

197. Studien in der Flavin-Reihe

XIX. Mitteilung¹⁾

Anomale Reduktion des Flavinkerns: Pteridine aus (Iso)alloxazinen²⁾

von C. Heizmann³⁾, P. Hemmerich, R. Mengel und W. Pfeleiderer

Fachbereiche Biologie und Chemie der Universität Konstanz

Prof. Dr. M. Viscontini zum 60. Geburtstag gewidmet

(18. V. 73)

Summary. The catalytic hydrogenation of isoalloxazines in aqueous solutions proceeds non-stoichiometrically.

This is explained by a reaction side path, which is competitive with the normal reversible 1,5-dihydrogenation and leads to the irreversible reduction of the 'o-xyloquinoid' (rather than benzenoid) subnucleus in the (iso)alloxazine system. In trifluoroacetic acid, this irreversible side reaction is found to be complete within several hours, while 8 H-equivalents are absorbed per flavin molecule. The products are shown to be cyclohexano-[g]-pteridine-2,4-diones in the normal 5,6,7,8-tetrahydro state, which are oxidized to yield, subsequently, 7,8-dihydro- and 'fully oxidized' pteridines (= 6,7,8,9-tetrahydroflavins).

The spectral characteristics, tautomeric structures and pK-values are discussed in context with recent data on 6,7,8-trialkylpteridine-2,4-diones [3].

Einleitung. – Schon in den dreissiger Jahren berichteten *Karrer et al.* [4] darüber, dass Isoalloxazine («Fl») bei katalytischer Hydrierung relativ leicht über die Dihydrostufe hinaus in irreversibler Weise reagieren können. Die dabei erhaltenen, luftempfindlichen Octahydroderivate (FIH₈) interpretieren sie richtig als 8-alkylierte 6,7-Cyclohexano-1,5,6,7-tetrahydropteridin-2,4-dione (= Tetrahydroalumazine) [4], obwohl kein eigentlicher Strukturbeweis, wie wir ihn im folgenden geben, vorliegt. Bei Derivaten des Riboflavins, d.h. 7,8-Dimethyl-isoalloxazinen, fanden sie diese «Überhydrierung» offensichtlich nicht. Es ist uns jedoch bei Flavin-Studien schon seit einigen Jahren aufgefallen, dass in neutraler wässriger Lösung immerhin signifikant über-stöchiometrische H₂-Mengen bei der katalytischen Flavin-Hydrierung verbraucht werden (bis zu 1,2 Mol-Äqu.). Bei systematischer Suche fanden wir, dass die Reaktion in wasserfreier Trifluoressigsäure quantitativ bis zum Octahydroderivat abläuft, während der Abbruch der Reaktion in Wasser auf die Bildung des 1,5-Dihydroflavin (FIH₂) zurückzuführen ist, welches – einmal gebildet – mit H₂ nicht weiterreagieren kann (vgl. Schema).

Die im folgenden abgehandelten, römisch bezifferten Verbindungen stehen mit dem Formelschema wie folgt in Verbindung:

¹⁾ XVIII Mitt.: [1].

²⁾ Vorläufige Mitt.: [2].

³⁾ Derzeitige Adresse: University of Washington, Dept. of Biochemistry Seattle, Washington 98195/USA.

Fl:	I	R = R' = H	FlH ₂ :	V	R = R' = H
	II	R = CH ₃ , R' = H		VI	R = CH ₃ , R' = H
	III	R = R' = CH ₃		VII	R = R' = CH ₃
	IV	R = Ribityl, R' = H		VIII	R = Ribityl, R' = H
FlH ₈ :	IX	R = R' = H	FlH ₇ CHO:	XIII	R = R' = H
	X	R = CH ₃ , R' = H		XIV	R = CH ₃ , R' = H
	XI	R = R' = CH ₃			
	XII	R = Ribityl, R' = H			
FlH ₆ :	XV	R = R' = H	FlH ₄ :	XIX	R = R' = H
	XVI	R = CH ₃ , R' = H		XX	R = CH ₃ , R' = H
	XVII	R = R' = CH ₃		XXI	R = R' = CH ₃
	XVIII	R = Ribityl, R' = H		XXII	R = Ribityl, R' = H
FlH ₂ NOH:	XXIII	R = CH ₃ , R' = H			
	XXIV	R = R' = CH ₃			

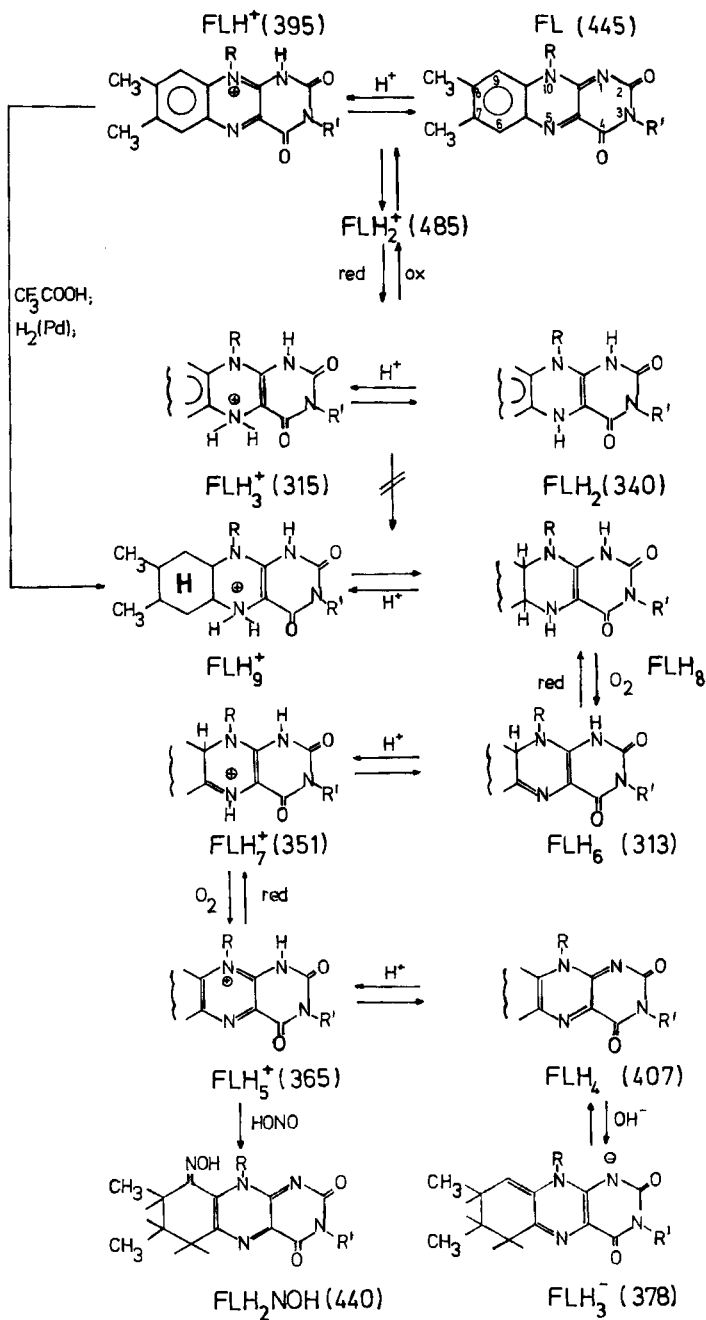
In der vorliegenden Arbeit knüpfen wir an die Kurzmitteilung von *Karrer et al.* [4] an, um durch Vergleich mit «*iso*- π -elektronischen» Lumazinen die Struktur der von diesen Autoren intuitiv richtig erkannten Octahydroflavine zu belegen und die von ihnen fehlinterpretierte Autoxydation derselben abzuklären. Nach heutiger Kenntnis von Struktur und Spektren der Dihydropteridine zeigt sich nämlich, dass das *Karrer*'sche «Hexahydroflavin» kein 6,7-Dihydropteridin, wie angenommen, sondern ein 7,8-Dihydropteridin ist, welches zum Pteridin (= Tetrahydroflavin) weiteroxydiert werden kann.

Die katalytische Hydrierung des Flavinkerns. – Der Flavin-Kern ist die redox-aktive Funktion des Vitamins B₂ und der Flavokoenzyme. Wir definieren ihn in seiner oxydierten Form als 10-alkyliertes 7,8-Dimethylisoalloxazin oder kurz «Flavochinon». Letztere Bezeichnung beruht darauf, dass die «normale» Reduktion des Flavins thermodynamisch streng reversibel ist, da die aufgenommenen Wasserstoff-Äquivalente an den Stickstoffatomen in den Stellungen 1 und 5 fixiert sind. Ausser dieser reversiblen 1,5-Hydrierung findet man jedoch «anomale» irreversible (Photo) Reduktionen, so mit BH₄ zum 3,4-Dihydroflavin [5], mit nukleophilen Alkylresten zum 4a,5-Dihydroflavin [6], [7] und – Thema dieser Arbeit – mit katalytisch aktiviertem Wasserstoff zum Octahydroflavin FlH₈ (vgl. Schema).

In Fig. 1 wird der Verlauf dieser Hydrierung in wässriger und nichtwässriger Säure verglichen. Es zeigt sich, dass unter wässrigen Bedingungen die Reaktion nach Aufnahme von ca. 1,2 mol H₂ stehen bleibt, während sie in CF₃COOH stetig weiterläuft, wenn auch nach Aufnahme des ersten H₂-Äquivalents deutlich verlangsamt.

Der spektrale Verlauf dieser Reaktion ist dargestellt in Fig. 2: Die Ausgangsspektren des N(1)-protonierten [8] Flavochinons FlH⁺ (λ_{\max} 390 nm, Kurve 1) in 6N HCl und CF₃COOH unterscheiden sich praktisch nicht. Nach Einleitung von H₂ in Gegenwart von Pd auf Kieselgur entsteht in 6N HCl sofort quantitativ das protonierte 1,5-Dihydroflavin FlH₃⁺ (λ_{\max} 315 nm, Kurve 4), während in CF₃COOH nach Aufnahme von ungefähr einem H-Äquivalent nur ein Gleichgewicht mit vorwiegender Ausbildung des roten Flavosemichinon-Radikalkations FlH₂⁺ (λ_{\max} 490, 350 nm [8], Kurve 2), erreicht wird. FlH₂⁺ steht im Disproportionierungsgleichgewicht mit FlH⁺ und FlH₃⁺, wie auch in Kurve 2 deutlich an der in einer Schulter ausgeprägten Restabsorption 390 nm zu erkennen ist. Die volle Reduktion zum Dihydroflavin ist in CF₃COOH – im

Schema



In Klammern sind die längstwelligen Absorptionsmax. in nm angegeben.

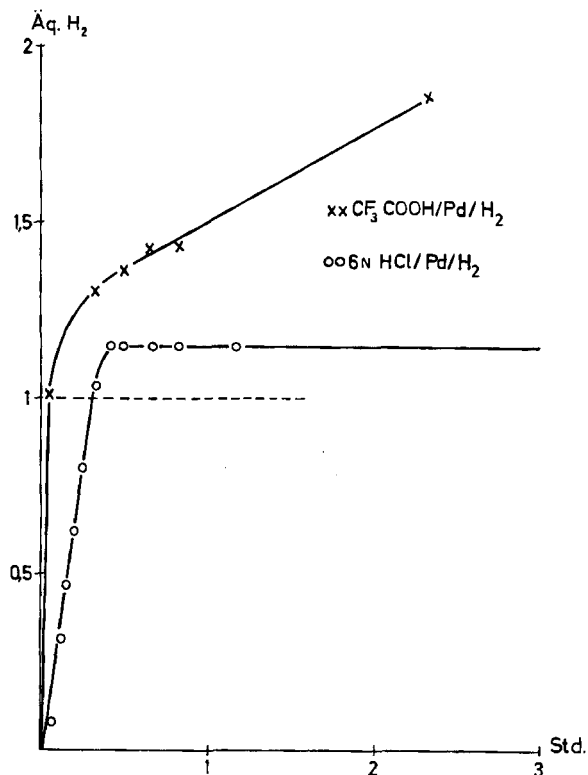


Fig. 1. Katalytische Hydrierung (10% Pd auf Kohle) von 10^{-2} M 3-Methyllumiflavin (vgl. Schema: FlH^+) in CF_3COOH (x x) und in 6N HCl (o o).

Gegensatz zu 6N HCl – somit thermodynamisch blockiert oder mit andern Worten: Das Leukoflavin-Kation reagiert in Abwesenheit von Wasser partiell zum Semichinon-Kation und elementarem Wasserstoff. Dies ist ein weiterer Beleg für die extremen Donor-Eigenschaften des 1,5-Dihydroflavins, welche auf dessen formale Antiaromatizität [9] zurückzuführen sind. Das Flavin-Wasserstoff-Gleichgewicht in CF_3COOH enthält also hinreichend viel oxydiertes Flavin, sodass dieses stetig in einer langsameren und irreversiblen Nebenreaktion unter Angriff von Wasserstoff am benzoiden – oder besser: *o*-xylo-*o*-chinoiden – Teilkern des Flavins abreagieren kann. Die Reaktivität dieses Teilkerns ist inzwischen auch durch zahlreiche andere Reaktionen belegt [10–11]. Die Hydrierung endet nach Ablauf mehrerer Stunden beim 5ständig protonierten 1,5,5a,6,7,8,9,9a-Octahydroflavin, welches durch N(5)-Formylierung stabilisiert und isoliert werden kann (λ_{max} 293 nm, Kurve 3).

Die Inertheit des Semichinons FlH_2^+ und des Leukoflavins FlH_3^+ gegen katalytische Überhydrierung lässt sich sehr einfach dadurch belegen, dass man «stabilisiertes» Leukoflavin RFH , z. B. 1-Alkyl-1,5-dihydroflavin [11–12] oder 5-Alkyl-1,5-dihydroflavin [13], dessen Redoxpotential wesentlich höher liegt als im unsubstituierten Fall, der Hydrierung in CF_3COOH unterwirft: Obwohl hier ebenfalls Semichinon-Kation

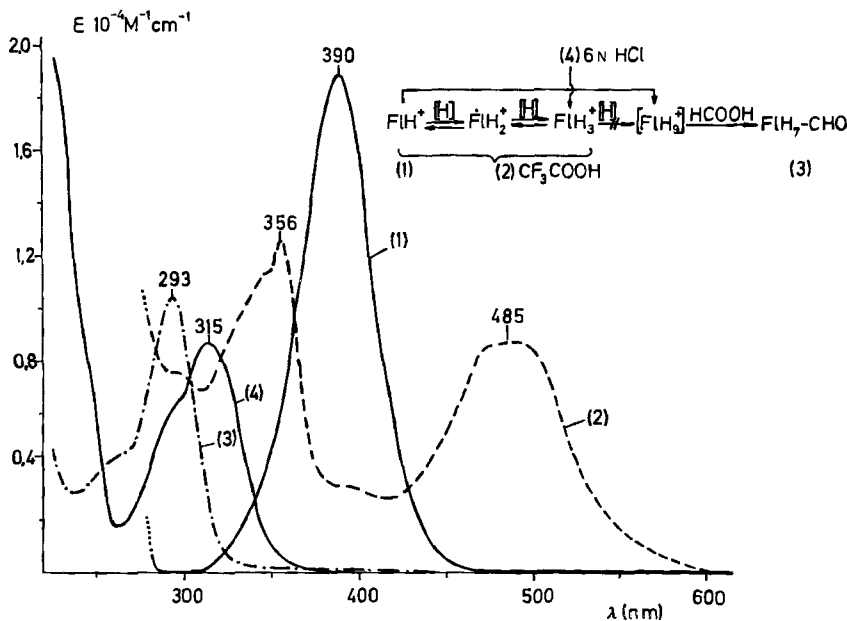


Fig. 2. Spektroskopischer Verlauf der Hydrierungen in CF_3COOH und in 6N HCl

(1) FIH^+ in 6N HCl, bzw. in CF_3COOH .

(2) Gleichgewicht der Hydrierung von FIH^+ (I) in CF_3COOH , Einstelldauer 5 Min.

(3) Durch Formylierung stabilisiertes Endprodukt der Hydrierung (nach 4 Std.) von FIH^+ in CF_3COOH (= $\text{FIH}_7\text{-CHO}$).

(4) Wie (2), jedoch in 6N HCl.

entsteht, tritt dennoch wegen des zu geringen vorhandenen (Disproportionierungs)-Anteils an oxydierter Stufe RFI^+ keine irreversible Weiterhydrierung ein.

Octahydroflavine: FIH_8 (vgl. Schema). – Die Isolierung der FIH_8 -Verbindungen wird einmal durch ihre Luftempfindlichkeit erschwert, welche derjenigen eines Tetrahydropteridins entspricht, zum andern dadurch, dass mindestens zwei neue, im Falle von 7,8-Dimethylisoalloxazinen jedoch vier neue asymmetrische Zentren entstehen mit der entsprechenden Vielfalt an Diastereomeren. Dies führt naturgemäss zu stark verschmierten Signalgruppen im NMR.-Spektrum (Fig. 3, unten). Eine Stabilisierung gegen O_2 wird, wie schon erwähnt, durch N(5)-Acylierung erreicht. Die Diastereomeren lassen sich danach säulenchromatographisch auftrennen, was jedoch nicht weiter verfolgt wurde. Hinsichtlich ihrer Elektronenspektren und pK-Werte sind die Octahydroflavine mit analogen Tetrahydro-Lumazinen identisch, was sich jedoch besser am Beispiel ihrer Oxydationsprodukte, wie unten beschrieben, belegen lässt. Eine Fluoreszenz wird bei reinen FIH_8 -Präparaten oder deren Acylderivaten nicht beobachtet, so dass die älteren Daten hierüber [4] ausschliesslich den Oxydationsprodukten zuzuschreiben sind.

Bei der Autoxydation der Tetrahydropteridine spielen die thermodynamisch reversiblen «chinoiden» Dihydro-Produkte (= 6,7-Dihydropteridine) die wesentlichste Rolle [14–15], ohne dass jedoch dieser von Karrer *et al.* [4] intuitiv postulierte Iso-

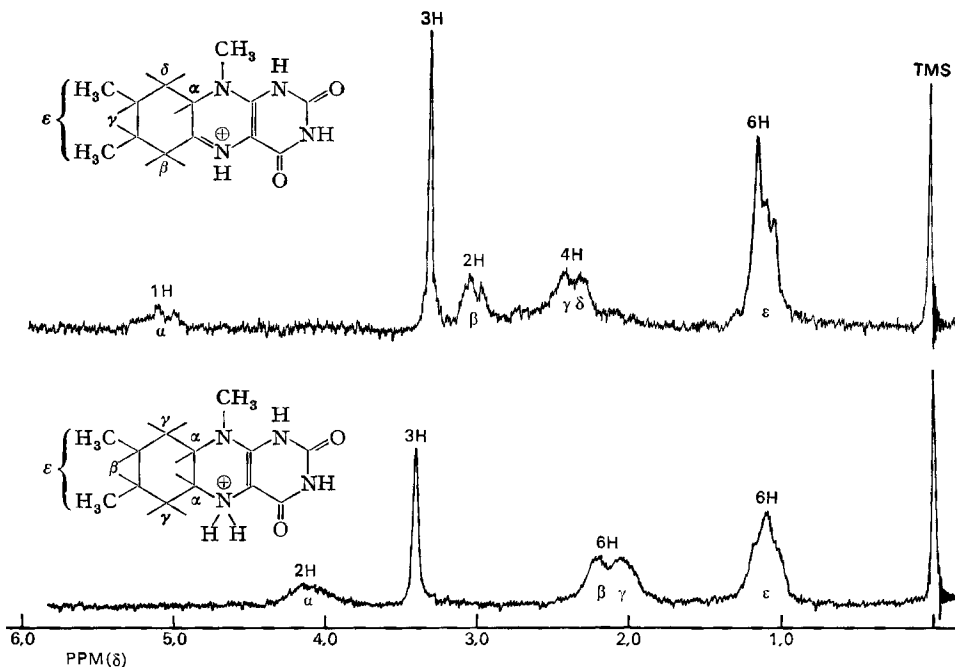


Fig. 3. NMR.-Spektrum des Hexahydroflavins FIH_7^+ (XVII) in CF_3COOH (oben) und des Octahydroflavins FIH_9^+ (XI) in CF_3COOH

meren-Typ sich bisher in irgendeinem Falle chemisch isolieren liess. Immerhin gelang Scrimgeour [14] die spektrale Charakterisierung. Das vollständigste Bild der Tetrahydropteridin-Oxydation geben die Arbeiten von Viscontini *et al.* (vgl. z. B. [16]). Den dort skizzierten Verlauf finden wir auch im vorliegenden Fall der Octahydroflavine bestätigt bis zur Stufe der Hexahydroflavine.

Hexahydroflavine: FIH_6 (vgl. Schema). – Die Autoxydation des Octahydroflavins führt zunächst zu einem farblosen, leicht isolierbaren Hexahydroflavin, dessen NMR.-Spektrum (Fig. 3, oben) selbst beim Isomerengemisch noch ein deutlich ausgeprägtes Triplett eines einzelnen hyperkonjugierten Methinprotons aufweist. Dieser klare Beweis einer 7,8-Dihydropteridin-Struktur wird ferner gestützt durch die in Fig. 4 wiedergegebenen Elektronenspektren und ihren Vergleich mit Daten analoger authentischer Pteridine. Charakteristisch ist der geringe Einfluss der in Alkali erfolgenden 3-Deprotonierung im Gegensatz zu dem erheblichen bathochromen Effekt bei der mit verdünnter Säure erfolgenden N(5)-Protonierung [17]. Es ist dieses Kation, von welchem die Weiteroxydation mit Luft zum Tetrahydroflavin ausgeht, während die Hexahydrostufe unter neutralen bis alkalischen Bedingungen gegen Oxydation stabil ist. Es ist jedoch sicherlich falsch anzunehmen, dass das Kation FIH_7^+ eine wenn auch noch so geringe Tendenz zur C(7)-Deprotonierung habe, wonach ein antiaromatisches Isomer vom bislang unbekanntem 1,5-Dihydropteridintyp [18] Startpunkt der Oxydation sei. Mengel & Pfeleiderer haben aus analogen N(5)-Quartärsalzen [19] kein C(7)-Proton mit Base freisetzen können. Sie konnten selbst unter anaeroben

Bedingungen, d.h. offenbar durch Disproportionierung, nach Umsetzung mit Base nur oxydierte Produkte isolieren, auf welche wir weiter unten im Zuge der Tetrahydroflavine näher eingehen. O_2 muss demnach direkt an C(7)H angreifen [20].

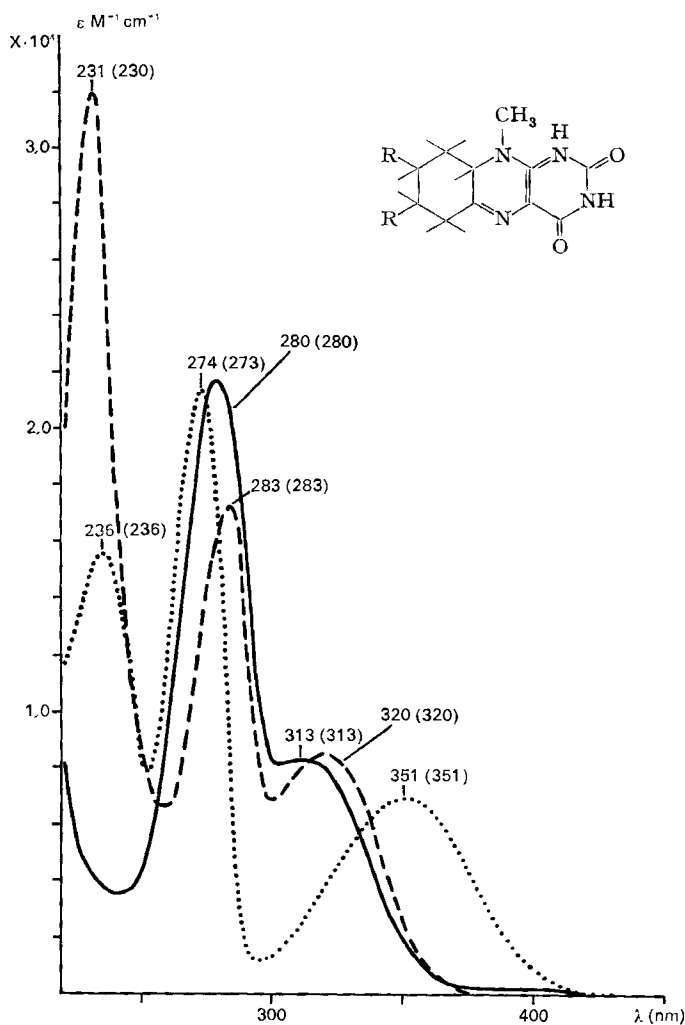


Fig. 4. Vergleich der Absorptionsspektren von FIH_6 mit denen des 6,7,8-Trimethyl-7,8-dihydroalumazins [2] [28]. (—) Spektrum von FIH_6 (Neutralkörper) bei $pH = 7$. (· · ·) des Kations FIH_7^+ bei $pH = 0$. (- - -) des Anions FIH_5^- bei $pH = 13$. Die Zahlen in Klammern geben die Absorptionsmaxima des 6,7,8-Trimethyl-7,8-dihydroalumazins unter gleichen Bedingungen an.

Tetrahydroflavin: FIH_4 (vgl. Schema). - Die, wie erwähnt, bei saurer Autoxydation der Hexahydroflavine langsam entstehenden Tetrahydroflavine sind Flavochinone mit verkürztem Chromophor [2]. Die Neutralkörper sind hellgelb gefärbt mit Absorptionsmaxima im Bereich 410 nm (Fig. 5) und fluoreszieren stark grün (λ_{max}

480 nm). Die dem Octahydroflavin zugeschriebene Fluoreszenz [4] ist demnach auf Tetrahydro-Verunreinigungen zurückzuführen. Gänzlich neue Aspekte werfen jedoch die Tetrahydroflavin-Anionen und -Kationen auf.

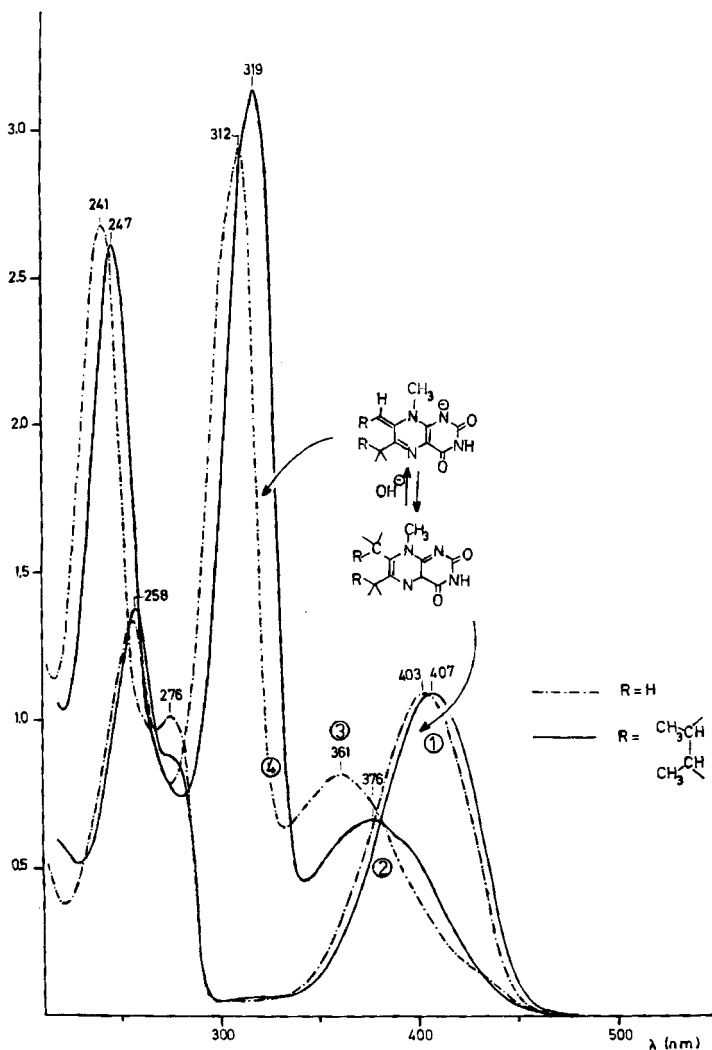


Fig. 5. Vergleich der Absorptionsspektren von FIH₄ mit denen des 6,7,8-Trimethylflavins [2] [28].

- (1) Spektrum von FIH₄ (Neutralkörper) bei pH = 7 und
- (2) des Anions FIH₃⁻ bei pH = 13.
- (3) Spektrum des 6,7,8-Trimethylflavins (Neutralkörper) bei pH = 7 und
- (4) des Anions bei pH = 13.

Tetrahydroflavin-Anionen zeigen, ganz im Gegensatz zu den nichtfluoreszierenden Flavochinon-Anionen, eine blaue Emission (λ_{max} 435 nm). Während die normale 3-Deprotonierung eines Flavochinons nur einen geringen Einfluss auf den längstwelligen

π, π -Übergang hat, erhält man beim Tetrahydroflavin einen völlig veränderten Anion-Chromophor mit scharfen Banden bei 247, 319 und 376 nm (Fig. 5). Danach war es klar, dass die Deprotonierung nicht an N(3) erfolgt sein konnte, sondern an C(7a). Diese Beobachtung gab uns [3] Anlass zu einer Überprüfung der analogen Daten von authentischen 7-Alkylpteridinen, wo wir die vermutete C(7 α)-Deprotonierung bestätigt fanden. Die Tetrahydroflavin-Anionen zeigen gegenüber den 7-Methylumazin-Analogen nur die schwache zu erwartende Hyperkonjugationsverschiebung. Einen direkten Beweis für die «Exo»-Doppelbindung 7,7 α konnten wir im NMR.-Spektrum finden, wenn dieses schnell in D₂O, pH 13, ausgeführt wurde (Fig. 6): Hier zeigt sich neben dem Lösungsmittel-Pik ein Methin-Triplett, welches beim weiteren Stehen durch Austausch mit D₂O verschwindet.

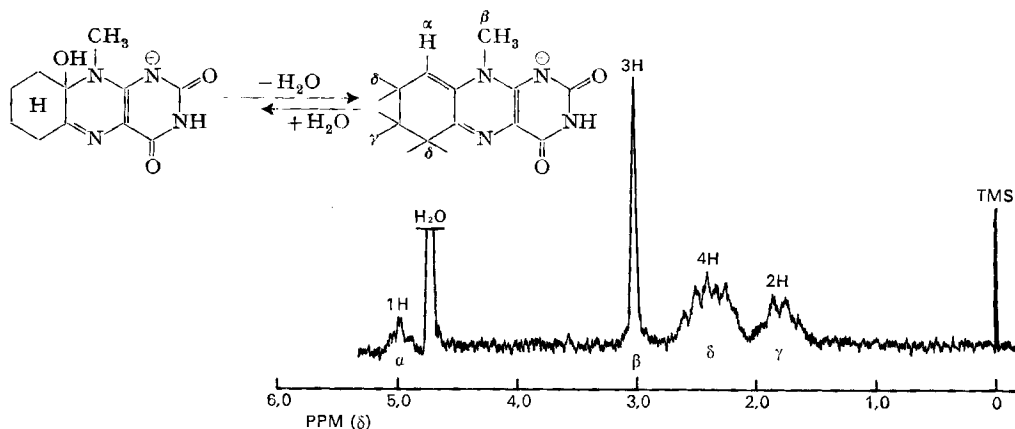


Fig. 6. NMR.-Spektrum von FlH_4 (7,8-Di-nor-XXI) in 0,1M NaOD sofort nach Auflösung aufgenommen. (Bei Überlappung von α -Pik und HO-Pik kann letzterer durch NaCl-Zusatz verschoben werden).

Die Tetrahydroflavine sind ihrerseits noch relativ oxydationsempfindlich, aufgrund der CH_2 -Aktivität in Stellung 9⁴). Salpetrige Säure führt demgemäss zur quantitativen Ausbildung der Oxime FlH_2NOH . Hiervon ausgehend ergeben sich Möglichkeiten zur Synthese 9 ständig funktionell substituierter Flavine, welche wir weiterverfolgen.

Die Eigenschaften der Tetrahydroflavin-Kationen und ihrer N(5)-Quartärsalze sollen an anderer Stelle ausführlich diskutiert werden [20]. Es lässt sich zeigen, dass je nach der Natur des 5-Substituenten (H oder Alkyl) auch bei den Kationen 7,7 α -exo-Alkyliden-Tautomere vorkommen. Dies steht in Übereinstimmung mit dem Vinylog-Fall der 8 α -Methylen-Aktivität bei Flavochinonen [21–22] und der 1,9-Tautomerie bei 8-Alkyldihydroflavinen [13], [23]. Da die biologische Aktivität des Flavochinons in der Substratdehydrierung sich somit vermutlich über die Stellungen 4a,5 und 8 erstreckt [9], [13], könnten sich die Tetrahydroflavine und ihre N(5)-Quartärsalze als Schlüsselmodelle für enzymatische Reaktionen erweisen.

⁴) Stellung 9 in Flavin-Bezifferung entspricht Stellung 7 α in Pteridin-Bezifferung.

Experimenteller Teil

Methoden und Ausgangssubstanzen. Die Smp. wurden auf einem *Kofler*-Block der Firma *Reichert* bestimmt. Absorptionsspektren wurden mit einem *Cary* 14 R-Spektrophotometer aufgenommen unter Verwendung von 1 cm Quarz-Küvetten (λ_{\max} in nm, in Klammern log ϵ). Die Aufnahme der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren erfolgte mit einem *Varian* A 60-Gerät mit Tetramethylsilan als innerem Standard (chemische Verschiebungen in ppm).

Zur Dünnschichtchromatographie (DC.) wurden mit Aluminiumoxid G (Typ E) der Fa. *Merck* beschichtete Platten benutzt (Schichtdicke 0,25 mm). Die Verbindungen wurden in folgenden Fliessmittelgemischen untersucht:

A) BuOH/EtOH/ $\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$ 3:3:3:1, B) BuOH/EtOH/ H_2O 7:2:1, C) $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ (ges. H_2O) 7:3, D) BuOH/AcOH/ H_2O 4:3:3. Zur Analyse wurde 24 Std. über P_4O_{10} bei Z.T. und 0,02 Torr getrocknet.

Verwendet wurden folgende Reagenzien und Lösungsmittel der Fa. *Merck* AG, Darmstadt: CF_3COOH zur Synthese, Methanol zur Analyse, HCOOH (98–100proz.), Aceton reinst, P_4O_{10} .

Der Katalysator für sämtliche Hydrierungen war Pd/C (10%, puriss., *Fluka*, Buchs).

Verwendete Ausgangssubstanzen: Riboflavin (*Fluka*) Lumiflavin [25], 3-Methyl-lumiflavin [26] und Lumichrom (I) [27].

Hydrierung von Lumiflavin (II), 3-Methyl-lumiflavin (III) und Riboflavin (IV). – 2 g II, III bzw. IV wurden in 100 ml CF_3COOH gelöst und während 5 Tagen mit 400 mg Katalysator unter ständigem Rühren bei Z.T. im Dunkeln unter Normaldruck hydriert.

Der Katalysator wurde unter O_2 -freiem Argon abfiltriert und mit 30 ml Lösungsmittel nachgewaschen. Nach dem Eindampfen der farblosen Lösung (40°/13 Torr) konnte das oxydationsempfindliche FlH_3 (X, XI, XII) als kristalline Substanz in quantitativer Ausbeute erhalten werden.

1,5,5a,6,7,8,9,9a-Octahydroflavinhydrochlorid (X. HCl). 2 g II wurden in 100 ml CF_3COOH wie oben hydriert. Nach Entfernen des Katalysators wurde die Lösung in 25 ml mit HCl ges. MeOH eingetroppt. Nach Eindampfen der Lösung am RV. wurde der Rückstand mit 20 ml O_2 -freiem EtOH digeriert und mit 20 ml Aceton und 50 ml Äther versetzt. Der farblose Niederschlag wurde abfiltriert, mit Äther gewaschen und 24 Std. im Vakuum über P_4O_{10} getrocknet: 1,65 g X. HCl (83% d. Th.) vom Smp. 217–219° (Zersetzung).

$\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_2 \cdot \text{HCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Ber. C 46,36	H 7,50	N 16,65%
(336,46)	Gef. „ 46,41	„ 7,98	„ 17,31%

$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von X (unter Argon, in CF_3COOH): 1,1/*m*/6H; 2,14/*m*/6H; 3,4/*s*/3H; 4,1/*m*/2H.

5-Formyl-1,5,5a,6,7,8,9,9a-octahydroflavin (XIV). 0,2 g X. HCl wurden in 2 ml H_2O gelöst und mit 25proz. Ammoniak neutralisiert. Der farblose kristalline Niederschlag wurde abfiltriert, mit Äther nachgewaschen und unter Stickstoff im Vakuum getrocknet. Das so erhaltene X (0,1 g, 58% d. Th.) wurde in 12 ml HCOOH /Essigsäureanhydrid 5:1 45 Min. bei 50° formyliert. Sodann wurde eingedampft und der Rückstand aus 20 ml EtOH umkristallisiert: 0,05 g XIV (29% d. Th.) vom Smp. 309–311°.

$\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_3$	Ber. C 57,52	H 6,90	N 19,17%
(292,33)	Gef. „ 57,46	„ 6,79	„ 19,33%

UV.-Spektrum bei pH = 5: λ_{\max} 294 nm (4,29).

$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$: 0,87/*m*/6H; 1–2/*m*/6H; 3,15/*s*/3H; 3,46/*m*/1H; 4,6/*m*/1H; 8,47/*s*/1H.

1,6,7,8,9,9a-Hexahydroflavin (XVI). 2 g II wurden in üblicher Weise hydriert. Die filtrierte Lösung wurde eingedampft, in 50 ml H_2O gelöst und mit 25proz. Ammoniak neutralisiert. Der Niederschlag wurde abfiltriert, in 100 ml MeOH gegeben und unter O_2 bei Z.T. im Dunkeln gerührt. Nach 2 Tagen wurde das nahezu farblose Produkt abfiltriert, mit Äther nachgewaschen und im Vakuum getrocknet: 0,86 g XVI (43% d. Th.). Das Produkt wurde aus EtOH umkristallisiert. Ab 170° braun.

$\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Ber. C 55,70	H 7,19	N 19,99%
(280,32)	Gef. „ 55,98	„ 7,01	„ 19,91%

UV.-Spektren (Vgl. Fig. 4).

XVI (pH = 1): 236 (4,20); 274 (4,33); 351 (3,85); (pH = 5): 280 (4,45); 313 (4,03); (pH = 13): 231 (4,51); 283 (4,36); 320 (4,05).

6,7,8-Trimethyl-7,8-dihydrovolumazin [28]: 236 (4,08); 273 (4,20); 351 (3,73); (pH = 5): 280 (4,20); 313 (3,86); (pH = 13): 230 (4,36); 283 (4,12); 320 (3,91).

¹H-NMR.-Spektren (in CF₃COOH).

XVI: δ = 1,1/m/6H; 2,37/m/6H; 3,0/m/2H; 3,3/s/3H; 5,1/t/1H.

6,7,8-Trimethyl-7,8-dihydrovolumazin [28]: 1,7/d/3H; 2,7/s/3H; 3,4/s/3H; 4,9/q/1H.

pK_a-Werte.

XVI: 2,82 und 7,5. 6,7,8-Trimethyl-7,8-dihydrovolumazin: 2,8 und 7,24.

6,7,8,9-Tetrahydroflavin (XX), 3-Methyl-6,7,8,9-tetrahydroflavin (XXI) und 6,7,8,9-Tetrahydroriboflavin (XXII). 2 g II, III bzw. IV wurden wie üblich hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators unter Argon und Nachwaschen mit 30 ml Lösungsmittel wurde die Lösung am RV. bei 45° zur Trockene eingedampft. Die erhaltenen, farblosen kristallinen Verbindungen (X, XI bzw. XII) wurden in 200 ml Eisessig gelöst und unter O₂ bei Z.T. geschüttelt. Die Reaktion wurde verfolgt bis ein Spektrum mit einer konstanten Extinktion bei 410 nm von XX, XXI bzw. XXII erhalten wurde. Anschliessend wurde die Essigsäure am RV. entfernt und der braune kristalline Rückstand am Hochvakuum 12 Std. getrocknet.

Die Ausbeute an nach DC. (Systeme A, B, C) nicht einheitlichem Produkt betrug 2 g. XXII wurde aus MeOH umkristallisiert. Das umkristallisierte Produkt (1 g, 45% d. Th.) war nunmehr in den Systemen A, B, C einheitlich. Smp. 264–266°.

C ₁₇ H ₂₄ N ₄ O ₆	Ber. C 53,67	H 6,36	N 14,73%
(380,39)	Gef. „ 53,00	„ 6,26	„ 14,48%

560 mg FlH₆ (XVI bzw. XVII) wurden in 50 ml Eisessig gelöst und 2–3 Tage in einer O₂-Atmosphäre geschüttelt. Nach Erreichen eines konstanten Endspektrums bei 410 nm wurde die Lösung am RV. eingengt und im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute an XX bzw. XXI: 400 mg (71% d. Th.).

2 g Riboflavin (IV) wurden in CF₃COOH zu XII hydriert. Die am Hochvakuum getrocknete Verbindung (65°/0,02 Torr, 12 Std.) wurde in 100 ml abs. MeOH gelöst und 2 Tage unter O₂ geschüttelt. Dabei wurde 300 mg (15% d. Th.) analysenreines, in den Systemen A, B, C einheitliches XXII vom Smp. 263–265° erhalten.

C ₁₇ H ₂₄ N ₄ O ₆ (380,39)	Ber. C 53,67	H 6,36	N 14,73%	Gef. C 53,24	H 6,13	N 14,48%
--	--------------	--------	----------	--------------	--------	----------

Nach Einengen des Filtrats wurden weitere nach DC. nicht einheitliche 1,6 g XXII erhalten.

UV.-Spektren.

XX (pH = 0): 365 (4,13); 319 (Schulter); 246 (4,03); (pH = 6): 407 (4,05); 319 (Schulter); 258 (4,16); (pH = 13): 378 (3,84); 319 (4,15); 247 (4,43).

6,7,8-Trimethylumazin [28]: (pH = 5,8): 403 (4,17); 276 (4,07); 257 (4,19); (pH = 13): 364 (3,78); 313 (4,35); 267 (Schulter); 244 (4,30).

XXII: (pH = 0): 370 (4,00); 312 (3,99); 245 (3,97); (pH = 6): 410 (4,06); 318 (3,76); 275 (Schulter); 256 (4,21); (pH = 13): 379 (3,68); 318 (4,40); 245 (4,25).

6,7-Dimethyl-8-ribityl-lumazin [28]: (pH = 5,8): 413 (4,00); 309 (3,75); 258 (4,14); (pH = 13): 374 (3,74); 317 (4,39); 254 (4,29).

¹H-NMR.-Spektren (in 0,1M NaOD).

XX: 1,8/m/2H; 2,4/m/4H; 3,0/s/3H; 4,96/t/1H.

6,7,8-Trimethylumazin [28]: 2,11/s/3H; 3,13/s/3H; 4,93/Signal erhalten durch Verschiebung der HOD-Bande durch NaCl-Zusatz.

9-Hydroxyimino-3-methyl-6,7,8,9-tetrahydroflavin (XXIV). 2 g XXI wurden in 200 ml Eisessig gelöst, mit 2 g NaNO₂ versetzt und im Dunkeln bei Z.T. 30 Min. stehen gelassen. Anschliessend wurde die Lösung mit Aktivkohle behandelt, dann eingengt (40°/13 Torr) und das Oxim zuerst aus Acetonitril/Äther, dann aus H₂O kristallisiert.

Ausbeute an analysenreinem XXIV 200 mg (10% d. Th.), Smp. 176–178°.

C ₁₄ H ₁₇ N ₅ O ₃ (336,4)	Ber. C 55,44	H 5,65	N 23,08%	Gef. C 55,30	H 5,56	N 22,86%
---	--------------	--------	----------	--------------	--------	----------

UV.-Spektren (pH = 0): 404 (4,15); 262 (3,87); (pH = 6): 440 (4,03); 310 (Schulter); 270 (4,10); 215 (4,14); (pH = 13): 470 (4,21); 360 (Schulter); 255 (4,12).

¹H-NMR-Spektren (in CF₃COOH): 1,25/t/6H; 2,37/m/1H; 3,25/t/2H; 3,7/s/3H; 4,05/m/1H; 4,6/s/3H.

pK_a-Werte: 0,35 und 8,9.

Hydrierungen von Lumichrom (I). - 5-Formyl-1,5,5a,6,7,8,9,9a-octahydroalumichrom (XIII). 1 g I wurde in üblicher Weise hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert und das Filtrat in 30 ml methanolische HCl-Lösung eingetropfet. Die Lösung wurde zur Trockene eingedampft, der Rückstand in 10 ml H₂O gelöst und mit 25proz. Ammoniak neutralisiert. Das ausgefallene Produkt (IX) wurde abfiltriert, mit Äther gewaschen, sofort in einem Gemisch von 125 ml Ameisensäure und 25 ml Essigsäureanhydrid gelöst und 5 Std. bei Z.T. geführt. Nach dem Einengen wurde der Rückstand mit 20 ml MeOH digeriert, abfiltriert und bei 100° getrocknet: 350 mg XIII (36% d.Th.). 300 mg hiervon wurden aus 15 ml Dimethylformamid und 10 ml MeOH umkristallisiert. Der Niederschlag (223 mg) wurde mit MeOH und Äther gewaschen und bei 150° über P₄O₁₀ im Vakuum getrocknet.

C₁₃H₁₈N₄O₃ (278,31) Ber. C 56,10 H 6,52 N 20,13% Gef. C 56,13 H 6,56 N 20,02%

UV.-Spektrum bei pH = 5: λ_{max} = 285 nm (log ε = 4,26).

¹H-NMR.-Spektrum in (CD₃)₂SO:

δ = 0,87 ppm/m/6 H; 1-2/m/6H; 4,5/m/2H; 8,62/s/1H.

6,7,8,9-Tetrahydroalumichrom (XIX). 1 g I wurde in 100 ml CF₃COOH wie üblich hydriert. Die erhaltenen oxydationsempfindlichen 923 mg IX wurden sofort in abs. MeOH gelöst und unter O₂ geschüttelt, dabei konnte kein Dihydroprodukt XV isoliert werden. Die daraufhin in 100 ml Eisessig durchgeführte Oxydation erwies sich als viel langsamer als bei den Flavinen (II, III, IV).

Die Lösung musste 8 Std. auf 80° erhitzt werden, bis eine konstante Extinktion bei 335 nm erreicht wurde. Nach Reinigung der Lösung mit Aktivkohle und Eindampfen am RV. wurde die gelbe kristalline Substanz getrocknet: 430 mg XIX (43% d.Th.). Zur Analyse wurde aus MeOH/H₂O umkristallisiert: Smp. 221-224°.

C₁₂H₁₄N₄O₂ (246,26) Ber. C 58,52 H 5,73 N 22,75% Gef. C 57,96 H 5,78 N 22,59%

UV.-Spektren.

XIX (pH = 0): 349 (3,85); 240 (Schulter); (pH = 6): 335 (3,90); (pH = 13): 375 (3,86); 264 (4,24).

¹H-NMR.-Spektren (in CF₃COOH).

1,1/d/6H; 2,42/m/2H; 3,23/t/4H.

8-Methyl-6,7-cyclohexanolumazin 7,8-Di-Nor-XXI 1 g 5-Amino-4-methylamino-2,6-dioxo-tetrahydropyrimidin-hydrochlorid [29] wurde in 10 ml Wasser suspendiert, mit Ammoniak (25%) auf pH 4-5 gebracht und das freie Amin (etwas gelblich gefärbt) abfiltriert. Dieses wurde in ein Gemisch von 30 ml Dimethylformamid und 30 ml Äthanol gegeben und mit 2 g frisch dest. Cyclohexandion versetzt. Nach 2 Std. Kochen unter Rückfluss wurde heiss von wenig Ungelöstem abfiltriert und das Filtrat zur Trockne eingengt. Der gelbe Rückstand wurde mit 50 ml Aceton digeriert, abfiltriert und mit Äther gewaschen. Ausbeute: 0,65 g. 0,55 g wurden aus 50 ml Methanol unter Zusatz von Aktivkohle umkristallisiert: Nach dem Trocknen bei 100° 0,13 g gelbes Produkt vom Smp. 255-261°.

Aus dem Filtrat liessen sich durch Zugabe von 50 ml Äther weitere 100 mg identisches Produkt erhalten.

C₁₁H₁₂N₄O₂ (232,24) Ber. C 56,89 H 5,21 N 24,13% Gef. C 56,88 H 5,11 N 24,31%

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] L. Tauscher, S. Ghisla & P. Hemmerich, *Helv.* 56, 630 (1973).
 [2] C. Heizmann, P. Hemmerich, R. Mengel & W. Pfeleiderer in 'Chemistry and Biology of Pteridines'. Hrsg. K. Iwai, M. Goto, M. Akino and Y. Iwanami, Int. Acad. Printing, Tokyo, Japan 1970, S. 105.

- [3] *W. Pfleiderer, R. Mengel & P. Hemmerich*, Chem. Ber. *104*, 2273 (1971).
 [4] *P. Karrer & R. Ostwald*, Rec. Trav. chim. Pays-Bas *57*, 500 (1938).
 [5] *F. Müller, V. Massey, C. Heizmann, P. Hemmerich, J. M. Lhoste & D. C. Gould*, Europ. J. Biochemistry *9*, 392 (1969).
 [6] *W. H. Walker, P. Hemmerich & V. Massey*, Helv. *50*, 2269 (1957).
 [7] *W. H. Walker, P. Hemmerich & V. Massey*, Europ. J. Biochemistry *13*, 258 (1970).
 [8] *K. H. Dudley, A. Ehrenberg, P. Hemmerich & F. Müller*, Helv. *47*, 1354 (1964).
 [9] *P. Hemmerich & M. Schuman-Jorns*, in 'Enzymes: Structure and Function', Hrsg. J. Drenth, R. A. Oosterbaan und C. Veeger, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, The Netherlands, (1972), S. 95.
 [10] *G. Schöllnhammer & P. Hemmerich*, Z. Naturforsch. *27b*, 1030 (1972).
 [11] *F. Müller, U. Hartmann & P. Hemmerich*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. *354*, 215 (1973); *F. Müller, U. Hartmann & P. Hemmerich*, in Vorbereitung.
 [12] *K. H. Dudley & P. Hemmerich*, Helv. *50*, 355 (1967).
 [13] *S. Ghisla, U. Hartmann, P. Hemmerich & F. Müller*, Liebigs Ann. Chem., in Druck.
 [14] *M. C. Archer & K. G. Scrimgeour*, Can. J. Biochemistry *48*, 278 (1970).
 [15] *S. Kaufmann*, J. Biol. Chemistry *242*, 3934 (1967), *239*, 332 (1964), *236*, 804 (1961); Ann. Rev. Biochemistry *36*, 171 (1967).
 [16] *M. Viscontini & H. Leidner*, Helv. *53*, 789 (1970).
 [17] *W. Pfleiderer & R. Mengel*, Chem. Ber. *104*, 2313 (1971).
 [18] *P. Hemmerich, F. Müller, W. Pfleiderer & A. Ehrenberg*, Europ. J. Biochemistry *16*, 584 (1970).
 [19] *R. Mengel & W. Pfleiderer*, pers. Mitteilung.
 [20] *R. Mengel, P. Hemmerich & W. Pfleiderer*, in Vorbereitung.
 [21] *P. Hemmerich, B. Prijs & H. Erlenmeyer*, Helv. *42*, 2164 (1959).
 [22] *F. J. Bullock & O. Jaydetsky*, J. Org. Chemistry *30*, 2056 (1965).
 [23] *M. Brüstlein, W.-R. Knappe & P. Hemmerich*, Angew. Chem. *83*, 854 (1971), Int. Ed. *10*, 804 (1971).
 [24] *W. Haas & P. Hemmerich*, Z. Naturforsch. *27b*, 1035 (1972).
 [25] *P. Hemmerich, S. Fallab & H. Erlenmeyer*, Helv. *39*, 1242 (1956).
 [26] *P. Hemmerich, B. Prijs & H. Erlenmeyer*, Helv. *43*, 372 (1960).
 [27] *K. G. Stern & E. R. Holiday*, Ber. deutsch. chem. Ges. *67*, 1442 (1934).
 [28] *W. Pfleiderer & R. Mengel*, Chem. Ber. *104*, 2293 (1971).
 [29] *W. Pfleiderer & G. Nübel*, Chem. Ber. *93*, 1406 (1960).

198. Steroide und Sexualhormone

248. Mitteilung [1]

Die Partialsynthese von 5 α -Dihydrohirundigenin und von 5 α -Dihydroanhydrohirundigenin

von **René Imhof, Franz Marti, Beat P. Schaffner** und **Hansuli Wehrli**

Organisch-chemisches Laboratorium der Eidg. Technischen Hochschule, 8006 Zürich

(20. VI. 73)

Summary. A partial synthesis of dihydroanhydrohirundigenin (**4**), a hydrogenation product of naturally occurring anhydrohirundigenin (**2**) is described. Furthermore **4** is transformed into the formal dihydroderivative **14** of hirundigenin (**1**).

Aus den Rhizomen der in Norditalien beheimateten Schwalbenwurz (*Vincetoxicum hirundinaria*) isolierten Reichstein *et al.* [2], nach vorangegangener Glycosidspaltung, neben einer Reihe von Zuckern u.a. die beiden Aglycone Hirundigenin (**1**) und Anhy-