5 ml abs. Dimethylformamid mit 1,5 Äq. Isonicotinoylhydrazin 2 Std. auf 50° erwärmt, dann wird mit dem gleichen Volumen Aceton verdünnt und vom violettschwarzen Niederschlag filtriert. Der Rückstand wird in 20-proz. HClO<sub>4</sub> aufgenommen, die Lösung mit Kohle filtriert, mit NaHCO<sub>3</sub> aq. auf pH 7 gestellt und mit gleichem Volumen Aceton verdünnt. Bei 12 Std. Stehen bei 0° scheiden sich 0,15 g (52%) dunkelviolette Polyeder ab.

C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>O<sub>6</sub>N<sub>7</sub>, HClO<sub>4</sub> (595,5) Ber. C 46,5 H 4,4 N 16,4% Gef. C 46,5 H 4,5 N 16,3%

2.13. 4-Lumiflavinhydrazon (IV<sub>4a</sub>, R = H): 0,1 g II<sub>4a</sub> werden in 10 ml Hydrazinhydrat unter Rühren 15 Min. auf 50° erwärmt. Der dunkelviolette Niederschlag wird filtriert und mit Alkohol und Äther gut gewaschen; 0,09 g (89%). Aus 60-proz. HClO<sub>4</sub>/Alkohol gelbbraune Prismen.

C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>ON<sub>6</sub>, HClO<sub>4</sub> (370,8) Ber. C 42,1 H 4,0 Cl 9,5% Gef. C 42,0 H 3,8 Cl 9,2%

IV<sub>4a</sub> ist nur als Salz beständig. In neutraler Lösung zersetzt es sich unter vorübergehender Blaufärbung.

2.14. 2-Lumiflavin-benzaldazin (V<sub>2a</sub>, Ar = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>): Darstellung wie V<sub>2a</sub> aus IV<sub>2a</sub> und frisch destilliertem Benzaldehyd. Ausbeute 65%. Zur Analyse wurde aus 2N HCl umkristallisiert: braunrote Nadeln, Zersp. 179–184°.  $pK_{LH^+}^H = 4,88$ .

Spektren: in 2N CH <sub>3</sub> COOH (als Kation):	$\lambda_{max}$ 474, 392, 320 nm
in 2N NH <sub>3</sub> :	$\lambda_{max}$ 510, 340 nm

C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>O<sub>5</sub>N<sub>6</sub>, HCl Ber. C 52,3 H 4,1 N 18,3 Cl 7,7%  
(458,9) Gef. „ 52,0 „ 4,3 „ 18,1 „ 7,5%

2.15. 2-Lumiflavin-salicylaldazin (V<sub>2a</sub>, Ar = (o)C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>OH): 1 g IV<sub>2a</sub> wird in 30 ml Gemisch 20-proz. HClO<sub>4</sub>/Alkohol = 1:1 heiss gelöst und die Lösung mit einigen Tropfen frisch destilliertem Salicylaldehyd versetzt. Beim Anreiben fallen sofort rotorange Kristalle aus. Die Mischung wird noch heiss filtriert und der Niederschlag mit Alkohol und Äther gewaschen; 1,2 g (68,2%). Smp. 293–295°. V<sub>2a</sub> lässt sich aus Äthanol/20-proz. HClO<sub>4</sub> umkristallisieren.

C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub>N<sub>6</sub>, HClO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O Ber. C 48,6 H 4,2 N 16,6 Cl 7,4%  
(492,9) Gef. „ 48,7 „ 4,0 „ 16,3 „ 7,6%

2.16. 2-Lumiflavin-isonicotinaldazin (V<sub>2a</sub>, Ar = (4)C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N): Herstellung analog V<sub>2a</sub> aus IV<sub>2a</sub> und frisch dest. Isonicotinaldehyd. Ausbeute 61%, Smp. 248–250°. Aus 20-proz. HClO<sub>4</sub>/Alkohol: gelbbraune Prismen.

C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>ON<sub>7</sub>, 2HClO<sub>4</sub>, 4H<sub>2</sub>O Ber. C 36,1 H 4,1 N 15,5 Cl 11,2%  
(631,9) Gef. „ 36,4 „ 4,1 „ 15,5 „ 11,1%

2.17. 3-Methyl-2-lumiflavinbenzaldazin (V<sub>2b</sub>, Ar = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>): Eine Lösung von 0,5 g VII<sub>2b</sub> in gleichen Teilen heissem Alkohol und 20-proz. HClO<sub>4</sub> wird mit einem Tropfen frisch destilliertem

Benzaldehyd versetzt. Beim Anreiben kristallisieren sofort 0,3 g (46,6%) orangefarbene Polyeder. Smp. 268–270°.  $pK_{LH^+}^H = 5,74$ .

Spektren: in 2N HCl (als Kation):  $\lambda_{max}$  428, 398, 272 nm  
bei pH 7:  $\lambda_{max}$  508, 328 nm

$C_{21}H_{20}ON_6 \cdot HClO_4$  ((472,9) Ber. C 53,3 H 4,4 Cl 7,5% Gef. C 53,6 H 4,7 Cl 7,2%)

2.18. 2-Riboflavin-benzaldazin ( $V_{2c}$ ,  $Ar = C_6H_5$ ): Eine Suspension von 0,2 g  $II_{2c}$  in 10 ml Hydrazinhydrat wird 2 Std. bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Rühren stehengelassen. Darauf filtriert man den dunkelvioletten Niederschlag ab, wäscht ihn mit Alkohol und Äther gut nach, suspendiert ihn in heissem Alkohol und setzt solange 60-proz.  $HClO_4$  (eventuell mit wenig  $H_2O$  verdünnen) zu, bis eine klare, gelborange Lösung vorliegt. Diese filtriert man mit Kohle, fügt 1 Tropfen frisch destilliertem Benzaldehyd zu, reibt an und lässt zunächst bei Raumtemperatur und nachher bei 0° 6 Std. stehen: 0,1 g (25,7%) braune Nadeln. Zersp. 177–183°.

$C_{24}H_{26}O_5N_6 \cdot HClO_4$  (578,5) Ber. C 50,2 H 4,7 N 14,6% Gef. C 50,9 H 4,8 N 15,0%

2.19. 4-Lumiflavinbenzaldazin ( $V_{4a}$ ,  $Ar = C_6H_5$ ): 0,1 g  $IV_{4a}$  werden in 10 ml Alkohol/20-proz.  $HClO_4$  1:1 heiss gelöst. Die Lösung wird auf Raumtemperatur abgekühlt und mit einem Tropfen frisch destilliertem Benzaldehyd versetzt. Beim Anreiben fallen sofort analysenreine, gelborange Nadeln an, die filtriert und mit Alkohol gewaschen werden: 0,1 g (59%), Smp. 300°. Kann aus Alkohol/20-proz.  $HClO_4$  umkristallisiert werden.

Spektren: in 2N HCl:  $\lambda_{max}$  480 (S), 398, 264 nm  
in  $CHCl_3$ :  $\lambda_{max}$  478, 340, 274 nm  
bei pH 13:  $\lambda_{max}$  513, 500, 285 nm  
bei pH 7:  $\lambda_{max}$  490, 272 nm

$C_{20}H_{18}ON_6 \cdot HClO_4 \cdot 2H_2O$  (494,9) Ber. C 48,3 H 4,6 N 16,9% Gef. C 48,0 H 4,2 N 16,7%

2.20. 2-Lumiflavimin ( $VI_{2a}$ ,  $R = H$ ): 0,5 g  $IV_{2a}$  oder  $V_{2a}$  werden in 20 ml 4N HCl heiss gelöst und mit 2 Äq.  $SnCl_2$  in 2N HCl versetzt, wobei eine intermediäre Rotfärbung auftritt. Das Gemisch wird so lange auf 65° erwärmt, bis sich reichlich rotviolette Kristalle abscheiden. Diese werden abfiltriert, gut mit Wasser gewaschen und in 10 ml 20-proz.  $HClO_4$  suspendiert. Man fügt 2 Tropfen Perhydrol zu und erwärmt erneut, wobei man eine klare gelbe Lösung erhält. Bei 0° fallen 0,3 g (45,5%), gelbbraune, analysenreine Polyeder an. Smp. 300°. IR.-Spektrum:  $\nu_{CO(4)}$  1690  $cm^{-1}$ ; kein  $\nu_{CO(2)}$ .

Spektren: bei pH 2 (als Kation):  $\lambda_{max}$  438, 384, 274 nm  
bei pH 7:  $\lambda_{max}$  448, 358, 274 nm

$C_{13}H_{13}ON_5 \cdot HClO_4$  Ber. C 43,8 H 3,9 N 19,6 Cl 10,0%  
(355,7) Gef. „ 43,6 „ 3,9 „ 19,5 „ 10,1%

2.21. 2-Phenylimino-lumiflavin ( $VI_{2a}$ ,  $R = C_6H_5$ ): 1 g  $VII_{2a}$  wird bei Raumtemperatur in 70 ml abs. Dimethylformamid gelöst. Die Lösung wird mit 7 ml frisch destilliertem Anilin  $1\frac{1}{2}$  Std. auf 50° erwärmt. Danach reibt man das Gemisch an, lässt auf Raumtemperatur abkühlen, filtriert und wäscht den dunkelroten Niederschlag mit Äther gut aus: 0,95 g (82%). Aus Äthanol/20-proz.  $HClO_4$  orangefarbene Polyeder vom Smp. 256–259°.

Spektren: bei pH 7:  $\lambda_{max}$  470, 372, 282 nm  
in 2N HCl (als Kation):  $\lambda_{max}$  460, 396 294 nm

$C_{19}H_{17}ON_5 \cdot HClO_4$  (431,85) Ber. C 52,8 H 4,2 N 16,2% Gef. C 52,5 H 4,1 N 16,0%

Durch 4stündiges Erwärmen in 6N HCl bei 60° wurde  $VI_{2a}$  ( $R = C_6H_5$ ) zu Lumiflavin ( $I_a$ ) hydrolysiert (chromatographisch und spektroskopisch identifiziert).

2.22. 2-( $\beta$ -Hydroxyäthyl-imino)-lumiflavin ( $VI_{2a}$ ,  $R = CH_2CH_2OH$ ): Darstellung analog. 1,0 g  $VII_2$  und 5 ml Äthanolamin ergeben 0,65 g (65%). Aus Äthanol/60-proz.  $HClO_4$  gelbe Polyeder vom Smp. 267–270°.

Spektren: bei pH 7:  $\lambda_{max}$  451, 366, 275 nm  
in 2N HCl (als Kation):  $\lambda_{max}$  442, 382, 277 nm

$C_{15}H_{17}O_2N_5 \cdot HClO_4 \cdot \frac{1}{2}H_2O$  Ber. C 43,9 H 4,9 N 15,8 Cl 8,2%  
(408,8) Gef. „ 43,8 „ 4,9 „ 15,6 „ 8,2%

Das Produkt liefert bei 4stündiger Hydrolyse in 2N HCl bei 60° Lumiflavin ( $I_a$ ), in 2N NaOH hingegen entsteht nur wenig Limuflavin ( $I_a$ ) sondern zur Hauptsache ein violett fluoreszierendes Produkt (Ringöffnung?).

2.23. 2-( $\gamma$ -Dimethylamino-*n*-propyl)-imino-lumiflavin ( $VI_{2a}$ ,  $R = (CH_2)_3-N(CH_3)_2$ ): 1 g  $VII_{2a}$  wird in 20 ml Chloroform und 5 ml *N,N*-Dimethylamino-*n*-propylamin 6 Std. bei Raumtemperatur geschüttelt. Dann wird mit gleichem Volumen Äther verdünnt und filtriert: 0,85 g  $VI_{2a}$  (96%). Aus Äthanol/20-proz.  $HClO_4$  gelbe Polyeder vom Smp. 259–266°. Spektrum in 2N  $CH_3COOH$  (als Kation):  $\lambda_{max}$  440, 382, 277 nm.

$C_{18}H_{24}ON_6 \cdot 2HClO_4 \cdot H_2O$	Ber. C 38,6	H 5,0	N 15,0	Cl 12,7%
(558,9)	Gef. ,, 38,5	,, 4,7	,, 15,0	,, 12,7%

2.24. 2-Morpholino-2-desoxy-lumiflavin (struktur analog zu  $VI_{2a}$ ): Herstellung analog. Erhalten 0,65 g (57%) aus 1 g  $VII_{2a}$  und 5 ml Morpholin. Aus Äthanol/20-proz.  $HClO_4$  gelbe Polyeder, Smp. 258–261°.  $pK_{LH^+}^H = 4,21$ .

Spektren: in $CHCl_3$ :	$\lambda_{max}$ 480 (S), 452, 392, 302 nm
in 2N HCl (als Kation):	$\lambda_{max}$ 460, 390, 286 nm
bei pH 7:	$\lambda_{max}$ 464, 368, 278 nm

$C_{17}H_{19}O_2N_5 \cdot HClO_4$	Ber. C 45,9	H 4,9	N 15,8	Cl 8,1%
(443,8)	Gef. ,, 45,8	,, 4,9	,, 15,6	,, 8,2%

Die Verbindung wird durch 6stündiges Erhitzen auf 60° zu  $I_a$  verseift.

2.25. 3-*N*-Methyl-2-lumiflavimin ( $VI_{2b}$ ,  $R' = CH_3$ ): Eine Lösung von 0,5 g  $IV_{2b}$  in 30 ml heisser 2N HCl wird mit 1 ml gesättigter  $SnCl_2$ -Lösung in 2N HCl 3 Std. im siedenden Wasserbad erhitzt. Hierauf filtriert man den dunklen Niederschlag ab, wäscht ihn gut mit 2N HCl, suspendiert ihn in 10 ml 20-proz.  $HClO_4$ , setzt 2 Tropfen Perhydrol zu und erwärmt bis nahezu klare Lösung eingetreten ist. Darauf filtriert man mit wenig Kohle, reibt an und lässt zunächst bei Raumtemperatur, dann 12 Std. bei 0° stehen: 0,2 g (42,8%)  $VI_{2b}$ -Perchlorat in ockerfarbenen Polyedern, Smp. 295–298°.  $pK_{LH^+}^H = 9,26$ .

Spektren: bei pH 13:	$\lambda_{max}$ 453, 359, 270 nm
in 2N HCl (als Kation):	$\lambda_{max}$ 440, 383, 270 nm

$C_{14}H_{15}N_5 \cdot HClO_4 \cdot H_2O$	Ber. C 41,5	H 5,0	N 17,2	Cl 8,8%
(405,8)	Gef. ,, 41,6	,, 4,3	,, 16,9	,, 8,8%

In 2N  $HClO_4$  wird  $VI_{2b}$  mit  $HNO_2$  unter gelindem Erwärmen quantitativ zu  $I_b$  desaminiert, was sowohl dünnschichtchromatographisch als auch spektrophotometrisch belegt wurde. Im Gegensatz zu  $VI_{2a}$  lässt sich  $VI_{2b}$  aus seinen Salzen nur mit starken Basen freisetzen.

2.26. 2-Phenylimino-riboflavin ( $VI_{2c}$ ,  $R = C_6H_5$ ): Eine Suspension von 0,2 g  $VII_{2c}$  in 5 ml frisch destilliertem Anilin wird unter gelegentlichem Rühren 2 Std. auf 50° erwärmt. Hierauf fügt man ein gleiches Volumen Aceton zu, lässt eine Std. bei Raumtemperatur stehen und filtriert. Den dunkelroten Rückstand nimmt man in heisser 20-proz.  $HClO_4$ , Alkohol und wenig Wasser auf und filtriert mit Kohle. Bei Raumtemperatur fallen 0,2 g (74%) ziegelrote Polyeder an. Smp. 257–260°.

$C_{23}H_{25}O_5N_5 \cdot HClO_4 \cdot H_2O$ (569,5)	Ber. C 48,6	H 4,9	N 12,3%	Gef. C 48,3	H 4,6	N 12,2%
--	-------------	-------	---------	-------------	-------	---------

2.27. 2-( $\beta$ -Hydroxyäthylimino)-riboflavin ( $VI_{2c}$ ,  $R = CH_2CH_2OH$ ): Man erwärmt eine Suspension von 0,2 g  $VII_{2c}$  in 5 ml Äthanolamin 1 Std. unter gelegentlichem Rühren auf 50°, versetzt dann das gelbbraune Gemisch mit dem gleichen Volumen Aceton und filtriert. Den braunen Rückstand nimmt man in wenig 20-proz.  $HClO_4$  auf, filtriert mit wenig Kohle und versetzt vorsichtig bis zur beginnenden Kristallisation mit gesättigtem  $NaHCO_3$  aq., kocht dann nochmals kurz auf und lässt 12 Std. bei 0° stehen: 0,12 g (58,5%) gelbe Polyeder, Smp. 215–225°.

$C_{21}H_{27}O_6N_5 \cdot \frac{1}{2}H_2O$ (438,3)	Ber. C 55,3	H 6,2	N 15,5%	Gef. C 55,4	H 6,3	N 15,6%
--	-------------	-------	---------	-------------	-------	---------

2.28. 2-Morpholino-2-desoxy-riboflavin (struktur analog zu  $VI_{2c}$ ): Eine Suspension von 0,2 g  $VII_{2c}$  in 10 ml Morpholin wird 2 Std. unter gelegentlichem Rühren auf 50° erwärmt. Hierauf verdünnt man mit gleichem Volumen Aceton und lässt zunächst bei Raumtemperatur und dann bei 0° stehen. Das gelbbraune Kristallisat nimmt man in wenig warmer 2N  $HClO_4$  auf, filtriert

mit Kohle und versetzt mit ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung bis zur beginnenden Kristallisation. Danach kocht man nochmals auf, bis sich alles wieder gelöst hat, reibt an, und lässt zunächst bei Raumtemperatur und dann bei  $0^\circ$  6 Std. stehen. Es fallen analysenreine, gelborange Prismen an. Die Verbindung ist von allen hier beschriebenen Riboflavinderivaten am besten in Wasser löslich.

$\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{O}_6\text{N}_5 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$  (454,5) Ber. C 55,3 H 6,2 N 15,5% Gef. C 55,4 H 6,3 N 15,6%

2.29. 4-Lumiflavimin ( $\text{VI}_{4a}$   $R = \text{H}$ ): 0,1 g  $\text{IV}_{4a}$  werden in Alkohol und 60-proz.  $\text{HClO}_4$  heiss gelöst. Die heisse Lösung wird auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 2 Äq.  $\text{SnCl}_2$  versetzt. Hierauf reibt man an, filtriert nach einiger Zeit die ausgeschiedenen dunkelbraunen Kristalle ab und suspendiert letztere in Alkohol/60-proz.  $\text{HClO}_4$ . Beim Zufügen von wenig Perhydrol tritt Auflösung unter Aufhellung nach gelb ein. Hierauf reibt man an und lässt bei  $0^\circ$  kristallisieren: 0,08 g (53%) gelbe Stäbchen. Zur Analyse wurde aus Methanol und 20-proz.  $\text{HClO}_4$  umkristallisiert. Zersp. 193–203°. IR.-Spektrum:  $\nu\text{NH}(3)$  3400;  $\nu\text{CO}(2)$  1680  $\text{cm}^{-1}$ ; kein  $\nu\text{CO}(4)$ .

Spektren: in  $\text{CHCl}_3$ :  $\lambda_{\text{max}}$  500 (S), 474, 378, 272 nm  
 bei pH 7:  $\lambda_{\text{max}}$  456, 358, 268 nm  
 bei pH 2 (als Kation):  $\lambda_{\text{max}}$  458, 384, 264 nm

$\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{ON}_5 \cdot \text{HClO}_4 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$  Ber. C 40,5 H 4,4 N 18,2 Cl 9,1%  
 (382,8) Gef. „ 40,6 „ 4,4 „ 18,1 „ 9,0%

2.30. 4-Morpholino-4-desoxy-lumiflavin (struktur analog zu  $\text{VI}_{4a}$ ): Eine Suspension von 0,5 g  $\text{II}_{4a}$  in 40 ml Morpholin wird in einem 100-ml-Sulfierkolben 6 Std. unter  $\text{N}_2$  bei Raumtemperatur gerührt. Hierauf wird mit einem gleichen Volumen Äther versetzt, abfiltriert und mit Äther gut gewaschen: 0,5 g (79%). Aus Alkohol/Wasser gelborange Prismen. Smp. 240–245°. Die Verbindung ist gut in Chloroform löslich. Sie lässt sich mit Chloroform aus alkalischer Lösung extrahieren, nicht aber aus saurer Lösung.

Spektren: in  $\text{CHCl}_3$ :  $\lambda_{\text{max}}$  510 (S), 478, 358, 276 nm  
 bei pH 7:  $\lambda_{\text{max}}$  468, 360, 272 nm  
 in 2N HCl (als Kation):  $\lambda_{\text{max}}$  466, 396, 266 nm

$\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{O}_2\text{N}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (343,4) Ber. C 59,7 H 6,1 N 20,5% Gef. C 59,5 H 5,9 N 20,6%

2stündige Behandlung in 6N HCl bei  $60^\circ$  ergab nahezu quantitativ Lumiflavin ( $\text{I}_a$ ).

2.31. 4-( $\beta$ -Hydroxyäthyl)-imino-lumiflavin ( $\text{VI}_{4a}$ ,  $R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ): Eine Suspension von 0,1 g  $\text{II}_{4a}$  in 5 ml Äthanolamin wird auf dem Wasserbad 5 Min. auf  $60^\circ$  erwärmt, wobei allmählich vollständige Lösung eintritt. Hierauf lässt man 15 Min. bei Raumtemperatur stehen, setzt das gleiche Volumen Alkohol und wenig Äther zu und lässt 4 Std. bei  $0^\circ$  stehen; 0,09 g (78%) gelbbraune Nadeln. Zur Analyse wurde aus Alkohol/Wasser umkristallisiert, Smp. 255–256°. Die Verbindung lässt sich aus wässriger Lösung mit Chloroform nicht extrahieren. IR.-Spektrum:  $\nu\text{OH}$  3400;  $\nu\text{NH}$  3280;  $\nu\text{CO}(2)$  1645  $\text{cm}^{-1}$ , kein  $\nu\text{CO}(4)$ .

Spektren: bei pH 7:  $\lambda_{\text{max}}$  458, 354, 266 nm  
 in 2N HCl (als Kation):  $\lambda_{\text{max}}$  460, 392, 266 nm

$\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{O}_2\text{N}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (314,4) Ber. C 57,0 H 6,0 N 22,0% Gef. C 57,2 H 5,9 N 22,0%

2.32. 4-Phenylimino-lumiflavin ( $\text{VI}_{4a}$ ,  $R = \text{C}_6\text{H}_5$ ): In einem 100-ml-Sulfierkolben wird eine Suspension von 0,1 g  $\text{II}_{4a}$  in 10 ml frisch destilliertem Anilin 24 Std. auf  $60^\circ$  gewärmt. Hierauf setzt man das gleiche Volumen Äther zu, lässt über Nacht bei  $0^\circ$  stehen und filtriert die entstandenen braunroten Prismen ab: 0,09 g (74%). Aus Alkohol/60-proz.  $\text{HClO}_4$  Kristalle vom Smp. 257–259°.

Spektren: in  $\text{CHCl}_3$ :  $\lambda_{\text{max}}$  518 (S), 480, 366, 266 nm  
 in 2N HCl:  $\lambda_{\text{max}}$  466, 394, 264 nm  
 bei pH 7:  $\lambda_{\text{max}}$  470, 362, 264 nm

$\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{ON}_5 \cdot \text{HClO}_4 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$  Ber. C 51,0 H 4,3 N 15,9 Cl 8,0%  
 (440,9) Gef. „ 51,5 „ 4,2 „ 15,6 „ 8,2%

2.33. S-Methyl-2-thio-lumiflavin ( $\text{VII}_{2a}$ ,  $R = \text{CH}_3$ ) [2]: Eine Suspension von 0,5 g  $\text{II}_{2a}$  in 15 ml Chloroform und 2 ml Methyljodid wird 12 Std. bei Raumtemperatur geschüttelt. Dann wird der braunrote Niederschlag abfiltriert und mit Äther gewaschen: 0,63 g (83%) dunkelbraunrote Kristalle (die Farbe beruht auf Ladungstransfer zwischen Flavinium-Kation und  $\text{J}^-$ ). Aus Alkohol und wenig 60-proz.  $\text{HClO}_4$  strohgelbe Nadeln des  $\text{VII}_{2a}$ -Perchlorats, Smp. 221–223°. Die

Base kann mit  $\text{NaHCO}_3$  aq. freigesetzt werden: orangefarbene Kristalle.  $\text{p}K_{\text{LH}^+}^{\text{H}} = 4,42$ . IR.-Spektrum (Base):  $\nu\text{CO}(4)$   $1665\text{ cm}^{-1}$ ; kein  $\nu\text{CO}(2)$ .

Spektr.: in $\text{CHCl}_3$ :	$\lambda_{\text{max}}$ 488, 468, 378, 284 nm
bei pH 7:	$\lambda_{\text{max}}$ 454, 392, 282 nm
bei pH 2 (als Kation):	$\lambda_{\text{max}}$ 426, 286 nm

$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{ON}_4\text{S}\cdot\text{HClO}_4$	Ber. C 43,5	H 3,9	N 14,5	Cl 9,1%
(386,8)	Gef. „ 43,4	„ 3,9	„ 14,5	„ 9,0%

Die Verbindung geht in 2N HCl (Freisetzung von  $\text{CH}_3\text{SH}$ ) oder in peroxidhaltiger 2N NaOH quantitativ in Lumiflavin ( $\text{I}_a$ ) über.

2.34. *S-Benzyl-2-thio-lumiflavin* ( $\text{VII}_{2a}$ ,  $R = \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ ): Herstellung analog. Aus 0,5 g  $\text{II}_{2a}$  und 2 ml Benzylbromid 0,7 g (84%) Hydrobromid in gelbbraunen Polyedern. Durch Umkristallisieren aus Alkohol/60-proz.  $\text{HClO}_4$  erhält man strohgelbe Nadeln des  $\text{VII}_{2a}$ -Perchlorats, welche sich bei  $260^\circ$  zersetzen.

$\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{ON}_4\text{S}\cdot\text{HClO}_4$ (462,93)	Ber. C 51,9	H 4,2	Cl 7,6%	Gef. C 51,8	H 4,2	Cl 7,4%
--	-------------	-------	---------	-------------	-------	---------

2.35. *S-( $\beta$ -amino-äthyl)-2-thio-lumiflavin* ( $\text{VII}_{2a}$ ,  $R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ): Eine Suspension von 0,5 g  $\text{II}_{2a}$  in 10 ml abs. Dimethylformamid wird mit 1,5 g-Äq.  $\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{HBr}$  7–8 Std. unter Stickstoff auf  $75^\circ$  erwärmt. Dann wird heiss filtriert und der Rückstand mit Dimethylformamid und Äther gewaschen. Ausbeute 0,33 g (50%). Durch Kristallisation aus Alkohol und einem gleichen Volumen 20-proz.  $\text{HClO}_4$  erhält man gelbe Polyeder des  $\text{VII}_{2a}$ -Perchlorats, die sich bei  $290^\circ$  zersetzen.

$\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{ON}_5\text{S}\cdot\text{HClO}_4$	Ber. C 43,1	H 4,4	N 16,9	S 8,2%
(415,9)	Gef. „ 43,3	„ 4,4	„ 16,8	„ 7,7%

2.36. *S-Methyl-2-thio-riboflavin* ( $\text{VII}_{2c}$ ,  $R = \text{CH}_3$ ): 0,3 g  $\text{II}_c$  werden 5 Std. in 50 ml abs. Methanol und 10 ml Methyljodid unter Rückfluss gekocht, danach wird das Gemisch heiss filtriert. Den Filtrerrückstand wäscht man mit wenig heisser 20-proz.  $\text{HClO}_4$ . Man vereinigt die beiden Filtrate, versetzt mit Kohle und filtriert erneut. Das Filtrat wird auf dem Wasserbad im Vakuum bei  $60^\circ$  auf 10 ml eingengt, mit einem gleichen Volumen Wasser verdünnt und von neuem mit Kohle filtriert. Das dunkelrotbraune Filtrat stellt man vorsichtig mit gesättigter  $\text{NaHCO}_3$  auf pH 7, reibt an und lässt 12 Std. bei  $0^\circ$  stehen. Die orangegelben Polyeder werden filtriert und mit Aceton und Äther gewaschen; 0,16 g (52%), Zersp.  $203^\circ$ . Mässig löslich in Wasser, Alkoholen, gut löslich in verdünnten Säuren, unlöslich in Äther und Aceton.

$\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{O}_5\text{N}_4\text{S}\cdot\text{H}_2\text{O}$	Ber. C 50,8	H 5,6	N 13,2	S 7,5%
(424,5)	Gef. „ 50,8	„ 5,5	„ 13,6	„ 7,5%

2.37. *S-Methyl-4-thio-lumiflavin* ( $\text{VII}_{4a}$ ,  $R = \text{CH}_3$ ): Eine Lösung von 0,15 g  $\text{II}_{4a}$  in 30 ml abs. Dimethylformamid wird mit 5 ml Methyljodid und 0,5 g  $\text{K}_2\text{CO}_3$  versetzt und  $1\frac{1}{4}$  Std. bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Rühren stehengelassen. Hierauf setzt man 50 ml Chloroform und 100 ml Wasser zu und schüttelt im Scheidetrichter kräftig durch. Die abgetrennte Chloroformphase extrahiert man je 1mal mit 30 ml 0,1N NaOH und 30 ml Sulfatpuffer (pH 2), trocknet sie dann mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , engt am Vakuum auf 5–10 ml ein und lässt bei Raumtemperatur kristallisieren; 0,12 g (77%) orange Nadeln. Smp.  $261\text{--}264^\circ$ . Gut löslich in organischen Lösungsmitteln ausser Äther, wenig löslich in Wasser. IR.-Spektrum:  $\nu\text{CO}(2)$   $1675\text{ cm}^{-1}$ ; kein  $\nu\text{CO}(4)$ .

Spektr.: in 100-proz. HCOOH (als Kation):	$\lambda_{\text{max}}$ 420, 386, 264 nm
in $\text{CHCl}_3$ :	$\lambda_{\text{max}}$ 514 (S), 480, 368, 272 nm
bei pH 7:	$\lambda_{\text{max}}$ 478, 368, 266 nm

Die Basizität von  $\text{VII}_{4a}$  konnte der starken Hydrolysenempfindlichkeit wegen nicht festgestellt werden.

$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{ON}_4\text{S}$ (286,4)	Ber. C 58,7	H 4,9	S 11,2%	Gef. C 58,4	H 5,0	S 11,2%
---	-------------	-------	---------	-------------	-------	---------

$\text{VII}_{4a}$  wird in 2N HCl wie auch in 0,1N NaOH augenblicklich zu Lumiflavin ( $\text{I}_a$ ) verseift; selbst in Sulfatpuffer von pH 2 verläuft die Hydrolyse bei Raumtemperatur in 1 Std. quantitativ.

2.38. *N-Ribityl-3,4-dimethyl-6-(p-carboxyphenylazo)-anilin* ( $\text{X}_a$ ): 7,0 g *p*-Aminobenzoesäure werden in 50 ml 20-proz.  $\text{HClO}_4$  gelöst, mit wenig Kohle filtriert und auf  $-5^\circ$  abgekühlt. Hierauf lässt man 5 g  $\text{NaNO}_2$  in 5 ml Wasser gelöst, langsam unter Rühren durch einen Trichter unter die

Oberfläche obiger Lösung einlaufen, wobei die Temperatur 0° nicht übersteigen darf. Dann rührt man noch 10 Min. bei 0°, fügt 5 g Harnstoff zu, rührt weitere 15 Min., giesst eine auf 0° abgekühlte Lösung von 12,1 g N-Ribityl-3,4-dimethylanilin<sup>9)</sup> in 60 ml Eisessig und 10 ml Wasser unter Rühren auf einmal zu, puffert mit Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> auf pH 4–5 und lässt über Nacht bei Raumtemperatur stehen. Der braunrote Niederschlag wird abfiltriert, gut mit Wasser gewaschen und in 2 N NaOH aufgenommen. Diese Lösung giesst man unter Rühren in das doppelte Volumen heisser 2 N Essigsäure und filtriert den ausgefallenen Niederschlag heiss ab, der nach gutem Waschen mit heissem Wasser bei 50° getrocknet wird: 12,0 g (63,2%). Aus wässrigem Alkohol orangerote Prismen. Smp. 171–173°.  $pK_a = 5,15$ .

Spektren: in Methanol:  $\lambda_{max}$  552, 469, 430 nm  
 in 2 N NaOH (als Anion):  $\lambda_{max}$  504, 336, nm  
 in 2 N HCl (als Kation):  $\lambda_{max}$  572, 420, 310 nm  
 bei pH 7:  $\lambda_{max}$  490, 336 nm

C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>O<sub>6</sub>N<sub>3</sub> (401,4) Ber. N 10,5% Gef. N 10,4%

#### SUMMARY

In order to provide flavocoenzyme models adapted to less hydrophilic environments, and to study the reactivity of functional substituents in the flavin(isoalloxazine) nucleus, lumiflavin and riboflavin derivatives containing sulphur and nitrogen functions in positions 2 and 4 have been synthesized.

Institut für Anorganische Chemie  
 Universität Basel

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] F. MÜLLER, P. HEMMERICH & H. ERLÉNMEYER, *Experientia* **18**, 498 (1962).
- [1a] P. HEMMERICH, C. VEEGER & H. C. S. WOOD, *Angew. Chem.* **77**, 699 (1965).
- [2] «Flavins and Flavoproteins», BBA Library, Vol. 8, Ed. by E. C. SLATER, Elsevier, Amsterdam 1966.
- [3] V. MASSEY & Q. H. GIBSON, *Federation Proc.* **23**, 18 (1964).
- [4] H. A. HARBURY, K. F. LANOUE, P. A. LOACHE & R. M. AMICK, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **45**, 1708 (1959); H. A. HARBURY & K. A. FOLEY, *ibid.* **44**, 662 (1958).
- [5] P. HEMMERICH, S. FALLAB & H. ERLÉNMEYER, *Helv.* **39**, 1484 (1956).
- [6] P. HEMMERICH & H. ERLÉNMEYER, *Helv.* **40**, 187 (1957).
- [7] P. BAMBERG, P. HEMMERICH & H. ERLÉNMEYER, *Helv.* **43**, 395 (1960).
- [8] W. FÖRY & P. HEMMERICH, in Vorbereitung.
- [9] K. H. DUDLEY, A. EHRENBERGER, P. HEMMERICH & F. MÜLLER, *Helv.* **47**, 1354 (1964).
- [10] D. B. MCCORMICK, C. ARSENIUS & P. HEMMERICH, *J. biol. Chemistry* **238**, 3057 (1963).
- [11] J. M. LHOSTE, A. HAUG & P. HEMMERICH, *Biochemistry*, in Druck.
- [12] P. HEMMERICH, F. MÜLLER & A. EHRENBERG in «Oxidases and Related Redox Systems», Vol. 1, Ed. by T. E. KING, H. S. MASON & M. MORRISON, p. 157, John Wiley & Sons, Inc., New York 1965.
- [13] R. G. PEARSON, *J. Amer. chem. Soc.* **85**, 3533 (1963).
- [14] K. H. DUDLEY & P. HEMMERICH, in Vorbereitung.
- [15] F. MÜLLER, W. WALKER & P. HEMMERICH, *Helv.* **49**, 2365 (1966).
- [16] T. Y. WANG, C. L. TSOU & J. L. WANG, *Sci. sinica* **5**, 73 (1956); **74**, 1193 (1965).
- [17] E. B. KEARNEY, *J. biol. Chemistry* **235**, 865 (1960).
- [18] P. HEMMERICH, *Helv.* **43**, 1942 (1960).
- [19] A. H. COOK, I. HEILBRON, S. F. MACDONALD & A. P. MAHADEVAN, *J. chem. Soc.* **1949**, 1064.

<sup>9)</sup> Der Firma HOFFMANN-LA ROCHE, Basel, sei auch an dieser Stelle für die Überlassung dieser Substanz gedankt.