

238. Reduktive Photoalkylierung des Flavinkerns und Flavinkatalysierte Photodecarboxylierung von Phenylacetat

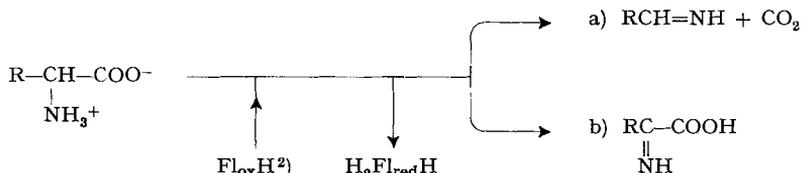
Studien in der Flavinreihe. 15. Mitteilung [1]

von **W. H. Walker, P. Hemmerich** und **V. Massey**¹⁾

(5. IX. 67)

Die Photochemie der Flavokoenzyme erfordert die Unterscheidung von Photolyse und Photoreduktion. Die Photolyse ist irreversibel und beinhaltet den dehydrierenden Abbau der Ribityl-Seitenkette über den Triplettzustand des angeregten Flavinkerns [2].

Bei der Photoreduktion übernehmen geeignete Substrat-Moleküle die Rolle des Wasserstoff-Donators. So sind Photoreaktionen von Lumiflavin und Flavokoenzymen mit Aminen und Aminosäuren bekannt [3] [4]. Zwei Reaktionsmöglichkeiten stehen im Falle von Aminosäuren offen: a) Oxydation unter Decarboxylierung [4] und b) Oxydation unter α -H-Abstraktion [3]:



Die Photoreduktion ist reversibel, sofern das reduzierte Flavin durch Sauerstoff spontan zum Ausgangs-Flavochinon $\text{Fl}_{\text{ox}}\text{H}^2$ reoxydiert wird. In allen bisher untersuchten Fällen wurde nie eine irreversible Photoreduktion des Flavins aufgefunden.

Einem Hinweis von Dr. GREGORIO WEBER (University of Illinois, Urbana) und Studien im Laboratorium des einen von uns (V. M., University of Michigan, Ann Arbor) verdanken wir die Kenntnis einer irreversiblen Photoreduktion des Flavinkerns durch Phenylacetat-Ionen, welche hierbei quantitativ decarboxyliert werden³⁾.

Es wurde beobachtet, dass hierbei *stabile* Zwischenprodukte entstehen, welche sich jedoch unter geeigneten Bedingungen quantitativ in Flavochinon rücküberführen lassen. Die vorliegende Arbeit betrifft die Isolierung dieser Zwischenprodukte in präparativem Maßstab, sowie die Aufklärung ihrer Struktur und Reaktivität.

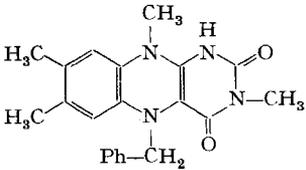
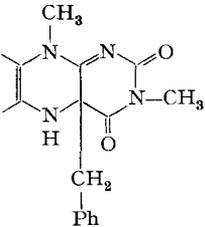
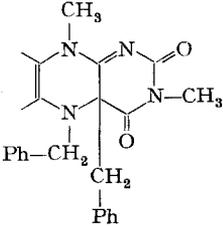
¹⁾ Department of Biological Chemistry, University of Michigan, Ann Arbor (Mich.), USA.

²⁾ Zur Nomenklatur: Flavin = Isoalloxazin = 10-substituiertes 2,3,4,10-Tetrahydro-benzo[g]-pterin-2,4-dion. $\text{Fl}_{\text{ox}}\text{H}$ = Flavin im oxidierten Zustand (Flavochinon), H bezeichnet aciden Wasserstoff in Position 3 ($pK_a \approx 10$), wenn substituiert: $\text{Fl}_{\text{ox}}\text{R}$ (Schema 1, I). $\text{H}_2\text{Fl}_{\text{red}}\text{H}$ = Flavin im reduzierten Zustand (Dihydroflavin); 1,5- $\text{H}_2\text{Fl}_{\text{red}}\text{H}$ = autoxidables Dihydroflavin (= Flavohydrochinon) IVa, $pK_1 \approx 7$ (vgl. hierzu [5]).

³⁾ Eine vorläufige Mitteilung wurde bereits publiziert: [6].

Anwendungsbereich und Mechanismen dieser Reaktion, Spektren, Kinetik und mögliche biologische Bedeutung werden anderswo behandelt [7].

Chemische Verschiebung der Methylenprotonen von Benzyl-Flavohydrochinonen, bzw. -Dihydroflavinen
(in ppm)

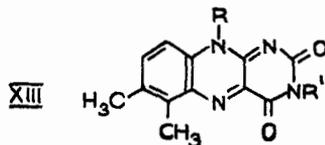
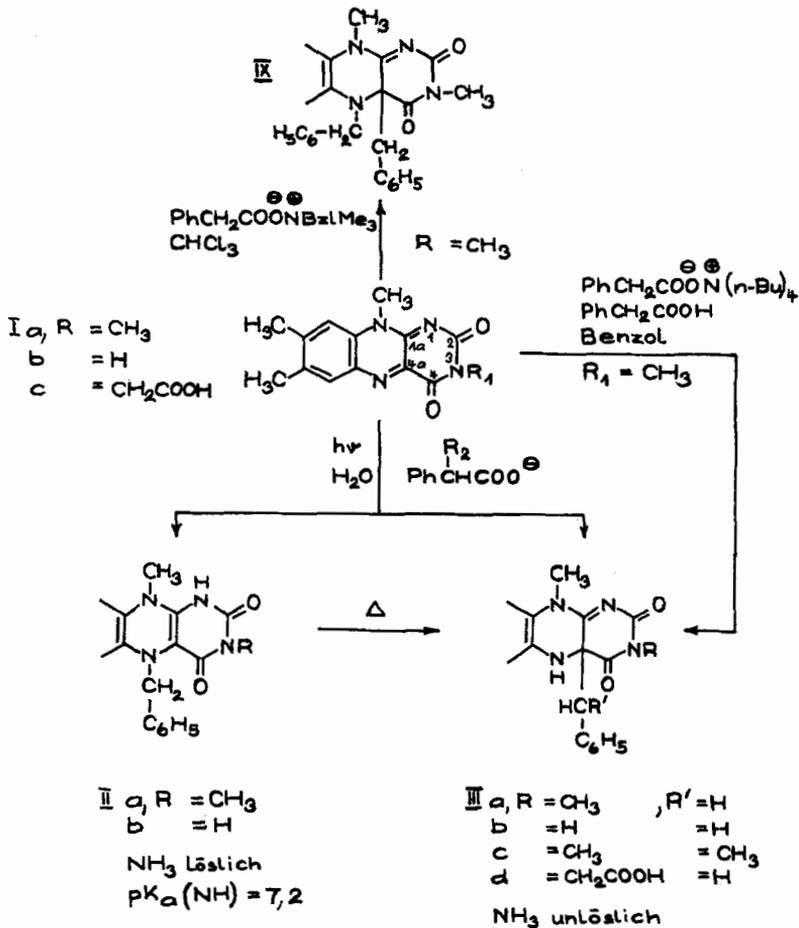
		CDCl ₃	
		N-CH ₂ -	C-CH ₂ -
IIa		5,2	
IIIa			3,0 AB ^{a)}
IX		4,35	3,0 AB ^{a)}

a) Das Methylensignal spaltet sich in ein AB-Signal auf (Differenz 3–4 Hz), wobei nur die beiden inneren Hauptbanden erkennbar sind. Diese Aufspaltung der Methylengruppe verlangt deren Fixierung an einem asymmetrischen Zentrum.

Wir fanden, dass sich die eingangs genannte Photodecarboxylierung von Phenylacetat auf präparativer Basis in Suspension ausführen lässt, wenn man unter strikt anaeroben Bedingungen mit einer Wolfram-Lampe (200 W) im nachstehend beschriebenen Gefäß (vgl. exp. Teil) über Nacht in 0,1M Phenylacetat-Puffer bestrahlt. Der Endpunkt wird durch Verschwinden der Flavochinon-Absorption angezeigt. Das Reaktionsprodukt kann in Gegenwart von Dithionit als O₂-Absorbens abfiltriert werden. Es erwies sich dünnschichtchromatographisch (System B, vgl. exp Teil) als ein Gemisch zweier Komponenten. Die langsamer laufende wird schon beim Auftragen

an der Luft grün und verfärbt sich im sauren Fließmittel B rot. Diese Farbstoffe sind Radikale⁸). An der Luft nimmt das rote Radikal langsam die tiefgelbe Farbe des Ausgangsmaterials an; die grüne, unter neutralen Bedingungen auftretende Radikalform bleicht bei weiterem Luftzutritt aus, ohne Rückbildung des gelben Ausgangsmaterials. Die zweite Komponente bleibt im Chromatogramm unter Lichtausschluss farblos, nimmt jedoch bei Belichtung direkt die tiefgelbe Farbe des Startflavins an.

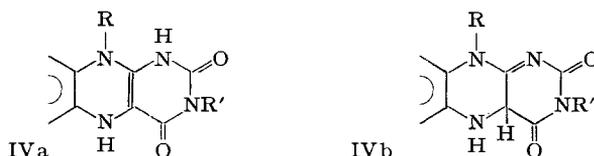
Schema 1



Die anaerobe pH-metrische Titration des Gemisches zeigt ein Puffergebiet bei pH 7,2 unter Freisetzung eines halben Protonenäquivalents. Ungefähr die Hälfte des Produkts liegt also offenbar in Form eines Flavohydrochinon-Derivats vor [5]. Präparativ war danach die Auftrennung des Gemisches in wässrigem Ammoniak möglich.

Die Produkte erwiesen sich als Isomere der Zusammensetzung $C_{21}H_{22}O_2N_4$ und mussten somit zusätzlich zum Flavinkern eine Benzylgruppe enthalten. Beide liessen sich quantitativ ins Ausgangsmaterial rücküberführen, die NH_3 -lösliche mit Luft und Säure, die NH_3 -unlösliche mit Luft und Licht.

Aufgrund dessen und der nachfolgend diskutierten IR.- und NMR.-Daten (siehe Tab.) konnten wir den beiden Isomeren die Strukturen eines 5-Benzyl-flavohydrochinons (= 5-Benzyl-1,5-dihydroflavins) II und eines in der Brücke substituierten 4a-Benzyl-4a,5-dihydroflavins III zuordnen (vgl. Schema 1).



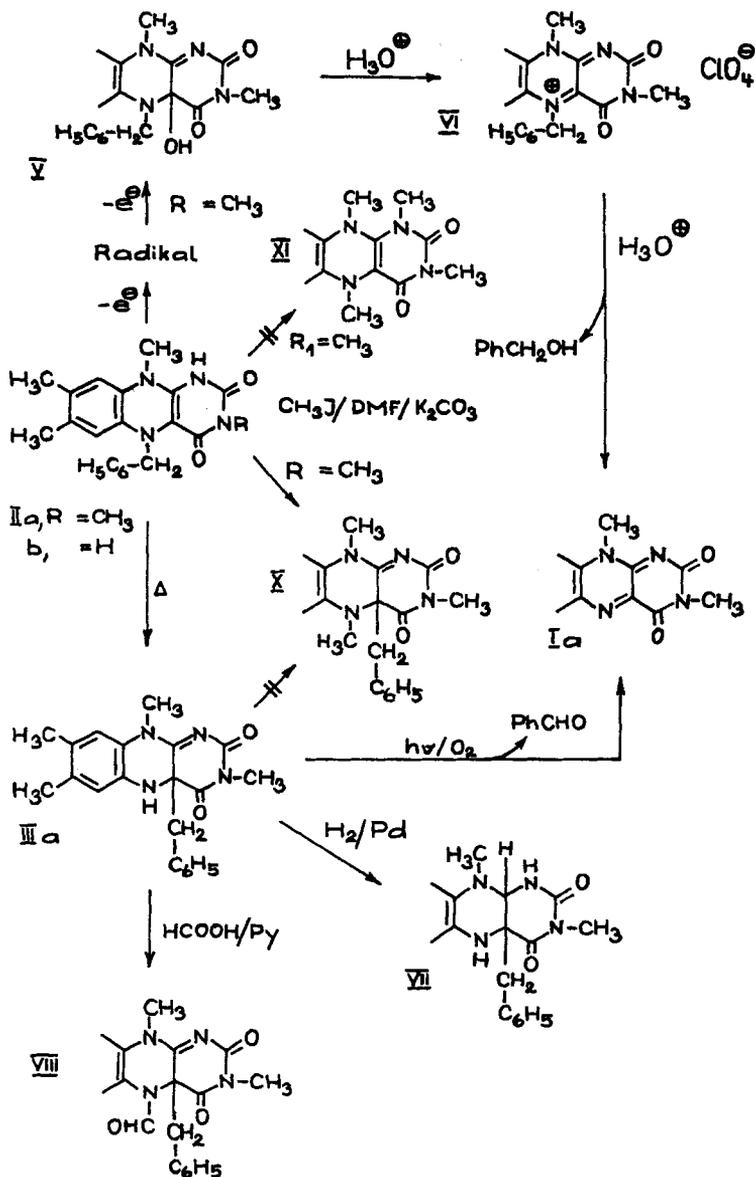
Wir sprechen II als «Flavohydrochinon» an, seines pK_a und seiner Autoxydierbarkeit wegen, welche das 5-Benzylderivat mit dem unsubstituierten 1,5-reduzierten Flavin IVa gemein hat, und wegen der festgestellten Reversibilität der Einelektronen- sowie Zweielektronen-Oxydation: Einelektronen-Oxydation von II führt zum schon beschriebenen grünen Radikal, weitere Oxydation, ebenfalls reversibel, zu einer farblosen Verbindung, $C_{21}H_{24}O_3N_4$, welche als Carbinolbase V des 5-Benzyl-flavochinonium-Kations VI erkannt wurde (Schema 2). Die Hydroxylgruppe tritt wiederum in die Brückenstellung 4a ein. Flavohydrochinon (1,5-Dihydroflavin) war bisher die einzige bekannte reduzierte Form des Flavins, wie von KUHN & WEYGAND 1934 erstmals formuliert [8].

Demgegenüber ist für das 4a-brückensubstituierte Isomere III die (Photo)oxydation irreversibel und geht stets mit der Debenzylierung einher. (Aber auch unsubstituiertes 4a,5-Dihydroflavin IVb wäre nicht als Hydrochinon anzusprechen, da seine Oxydation die thermodynamisch irreversible Spaltung einer CH-Bindung involviert.) III ist das erste bisher isolierte 4a,5-Dihydroflavin; jedoch ist man auf die Möglichkeit von Reaktionen am Brücken-C (4a) schon nachdrücklich durch die Befunde GAWRON's [9] zur Stereochemie der flavinabhängigen Substratdehydrierung aufmerksam gemacht worden: Eine Reaktion an C(4a) kann, analog wie bei Pyridinnucleotiden [10] «von oben» oder «von unten» erfolgen. Die Asymmetrie des C(4a)-Zentrums wird reflektiert durch die Nichtäquivalenz der C(4a)-Benzylprotonen im NMR.-Spektrum, welche als AB-System erscheinen (siehe Tab.).

Die Struktur von III wird weiter belegt durch die scharfe NH-Bande im IR. bei 3350 cm^{-1} und durch die starke Abnahme der CO(4)-Intensität bei 1720 cm^{-1} , verglichen mit II, welche die Aufhebung der cyclischen Resonanz im Pyrimidinkern reflektiert, sowie durch die katalytische Reduktion zum stabilen 1,1a,4a,5-Tetrahydroflavin VII, $C_{21}H_{24}O_2N_4$, welches nur unter harten Bedingungen (NO^+ , Säure)

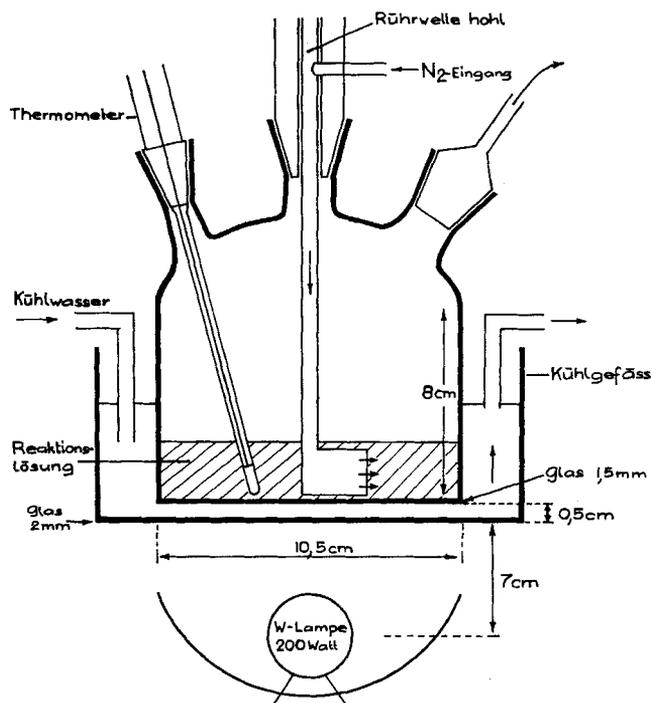
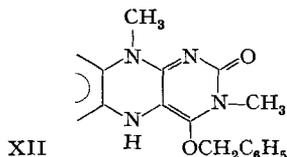
wieder zum Flavochinon I rückoxydiert werden kann. Mit Ameisensäure in abs. Pyridin wird aus III, wie zu erwarten, ein Formylderivat C₂₂H₂₂O₃N₄ (VIII) erhalten (Schema 2).

Schema 2



Insbesondere ausgeschlossen wird durch den Hydrierungsverlauf die an sich vernünftige Struktur eines Isomeren XII, welches hydrogenolytisch debenzilyliert werden müsste.

Solche O-alkylierten Dihydroflavine können, wie wir früher zeigten [11], erhalten werden beim Schutz der 5-Stellung durch Acetylierung und sind nach der Entfernung der Acetylgruppe stets extrem autoxidabel, während III im Dunkeln gegen O_2 beständig ist. Auch weitere Methylierung von IIa führt nicht wie erwartet zu O- oder N(1)-Alkylierung (\rightarrow XI), sondern liefert unter Wanderung der Benzylgruppe ein 4a-Benzyl-5-methyl-dihydroflavin X.



Apparatur der Photoreaktion (hergestellt durch Fa. H. FELBER, Basel)

Volumen des Reaktionsgefäßes etwa 1000 ml. Minimales Volumen der Reaktionsschicht: 150 ml. Das Kühl- und das Reaktionsgefäß bestehen aus Glas. Das Kühlwasser wird an einen Thermostaten angeschlossen.

Die Labilität der Benzylgruppe in beiden Stellungen, 4a und 5, ist auffallend: So lagert sich IIa beim Schmelzen (unter Luftausschluss) in IIIa um. Analog führt die Photoreaktion von Ia und Phenylacetat schon bei 50° nicht mehr zum Gemisch von IIa und IIIa, sondern zu reinem IIIa. Die Benzylgruppe ist also in Stellung 5 thermisch labil; in Stellung 4a photolabil, wobei im letzteren Falle allerdings die Anwesenheit von O_2 Voraussetzung ist und zur Freisetzung des Benzylrestes in Form

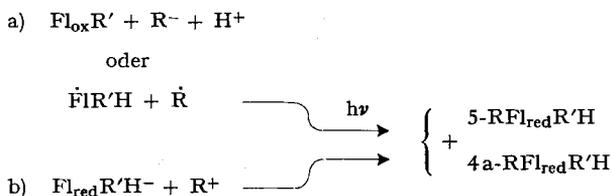
von Benzaldehyd führt, wie wir gas-chromatographisch ermittelten [12]. Bei der oxydativen Debenzylierung von IIa über VI wird jedoch stets Benzylalkohol gefunden [12].

Auch Photoreduktion in aprotischem Milieu führt ausschliesslich zu 4a,5-Dihydroflavinen. So entsteht aus Ia in CHCl_3 mit Benzyltrimethylammonium-phenylacetat bei Raumtemperatur in mässiger Ausbeute ein schwer isolierbares 4a,5-Dibenzyl-dihydroflavin IX.

Es muss vorläufig offenbleiben, ob bei der Photoalkylierung der Benzylrest als Carbanion oder als Radikal in das Flavin eintritt. Sicher ist, dass der Angriff am N(5) im Gegensatz zu dem am C(4a) in der Flavin-Ebene erfolgen muss, denn er ist stark abhängig von der Raumerfüllung des angreifenden Substituenten: So kann die Benzyl- bzw. die Allylgruppe der Phenyl- bzw. Vinylessigsäure noch am N(5) angreifen; die α -Phenäthylgruppe der α -Phenylpropionsäure jedoch kann nur noch in der Flavin-Position 4a reagieren. Analog lassen «Isoflavine» XIII (Schema 1), welche in *peri*-Stellung zu N(5) raumerfüllend substituiert sind, keinen Angriff an N(5) zu, sondern nur an C(4a).

Parallel haben wir hierzu die elektrophile Alkylierung des Flavohydrochinons untersucht [13]. Von den noch nicht abgeschlossenen Versuchen sei folgendes vorweggenommen: Auch die Reaktion $\text{Fl}_{\text{red}}\text{H}_2^- + \text{R}^+$ kann je nach Reaktionsbedingungen und Raumerfüllung des Substituenten R in Stellung 5 oder 4a erfolgen, zusätzlich zu Stellung N(3).

Schema 3



Setzt man N(3)-voralkylierte Flavine ($\text{Fl}_{\text{ox}}\text{R}$) ein, so erfolgt die weitere basenkatalysierte Alkylierung des Flavohydrochinons zuerst an N(5) oder C(4a) und nicht an O(2,4) oder N(1) (Schema 3, b). Dies ist besonders erstaunlich, da doch N(5)H im $\text{Fl}_{\text{red}}\text{H}_3$ ein Pyrrol-NH ist, ohne saure oder basische Eigenschaften. Eine Erklärungsmöglichkeit folgt daraus, dass stets kleine Mengen des Radikalanions $\text{FIR}'\text{H}^-$ vorhanden sind, welche bevorzugt an N(5) reagieren.

Wir danken Dr. C.R. JEFCOATE für wertvolle Mitarbeit und Diskussion; dem Mikroanalytischen Laboratorium der CIBA AG (Dr. W. PADOWETZ) für die Ausführung der Mikroanalysen; dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG für die Unterstützung dieses Projekts (Nr. 4201), dem U.S. PUBLIC HEALTH SERVICE (Grant Nr. GM 142421-01 für Apparate-Beihilfe und Grant Nr. GM 11106 für allgemeine Unterstützung), sowie Fr. U. HARTMANN und Fr. L. NEBEL für technische Assistenz.

Experimenteller Teil

A. *Dünnschichtchromatographie* (DC) (vgl. [14]). Sofern die Dihydroflavine unter der UV.-Lampe nicht erkennbar waren, wurden sie auf der Platte mit Nitrit/Säure entwickelt. Fließmittel: A: n-Butanol/Äthanol/Wasser = 7:2:1; B: n-Butanol/Äthanol/konz. HCl = 7:2:1; C: Benzol/Diisopropyläther/ CHCl_3 = 2:2:1.

B. *Spektren.* – 1. Die Elektronenspektren im Bereich 700–200 nm wurden mit einem BECKMAN DB und einem CARY 14 Spektrophotometer aufgenommen. Die verwendeten Pufferlösungen waren 0,1 N und zwar Phosphat (pH 7), Acetat (pH 5), Borat (pH 9), Sulfat (pH 2). *S* = Schulter.

2. Die IR.-Spektren wurden in KBr-Presslingen mit einem BECKMAN IR 8 aufgenommen. Die Zahlen in den Klammern geben die Stellung der funktionellen Gruppe im Flavinkern wieder.

3. Die NMR.-Spektren verdanken wir Herrn K. AEGERTER vom Institut für Organische Chemie, Universität Basel. Sie wurden mit einem VARIAN-A-60-Spektrometer aufgenommen; alle in CDCl_3 , wenn nicht anders erwähnt. Referenz: Tetramethylsilan ($\delta = 0$). Chemische Verschiebung in δ -Werten (ppm). *d* = Dublett, *t* = Triplet, *q* = Quadruplett; *J* = Kopplungskonstante in cps. Konzentration der Messlösungen ungefähr 0,1 M.

C. Die *Smp.* wurden auf einem KOFER-Block bestimmt und sind korrigiert. – Die *Mikroanalysen* verdanken wir dem Mikroanalytischen Laboratorium der CIBA AG, Basel (Herrn Dr. W. PADOWETZ). Fehlergrenze $\pm 0,4\%$ absolut.

D. *Gas-chromatographie* [12].

E. *Photoapparatur*: Schemazeichnung der Apparatur zur Photoreaktion s. Fig.

F. *Synthesen.* – 3-Methyl-5-benzyl-1,5-dihydrolumiflavin (IIa) und 3-Methyl-4a-benzyl-4a,5-dihydrolumiflavin (IIIa): 900 mg feinpulverisiertes 3-Methylumiflavin (Ia) [15] werden in 200 ml H_2O mit 9 g Ammoniumphenylacetat⁴) unter 99,9-proz. N_2 -Strom (5 ml/Min.) 18 Std. bei 15° mit einer 200-Watt W-Lampe belichtet (siehe Schema der Photoapparatur). Eine mit MeOH verdünnte Probe zeigt spektrophotometrisch praktisch keine Absorption des Ausgangsmaterials mehr (445 nm), wohl aber bei Luftzutritt Grünfärbung (620 nm) infolge Radikalbildung. Nach Zusatz von $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ wird die Mischung unter Lichtausschluss schnell filtriert. Der Rückstand ist ein Gemisch von IIa und IIIa. Gesamtausbeute: über 90% d. Th.

Trennung des Gemisches: 3-Methyl-4a-benzyl-4a,5-dihydrolumiflavin (IIIa): Der Rückstand wird im Sinterfilter mit Portionen zu 20 ml 2 N NH_3 unter $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -Zusatz so lange ausgewaschen, bis das Filtrat keine Gelbfärbung mehr zeigt. Der Rückstand wird mit H_2O neutral gewaschen und im Hochvakuum getrocknet: 580 mg (47%) hellgelbes Pulver.

Ausführung der Reaktion bei 50° führt ausschliesslich zu (IIIa), in einer Ausbeute von 90%.

UV.-Spektrum und DC (A) des Rohproduktes zeigen noch geringe Anteile von Ausgangsmaterial Ia. Zur Analyse wird unter Lichtausschluss zweimal sorgfältig aus Methylenchlorid/Petroläther umkristallisiert. Zersetzungspunkt 230°.

Eine 10^{-3} M aerobe methanolische Lösung von IIIa, belichtet in einer 1-mm-Glas-Küvette (Abstand 5 cm) durch eine 40-Watt W-Lampe, zeigt nach 15 Min. quantitative Rückbildung von Ia. Spektren: in MeOH: λ_{max} 360, 300 (S), 220 nm; bei pH 5: λ_{max} 364, 300 (S), 220 nm; in 2 M HClO_4 : λ_{max} 390, 300 (S) nm (Kation). – IR.-Spektrum: ν_{CO} (2) 1670; ν_{CO} (4) 1720; ν_{NH} (5) 3350 cm^{-1} . – NMR.-Spektrum: Aryl-H (7,3 bis 6,6), N(5)H (4,7 tauscht aus), N(3) CH_3 (3,65), N(10) CH_3 (3,1), C(4a) CH_2 (3,0 d, *J* = 2), C(7) CH_3 , C(8) CH_3 (2,25).

$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_2\text{N}_4$ (362,4) Ber. C 69,6 H 6,1 N 15,5% Gef. C 69,4 H 6,2 N 15,4%

Das gelbliche, $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ -haltige, ammoniakalische Filtrat der Auftrennung wird unter Luftaustauschluss auf pH 3 gestellt, das gefällte 3-Methyl-5-benzyl-1,5-dihydrolumiflavin (IIa) filtriert, mit H_2O gewaschen und im Hochvakuum getrocknet: 500 mg (42%) analysenreines, gelbgrünes Pulver, Doppel-Smp. 138–141° und 185–230° (Zers.). Beim 1. Smp. Umlagerung von IIa in IIIa. Titration von IIa in 0,1 N NaClO_4 bei 20° unter N_2 ergibt einen $\text{p}K_a = 7,2$. Spektren: in MeOH: λ_{max} 340, 250 nm; in 2 M NH_3 : λ_{max} 345, 290 nm (Anion). – IR.-Spektren: ν_{CO} (4) 1700, ν_{CO} (2) 1670, ν_{NH} (1) um 3000 cm^{-1} . – NMR.-Spektren⁵): Aryl-H (7,3 bis 6,25), N(5) CH_2 (4,4), N(3) CH_3 (3,3), N(10) CH_3 (2,8), C(7) CH_3 und C(8) CH_3 (2,15).

$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_2\text{N}_4$ (362,4) Ber. C 69,6 H 6,1 N 15,5% Gef. C 68,8 H 6,1 N 15,2%

5-Benzyl-1,5-dihydrolumiflavin (IIb) und 4a-Benzyl-4a,5-dihydrolumiflavin (IIIb): 400 mg Lumiflavin (Ib) [15], gelöst in 10 ml 0,5 M NaOH, werden in der Photoapparatur durch 3,3 g Ammoniumphenylacetat und 0,7 g Phenylelessigsäure in 200 ml H_2O frisch gefällt; pH der Reaktionslösung = 8,5. Ausführung der Reaktion analog der Herstellung von IIa und IIIa. Aufarbei-

⁴) Phenylelessigsäure *puriss.* wird in wenig MeOH gelöst, mit konz. NH_3 neutralisiert und durch Einengen als Ammoniumsalz kristallisiert.

⁵) In CDCl_3 + 10% D_2O , 1 M an $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$.

tung: Bei pH 8,5 ist IIb löslich. Filtration der Reaktionslösung liefert 0,2 g (37%) IIIb. Zersetzungspunkt um 300°. Analyse nach zweimaligem Kristallisieren aus CH_2Cl_2 /Petroläther:

$\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_2\text{N}_4$	Ber. C 68,9	H 5,8	O 9,2	O 16,1%
(349,4)	Gef. „ 68,3	„ 5,7	„ 9,6	„ 15,8%

Ansäuern des Filtrats mit 2N Essigsäure unter $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -Zusatz liefert 0,25 g (45%) IIb. IIb ist weniger stabil gegen Luft und Feuchtigkeit als IIa. Beim Trocknen im Hochvakuum verfärbt sich IIb langsam grünlich. Das Spektrum zeigt zunehmende Anteile an grünem Radikal und Lumiflavin (Ib).

3-Methyl-4a- α -Phenäthyl-4a,5-dihydrolumiflavin (IIIc): Bei der Herstellung analog IIIa wurde aus 220 mg 3-Methyl-lumiflavin (Ia), 2,2 g Ammonium- α -phenylpropionat⁶⁾ in 200 ml H_2O bei 15° ausschliesslich IIIc erhalten: 250 mg (83%) gelbliches Pulver, Smp. 250°. Zur Analyse aus CH_2Cl_2 /Petroläther umkristallisiert. Spektrum: in MeOH: λ_{max} 364, 310 (S) nm. – IR.-Spektrum: $\nu\text{NH}(5)$ 3350, $\nu\text{CO}(4)$ 1730, $\nu\text{CO}(2)$ 1675 cm^{-1} . – NMR.-Spektrum: Aryl-H (7,35 bis 5,65), N(5)H (4,95, tauscht aus) N(3)CH₃ (3,65), N(10)CH₃ (3,05), C(4a)CH (3,35 q, J = 7), C(7)CH₃ und C(8)CH₃ (2,25), C(1')CH₃ (1,35 d, J = 7).

$\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{O}_2\text{N}_4$ (376,4)	Ber. C 70,2	H 6,4	O 8,5%	Gef. C 69,8	H 6,5	O 9,1%
--	-------------	-------	--------	-------------	-------	--------

IIIc ist analog IIIa in aerober methanolischer Lösung photolabil und zeigt 100-proz. Rückbildung von Ia.

4a-Phenyl-4a,5-dihydrolumiflavin-3-essigsäure (IIId): Herstellung analog IIIa, aber bei 50°: 400 mg Lumiflavin-3-essigsäure (Ic) [15] werden mit 4 g Ammoniumphenylacetat bei 50° umgesetzt. Dann wird die mit wenig 6N HCl auf pH 5,5 gestellte Lösung mit 3 Portionen von je 50 ml CDCl_3 ausgeschüttelt. Flavin und Teile der Phenylessigsäure gehen in die CHCl_3 -Phase. Diese wird mit 5 Portionen zu je 50 ml 0,5M Acetatpuffer pH 5,5 extrahiert, anschliessend mit H_2O gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der Rückstand, 1,0 g, wird in NaHCO_3 aq. gelöst, mit Kohle filtriert und durch 2N HCl gefällt. Die gelblichen Flocken werden filtriert, gewaschen und im Hochvakuum getrocknet: 0,45 g, Smp. 133–137°. Zur Analyse wird zweimal aus NaHCO_3 aq./2N HCl und zweimal aus MeOH/2N HCl umgefällt.

$\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{O}_4\text{N}_4$ (406)	Ber. C 65,0	H 5,5%	Gef. C 65,7	N 5,6%
--	-------------	--------	-------------	--------

3-Methyl-4a,5-dibenzyl-4a,5-dihydrolumiflavin (IX): 500 mg 3-Methyl-lumiflavin (Ia) und 5 g Benzyltrimethylammoniumphenylacetat⁷⁾ werden in 200 ml CHCl_3 (über P_2O_5 dest.) gelöst und unter 99,9-proz. N_2 (gesättigt an CHCl_3) 15 Std. bei 15° mit einer 200-Watt W-Lampe belichtet. Eine mit CHCl_3 verdünnte Probe zeigt danach keine Absorption von Ia (450 nm) mehr. Die Lösung wird filtriert und mit 5 Portionen zu 50 ml 0,1M Phosphatpuffer pH 7 extrahiert, mit Wasser gewaschen, getrocknet und eingeengt. Der Rückstand, 1,1 g braunes Öl, wird in einem Minimum von CHCl_3 /Petroläther-(2:3) gelöst und auf einer Al_2O_3 -Säule (FLUKA, Typ 507C) mit demselben Fließmittel chromatographiert. Eine gelbliche Bande wird in Portionen eluiert und erweist sich dünnschichtchromatographisch in den Systemen B und C homogen. Die vereinigten Eluate werden im Vakuum eingeengt und mit CH_2Cl_2 /Petroläther kristallisiert: 0,22 g (26%) gelbliches Pulver, Smp. 79–82°. UV.-Spektren: bei pH 7: λ_{max} 345, 308, 280 nm; in MeOH: λ_{max} 342, 302, 282 nm; in 6N HClO_4 : λ_{max} 385, 310, 260 (S) nm (Kation). – IR.-Spektrum: $\nu\text{CO}(4)$ 1720, $\nu\text{CO}(2)$ 1670 cm^{-1} , kein NH. – NMR.-Spektrum: Aryl-H (7,35 bis 6,6), N(5)CH₂ (4,35), N(3)CH₃ (3,35), N(10)CH₃ (3,1), C(4a)CH₂ (3,0 d), C(7)CH₃ und C(8)CH₃ (2,35 und 2,25).

$\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{O}_2\text{N}_4$, $1/10$ CH_2Cl_2	Ber. C 73,2	H 6,2	O 7,0	N 12,4	Cl 1,5%
(460,3)	Gef. „ 72,8	„ 6,6	„ 7,4	„ 12,0	„ 1,1%

3-Methyl-4a-hydroxy-5-benzyl-4a,5-dihydrolumiflavin (V): 100 mg 3-Methyl-5-benzyl-1,5-dihydrolumiflavin (IIa) werden im Schliffkolben unter N_2 zu 10 ml CHCl_3 und 2 g $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ in 10 ml 0,5M Phosphatpuffer pH 7 gegeben. Die Chloroformphase verfärbt sich sofort intensiv grün infolge Bildung des neutralen Radikals. Die zweiphasige Mischung wird bei 20° unter Lichtabschluss 30 Min. geschüttelt und färbt sich wieder hellgelb. Die CHCl_3 -Phase enthält nach Waschen

⁶⁾ Hergestellt durch Neutralisieren von α -Phenylpropionsäure *purum* (= Hydratropsäure) mit NH_3 .

⁷⁾ 10 g Phenylessigsäure *puriss.* und 12,3 g Benzyltrimethylammoniumhydroxid *purum*, 40-proz. in MeOH, werden im Rotationsverdampfer eingeengt: 21 g weisses Pulver, extrem hygroscopisch, sehr gut wasser- und CHCl_3 -löslich.

mit H_2O und Trocknen 90 mg (85%) braun-rötliches Pulver. Dieses lässt sich in $CDCl_3$ durch Schütteln mit Dithionit aq. über das grüne Radikal zur Ausgangsverbindung Ia reduzieren. Zur Analyse wurde in wenig Äther gelöst, mit Kohle filtriert und durch Petroläther gefällt. Grüne Kristalle, Smp. 149–153°. Spektren: in MeOH: λ_{max} 356, 308 nm; bei pH 5: λ_{max} 360, 316 nm. – IR.-Spektrum: $\nu CO(4)$ 1700, $\nu CO(2)$ 1640 cm^{-1} , kein NH. – NMR.-Spektrum: Aryl-H (7,3 bis 6,7), N(5)CH₂ (4,65), N(3)CH₃ (3,55), N(10)CH₃ (3,2), C(7)CH₃ und C(8)CH₃ (2,3 und 2,25), C(4a)OH (1,65 ?).

$C_{21}H_{22}O_3N_4$ (378,4) Ber. C 66,6 H 5,9 N 14,8% Gef. C 66,6 H 5,9 N 14,7%

3-Methyl-5-benzylflavinium-Perchlorat (VI): 50 mg 3-Methyl-4a-hydroxy-5-benzyl-4a,5-dihydrolumiflavin (V) werden in 0,5 ml Aceton abs. durch Erwärmen gelöst und nach dem Abkühlen mit 0,3 ml 2M $HClO_4$ versetzt. Die Farbe schlägt dabei nach blutrot um. Die Lösung wird bei 5° auf die Hälfte eingeeengt. Beim Anreiben bilden sich schwarze Nadeln, welche schnell filtriert, mit Aceton gewaschen und im Hochvakuum getrocknet werden: 45 mg (74%), Zers. um 300°. Die Kristalle sind nicht haltbar; schon nach einigen Tagen sind im Mikroskop debenzylerte Anteile von Ia erkennbar. V ist in $CHCl_3$ schlecht löslich, dagegen gut in Dimethylformamid, CH_3CN und Aceton. Auch O_2 -freie Lösungen von V sind nur über Stunden haltbar. Mit Säure entsteht quantitativ Ia und Benzylalkohol [12].

Spektrum: in CH_3CN : λ_{max} 570, 395 nm. – IR.-Spektrum: $\nu CO(4)$ 1710, $\nu CO(2)$ 1670, νClO_4^- 1090 cm^{-1} .

3-Methyl-4a-benzyl-5-methyl-4a,5-dihydrolumiflavin (X): 110 mg 3-Methyl-5-benzyl-1,5-dihydrolumiflavin (IIa) in 20 ml Dimethylformamid werden in einem Schliffkolben unter N_2 nacheinander mit 400 mg K_2CO_3 , einer Lösung von 250 mg $Na_2S_2O_4$ in 3 ml H_2O und mit 1 ml CH_3J versetzt. Der Kolben wird bei 25° 15 Std. geschüttelt, wobei sich die Farbe von grünlich nach blass-gelb ändert. Die Mischung wird mit 2N Essigsäure neutralisiert und das Flavin mit $CHCl_3$ extrahiert. Die $CHCl_3$ -Phase wird mit Wasser gewaschen, getrocknet und bei möglichst tiefer Temperatur eingeeengt. Rückstand: Grün-bräunliches Öl, welches langsam bei Raumtemperatur in Wasser eingerührt wird. Der farblose Niederschlag wird filtriert, mit H_2O gewaschen und getrocknet: 60 mg, hellgelbes Pulver. Im DC (C) zeigt X einen Hauptfleck mit $R_f > IIa$. Das Pulver wird in einem Minimum von $CHCl_3$ gelöst und auf einer Säule von Al_2O_3 (FLUKA, Typ 507C) mit $CHCl_3$ /Petroläther 1:1 chromatographiert. Eine gelbliche Bande wird eluiert und erweist sich dünnschichtchromatographisch im System C homogen. Die vereinigten Eluate werden im Vakuum eingeeengt und mit Petroläther kristallisiert. Smp. 175–180°. X ist wie IX in Lösung photostabil, lässt sich aber mit HONO in Säure fast quantitativ zu Ia reoxydieren. Spektren: in MeOH: λ_{max} 330, 305, (280) nm; bei pH 5: λ_{max} 330, 275 nm; in 6N HCl: λ_{max} 313, 250 nm. – IR.-Spektrum: $\nu CO(4)$ 1720, $\nu CO(2)$ 1670 cm^{-1} , kein νNH . – NMR.-Spektrum: Aryl-H (7,35 bis 6,7), N(5)CH₃ (3,75), N(3)CH₃ (3,05), C(4a)CH₂ (3,0 d), N(10)CH₃ (2,75), C(7)CH₃ und C(8)CH₃ (2,3 und 2,35).

$C_{22}H_{24}O_2N_4$ (376,4) Ber. C 70,2 H 6,4 O 8,5% Gef. C 69,9 H 6,3 O 9,0%

3-Methyl-4a-benzyl-5-formyl-dihydrolumiflavin (VIII): 300 mg 3-Methyl-4a-benzyl-dihydrolumiflavin (IIIa) werden in einem Schliffkolben bei Zimmertemperatur unter N_2 und Lichtabschluss mit 10 ml 100-proz. Ameisensäure und 4 ml Acetanhydrid versetzt. Die Mischung wird 20 Std. bei 25° unter gelegentlichem Schütteln aufbewahrt, dabei löst sich IIIa langsam mit hellgelber Farbe. Die Lösung wird bei Raumtemperatur im Hochvakuum abgedampft, der bräunliche Rückstand in CH_2Cl_2 gelöst, mit wenig Aktivkohle filtriert, durch Zusatz von Petroläther kristallisiert und getrocknet: 150 mg farblose Nadeln, Smp. 126–129° (Präparat a). VIII kann auch aus Aceton/Petroläther umkristallisiert werden (Präparat b). Beide Präparate zeigen jeweils in der Verbrennungsanalyse und im NMR. die Anwesenheit von einer halben Molekel Lösungsmittel pro Flavin. – Präparat b: Spektrum: in MeOH: λ_{max} 320, 260 (S) nm. – IR.-Spektrum: $\nu CO(4)$ 1725, $\nu CO(2)$ 1675 cm^{-1} , kein νNH . – NMR.-Spektrum: N(5)CHO (8,5), Aryl-H (7,5 bis 6,7), N(3)CH₃ (3,7), N(10)CH₃ und C(4a)CH₂ (3,1), C(7)CH₃, C(8)CH₃ (2,4 Signal verbreitert), $\frac{1}{2} CH_3COCH_3$ (3 H, 2,2).

a) $C_{22}H_{22}O_3N_4, \frac{1}{2} CH_2Cl_2$ Ber. C 62,5 H 5,3 O 11,1 N 13,0 Cl 8,2%
(432,5) Gef. „ 62,8 „ 5,5 „ 10,9 „ 13,2 „ 8,2%

b) $C_{22}H_{22}O_3N_4, \frac{1}{2} CH_3COCH_3$ Ber. C 67,3 H 6,0 O 13,3 N 13,4%
(420) Gef. „ 67,6 „ 5,9 „ 13,3 „ 13,2%

VIII wird unter oxydativen Bedingungen (H_2O_2 , HONO) in 6N HCl quantitativ zu 3-Methylumiflavin (Ia) verseift.

3-Methyl-4a-benzyl-1,1a,4a,5-tetrahydrolumiflavin (VII): 109 mg (0,31 mMol) 3-Methyl-4a-benzyl-4a,5-dihydrolumiflavin (IIIa) werden mit einem vorhydrierten Gemisch von 15 ml Eisessig und 200 mg Pt 10%, SiO₂ in einer verschlossenen Hydrierbirne vereinigt. Nach der Aufnahme von 7,0 ml H₂ (0,31 mMol) innerhalb 1–1,5 Std. wird der Katalysator abfiltriert, die Lösung mit 30 ml CH₃COONa aq. versetzt, der Niederschlag abfiltriert, mit H₂O gewaschen und getrocknet: 95 mg (85%) hellgelbes Pulver, Zersetzungspunkt 220°. Zur Analyse wird aus CHCl₃/Petroläther umkristallisiert. Spektrum: in MeOH: λ_{max} 312, 218 nm. – IR.-Spektrum: ν CO(4) 1730, ν CO(2) 1680, ν NH(5) 3350, ν NH(1) 3230 cm⁻¹. – NMR.-Spektrum: Aryl-H (7,4 bis 6,4), C(1a)H (4,75), N(5)H (4,3 tauscht aus), N(3)CH₃ (3,25), C(4a)CH₂ (3,1 d), N(10)CH₃ (3,0), C(7)CH₃ und C(8)CH₃ (2,2 aufgespalten), N(1)H (0,95 ?).

C ₂₁ H ₂₄ O ₂ N ₂	Ber. C 69,2	H 6,6	O 8,8	N 15,4%
(364,4)	Gef. „ 68,9	„ 6,9	„ 8,7	„ 15,1%

SUMMARY

Structure and properties of leucoflavin derivatives obtained through flavin-sensitized photodecarboxylation of phenylacetate ions are described. The photo-reduction of flavin with phenylacetate as donor is shown to be a quantitative photo-alkylation, the benzyl residue entering either position 5 (nitrogen) or the bridge position 4a (carbon) of the flavin nucleus, depending on the conditions. The isomers were isolated, and identified by IR., NMR., and elementary analysis. The benzyl residue migrates from N(5) to C(4a) upon heating.

The 5-isomer is similar to the known leucoflavin. Its autoxidation runs through a rather stable radical to give finally 5-benzylflavinium salts or, at neutral pH, the corresponding carbinol base, OH entering position 4a. The flavinium salt undergoes slow benzyl transfer to any medium, *e.g.* water, to give benzyl alcohol and flavin starting material.

The 4a-isomer is neither autoxidizable in the dark nor photolabile in the absence of O₂, but decomposes under the influence of air *and* light to give benzaldehyde and flavin starting material.

Thus, at suitable pH (5) and temperature, in the presence of air and light, flavin acts as a sensitizing catalyst for the oxidative decarboxylation of phenylacetate.

Scope, limitations, mechanism and biological implications of this reaction will be discussed elsewhere.

Institut für Anorganische Chemie, Universität Basel

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 14. Mitteilung: W. FÖRY & P. HEMMERICH, *Helv. 50*, 1766 (1967).
- [2] G. R. PENZER & G. K. RADDA, *Quarterly Rev. (London) 1967*, XXI, 43; B. HOLMSTRÖM, *Ark. Kemi 22*, 329 (1964).
- [3] K. ENNS & W. H. BURGESS, *J. Amer. chem. Soc. 87*, 5766 (1965).
- [4] W. R. FRISSELL, C. W. CHUNG & C. G. MACKENZIE, *J. biol. Chemistry 234*, 1297 (1959).
- [5] K. H. DUDLEY, A. EHRENBERG, P. HEMMERICH & F. MÜLLER, *Helv. 47*, 1354 (1964).
- [6] P. HEMMERICH, V. MASSEY & G. WEBER, *Nature 213*, 728 (1967).
- [7] V. MASSEY, P. HEMMERICH & W. H. WALKER, in Vorbereitung.
- [8] R. KUHN & F. WEYGAND, *Ber. deutsch. chem. Ges. 67*, 1407 (1934).
- [9] H. GAWRON, *Nature 194*, 1270 (1963).
- [10] M. E. PULLMAN, A. SAN PIETRO & S. P. COLOWICK, *J. biol. Chemistry 206*, 129 (1954).
- [11] K. H. DUDLEY & P. HEMMERICH, *Helv. 50*, 355 (1967).
- [12] C. E. R. JEFCOATE, W. H. WALKER & P. HEMMERICH, in Vorbereitung.
- [13] F. MÜLLER & P. HEMMERICH, in Vorbereitung.
- [14] F. MÜLLER & P. HEMMERICH, *Helv. 49*, 2352 (1966).
- [15] P. HEMMERICH, *Helv. 47*, 464 (1964).