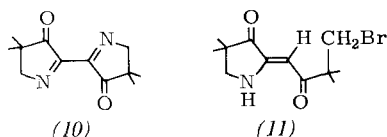


von (8) und (9), aber nicht die von (7) im Kristall durch zwischenmolekulare Wasserstoffbrücken verbunden sind. Die leichte Sublimierbarkeit [ab 100°C im Hochvakuum gegenüber 220°C bei (9) und (8)] und die gute Löslichkeit von (7) in polaren Lösungsmitteln haben die gleiche Ursache.

4. Bemerkenswert ist die große Oxidationsneigung der Verbindung (7): Aus einer Lösung in Benzol, die 12 Std. dem Luftsauerstoff ausgesetzt war, konnte die Dehydro-Verbindung (10) isoliert werden.



Eine zutreffende Elementaranalyse und die spektroskopischen Daten beweisen die Konstitution von (10) (Fp = 118–119°C): NMR (CDCl₃): τ = 8.78 (12H/s, 4 CH₃), 5.63 (4H/s, 2N—CH₂). IR (KBr): 1742 [ν (C=O)], in C₂Cl₄ 1750 cm⁻¹. UV/S (Cyclohexan): λ_{\max} = 387 nm (lg ϵ = 2.37), 252.5 (2.91), 215 (3.79).

Als weiteres Indigo-Charakteristikum zeigen $\tilde{\nu}$ (C=O) und Lichtabsorption von (7) (1665 cm⁻¹, 487 nm) und (10) (1750 cm⁻¹, 387 nm) ganz analoge Abstufungen wie das Redoxpaar Indigo (9) (1626 cm⁻¹, 605 nm) – Dehydroindigo (1736 cm⁻¹, 443 nm).

Reduktionen von (7) führten zu farblosen Produkten, die sich als nicht einheitlich erwiesen.

5. Die Ladungsdichte am Stickstoff-Atom von (7) ist nach den PPP-Rechnungen größer als bei den Verbindungen (8) und (9). Die daraus resultierende stärkere Basizität läßt sich beobachten: In Ameisensäure liegt (7) am Stickstoff vollständig monoprotoniert vor [λ_{\max} = 366 nm (lg ϵ = 4.07)], in Propionsäure sind die freie und die monoprotonierte Form von (7) nebeneinander festzustellen [λ_{\max} = 460 nm (lg ϵ = 2.89) und 369 nm (lg ϵ = 3.94)]. Selbst in einem wäßrigen Weinsäure-Puffer vom pH = 5.4 ist nur ein verschwindender Anteil der Neutralform vorhanden [λ_{\max} = 368 nm (lg ϵ = 4.03) und \approx 470 nm (lg $\epsilon \approx$ 2.3)]. Die N-Protonierung ergibt sich durch einen Vergleich der längstwelligsten Lichtabsorption von (7) in saurer Lösung mit der von Fitjer^[12] dargestellten

Verbindung (11), deren Chromophor-Gerüst sich dadurch auszeichnet, daß eine Amino-Gruppe in der Gruppierung (1) fehlt [λ_{\max} = 365 nm (4.09) in Äthanol]. – Im Unterschied zu (7) zeigt (2) eine bathochrome Verschiebung des längstwelligsten Absorptionsmaximums bei Zusatz von Säuren; allerdings ist dieser Effekt nur mit sehr starken Säuren zu erhalten.

Eingegangen am 26. Juli 1971 [Z 481]

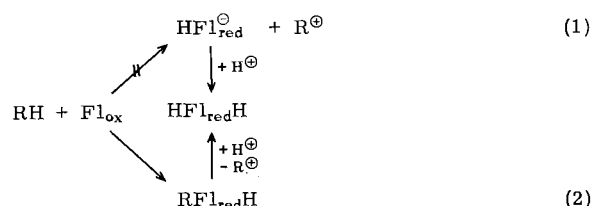
Neue Photo-Alkylierungsreaktionen am Flavin-Kern

Von Martin Brüstlein, W.-R. Knappe
und Peter Hemmerich^[*]

Die flavin-(vitamin-B₂)-abhängige „Wasserstoff-Übertragung“ gehört bis heute zu denjenigen biologischen Reaktionen, für die noch keine Ansätze zu einer strukturellen Erklärung gefunden wurden. Wallenfels und Gellrich^[1] sowie Suelter und Metzler^[2] fanden erste Anhaltspunkte dafür, daß die flavin-abhängige Aktivierung von C—H-Bindungen im Falle der Dihydro-nicotinamide trotz der bekannten Stabilität des Flavosemichinons keine Radikal-Reaktion ist. In Übereinstimmung damit lassen sich bei C—H-aktivierenden Flavoproteinen Radikale nur künstlich, z. B. mit Dithionit, und nicht durch Reduktion mit natürlichen Substraten erzeugen^[3].

Aufgrund dieser Befunde wurde die Reaktion als direkter „Hydrid-Transfer“ gemäß Gl. (1) verstanden.

Wir möchten demgegenüber vorschlagen, diese Reaktion als „Gruppen-Transfer“ gemäß Gl. (2), gefolgt von einer protolytischen Eliminierung des Restes R[⊕], zu betrachten, welche je nach Art des Restes R[⊕] mehr oder weniger leicht verläuft.



Die folgenden Reaktionen legen es nahe, zwischen diesen beiden Möglichkeiten zugunsten der zweiten zu entscheiden:

Die flavin-abhängige Photo-Dehydrierung der in Abbildung 1 angegebenen Cycloolefine verläuft in Acetonitril bei hohem Substratüberschuß mit Halbwertszeiten in der Größenordnung einiger Sekunden (experimentelle Bedingungen siehe Tabelle 1). Reaktionsablauf und Art des Produktes richten sich nach den Eigenschaften der Abgangsgruppe R[⊕].

Im Falle des Cyclopentadiens (1a) erhält man in quantitativer Ausbeute 4a-(1-Cyclopentadienyl)-4a,5-dihydro-lumi-flavin (4a-RF_{red}H). Die Abgangsgruppe R[⊕] = C₅H₅[⊕] ist antiaromatisch, weswegen der Zerfall des Moleküls energetisch ungünstig ist. Eine Zerlegung dieses kovalenten „Flavin-Substrat-Komplexes“ ist nur bei längerer Einwirkung starker Oxidationsmittel (NO[⊕]) möglich.

[*] Dr. M. Brüstlein, Dipl.-Chem. W.-R. Knappe und Prof. Dr. P. Hemmerich
Fachbereich Biologie der Universität
775 Konstanz, Postfach 733

[1] Theoretische und spektroskopische Untersuchungen an Indigo-farbstoffen. 9. Mitteilung. – 8. Mitteilung: H. Hermann u. W. Lüttke, Chem. Ber. 101, 1715 (1968).

[2] M. Klessinger u. W. Lüttke, Tetrahedron 19, Suppl. 2, 315 (1963).

[3] W. Lüttke u. M. Klessinger, Chem. Ber. 97, 2342 (1964).

[4] M. Klessinger, Tetrahedron 22, 3355 (1966).

[5] M. Klessinger u. W. Lüttke, Chem. Ber. 99, 2136 (1966).

[6] W. Lüttke, H. Hermann u. M. Klessinger, Angew. Chem. 78, 638 (1966); Angew. Chem. internat. Edit. 5, 598 (1966).

[7] H. Hermann u. W. Lüttke, Chem. Ber. 101, 1708, 1715 (1968).

[8] E. Testa u. L. Fontanella, Liebigs Ann. Chem. 625, 95 (1959).

[9] H. Bauer, Liebigs Ann. Chem. 736, 1 (1970).

[10] G. Kunz, Dissertation, Universität Göttingen 1971.

[11] H. Meier, Dissertation, Universität Göttingen 1971.

[12] L. Fitjer, Dissertation, Universität Göttingen 1970.

[13] D. N. Schigorin, N. S. Dokunichin u. E. A. Gribowa, Zh. Fiz. Khim. 29, 867 (1955).

[14] Wir danken Herrn Dipl.-Chem. G. Kunz für die Lichtabsorptionswerte der Verbindungen (7) bis (9) im Dampfzustand und der Verbindungen (8) und (9) in Tetrachloräthan-Lösung, Herrn Dr. H. Bauer, Heidelberg, für die Überlassung der Verbindung (8).

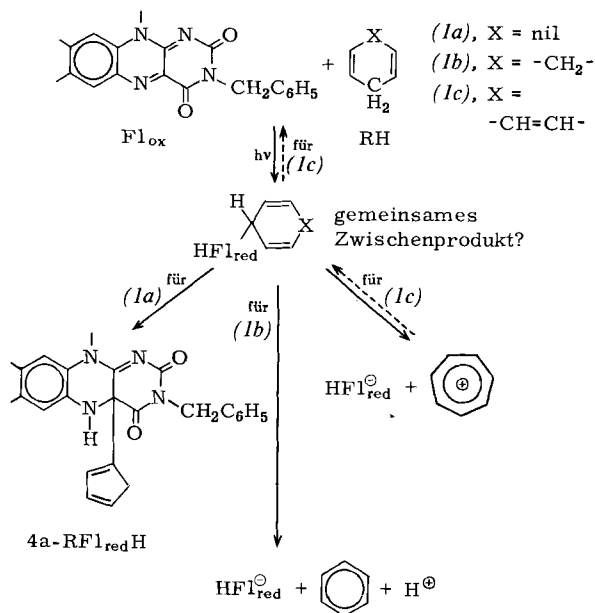


Abb. 1. Photo-Dehydrierung von Cyclopentadien (1a), 1,4-Cyclohexadien (1b) und Cycloheptatrien (1c) mit 3-Benzyl-lumiflavin in Acetonitril unter Sauerstoff-Ausschluß ($\lambda = 445$ nm, Halbwertsbreite 16 nm).

Völlig anders verläuft die Reaktion des Flavins mit 1,4-Cyclohexadien (1b): Hier kann kein stabiles Zwischenprodukt $\text{RF1}_{\text{red}}\text{H}$ gefaßt werden, da es spontan und irreversibel zu Benzol und freiem Dihydro-flavin zerfällt. Wiederum charakteristisch verschieden verhält sich Cycloheptatrien (1c): Hier kann ebenfalls kein intermediäres $\text{RF1}_{\text{red}}\text{H}$ gefaßt werden; die Reaktion ist jedoch reversibel, da die Abgangsgruppe R^{\oplus} (=Tropylum-Ion) resonanzstabilisiert ist und sekundäre Zerfallsreaktionen nur langsam eingeht. Infolgedessen geht bei dieser Photoreaktion die anfangs 12-proz. Reduktion des Flavins im Dunkeln anschließend bis auf 3% zurück (Abb. 2). Diese Rückreaktion kann als Rekombination von Dihydro-flavin-Anion $\text{HFl}_{\text{red}}^{-}$ und Tropylum-Ion, gefolgt von der Freisetzung des Startsubstrates Cycloheptatrien, verstanden werden. Das Vorkommen der Rückreaktion wird dadurch bestätigt, daß 1,5-Dihydro-lumiflavin $\text{HFl}_{\text{red}}\text{H}$ [photochemisch erzeugt

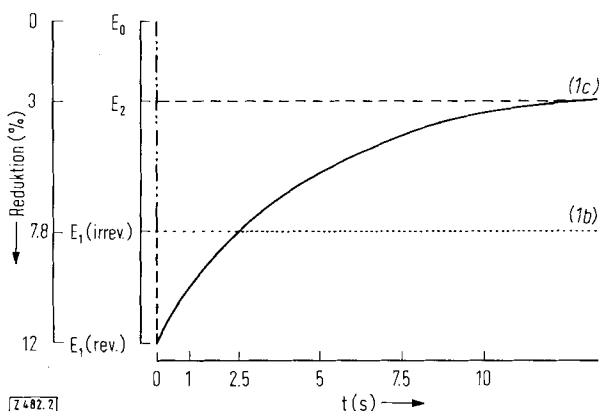


Abb. 2. Photoreaktion zwischen 1,4-Cyclohexadien (1b) (konstant 7.8%) oder Cycloheptatrien (1c) und 3-Benzyl-lumiflavin unter anaeroben Bedingungen mit anschließender rückläufiger Dunkelreaktion bei (1c) (12%→3%). Experimentelle Bedingungen siehe Tabelle 1. Als Maß für die Reduktion des 3-Benzyl-lumiflavins dient die Extinktionsabnahme bei 450 nm. Das benutzte UV-Spektrometer [Cary 14R] gibt erst 2.5 s nach Auslösung eines Photoblitzes (bei $t=0$) die tatsächliche Extinktion des Flavins bei 445 nm an.

wie in Abb. 1 für (1b) angegeben] durch Zugabe von Tropylumbromid anaerob zu Flavochinon Fl_{ox} oxidiert wird. Die Frage, ob die Rückreaktion analog der elektrochemischen Reduktion des Tropylum-Ions^[4] zumindest teilweise zu Bi-cycloheptatrienyl führt, wurde nicht untersucht.

Die Reste R in $\text{RF1}_{\text{red}}\text{H}$ können wie das oben beschriebene $\text{C}_5\text{H}_5\text{-Fl}_{\text{red}}\text{H}$ und das früher von uns dargestellte $\text{C}_4\text{H}_7\text{-Fl}_{\text{red}}\text{H}$ (2)^[5] an C-4a oder an N-5 des Flavin-Kerns fixiert sein. Bei R=Benzyl treten sogar Gemische beider Isomeren auf^[6], wobei sich 5- $\text{RF1}_{\text{red}}\text{H}$ thermisch in 4a- $\text{RF1}_{\text{red}}\text{H}$ umlagert^[6].

Diese Umlagerung kann in Gegenwart von oxidiertem Flavin als Sensibilisator durch Licht rückgängig gemacht werden^[7]. Es ist jedoch sehr schwer zu entscheiden, ob die Wanderung solcher Reste R am Flavin-Kern in der Dihydro- oder in der Radikal-Stufe vor sich geht^[8]. Jedoch kann eine allgemeine Tendenz zur homolytischen Spaltung der Addukte $\text{RF1}_{\text{red}}\text{H}$ in R^{\cdot} und FlH ausgeschlossen werden.

Tabelle 1. Anaerobe Photoreaktion von Flavin mit organischen Sulfiden (Acetonitril, 0.73×10^{-4} mol/l 3-Benzyl-lumiflavin, 0.067 mol/l Sulfid, unter Argon, 250 W/24 V Wolfram-Halogen-Lampe mit von 300–800 nm durchlässigem Filter- und Linsen-System).

Substrat	$t_{1/2}$ (s)	Reversibilität [%] [a]			Hauptprodukt (λ_{max})
		[b]	[c]	[d]	
Dimethyl-sulfid	150	5	10	76	Addukt (340 nm)
Diäthyl-sulfid	180	70	81	100	1,5-Dihydro-flavin
Methyl-tert.-butyl-sulfid	60	21	28	75	Addukt (340 nm)
Äthyl-tert.-butyl-sulfid	110	35	75	100	1,5-Dihydro-flavin
Methyl-phenyl-sulfid	55	41	67	83	Addukt (343 nm)
Äthyl-phenyl-sulfid	120	60	100	—	1,5-Dihydro-flavin
Thiolan	50	15	26	88	Addukt (335 nm)
Thian	110	42	70	93	1,5-Dihydro-flavin

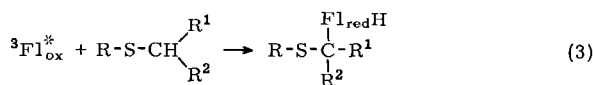
[a] Angegeben als Reoxidation [%] beim Behandeln mit den in [b]–[d] aufgeführten Oxidationsmitteln.

[b] 1 min Luft im Dunkeln.

[c] 10 min Luft im Dunkeln.

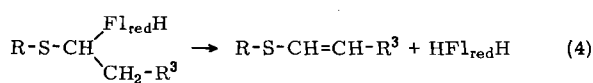
[d] 1 min Aufkochen mit 50-proz. wäßriger Essigsäure und Natriumnitrit.

Aus Tabelle 1 geht hervor, daß organische Sulfide von Triplett-Flavin ($^3\text{Fl}_{\text{ox}}^*$) in α -Position unter Bildung eines Adduktes gemäß Gl. (3) dehydriert werden:

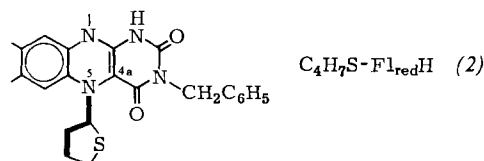


Die Stabilität dieses Adduktes hängt von der Natur und der räumlichen Anordnung der Abgangsgruppe $\text{R}^1\text{R}^2\text{CH}^{\oplus}$ ab:

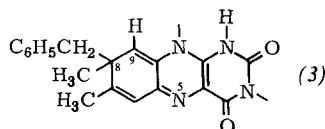
Wenn $\text{R}^1=\text{R}^2=\text{H}$ ist, so zerfällt das Addukt in Abwesenheit von Sauerstoff nicht und in Anwesenheit von Sauerstoff nur langsam. Ist jedoch $\text{R}^1=\text{Alkyl}$ und $\text{R}^2=\text{H}$ oder Alkyl, so wird ein eliminierender Zerfall nach Gl. (4) unter anaerober Freisetzung von unsubstituiertem, sehr schnell mit Sauerstoff reagierendem Dihydro-flavin möglich und bevorzugt.



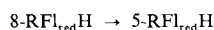
Diese Eliminierung ist strengen sterischen Anforderungen unterworfen: Die zu eliminierenden Gruppen müssen gestaffelt, nicht ekliptisch oder auch nur windschief angeordnet sein^[9]. Daher reagieren die Äthylsulfide und Thian (Tabelle 1) „reversibel“, während Thiolan ein stabiles Addukt (2) bildet, weil hier eine *trans*-Eliminierung nicht möglich ist.



Weiter vermuten wir, daß die in Rede stehende „flavin-abhängige C—H-Aktivierung“ nicht – oder jedenfalls nicht immer – direkt zu einem über N-5 oder C-4a gebundenen Addukt führt. Für den Fall der flavin-abhängigen Photo-Decarboxylierung der Phenyllessigsäure können wir dies beweisen: Wie schon früher erwähnt^[10], entsteht hier in neutraler bis alkalischer Lösung ein Primärprodukt, für dessen Struktur wir aufgrund folgender Befunde Formel (3) vorschlagen:



1. Die Methyl-Gruppe an C-8 des Flavins erscheint im ¹H-NMR-Spektrum im Bereich aliphatischer Methyl-Gruppen ($\delta = 1.05$ ppm). Diese Zuordnung ist belegt durch Vergleich mit dem analogen 8-CD₃-Derivat^[11].
2. Bei der Reaktion in Deuteriumoxid wird ein selektiver (partieller) Austausch des Wasserstoffs an C-9 beobachtet, wie er für ein 7-Alkyliden-7,8-dihydro-pteridin^[12] zu fordern ist.
3. Struktur (3) erklärt die bereits publizierten Absorptions-Spektren [$\lambda_{\text{max}}(\text{CHCl}_3) = 322, 333$ und ≈ 460 nm, langwellige Endabsorption bis 600 nm] sowie die säure- und wärmekatalysierte Umlagerung^[13]



als Cyclohexadienon-Phenol-Umlagerung^[14]; ferner könnten sie die bei Flavoproteinen beobachteten roten, diamagnetischen Flavin-Substrat-Komplexe^[15] erklären.

4. Struktur (3) erklärt das „Aktions-pK“ der Größenordnung 5, welches für die Flavin-Photoreduktion charakteristisch ist und bisher nicht zugeordnet werden konnte^[16], als Deprotonierung an N-1.

Wir hoffen, mit diesen Befunden einen Schritt weiter gekommen zu sein in Richtung auf eine chemische Erklärung der flavin-abhängigen biologischen Substratdehydrierung^[1].

Eingegangen am 28. Juli 1971 [Z 482]

[*] Für Diskussionen, Anregungen und Überlassung einzelner Daten sind wir zu Dank verpflichtet den Herren Dr. G. Blankenhorn und Dipl.-Chem. W. Haas, Konstanz, Dr. V. Massey (University of Michigan) und Drs. G. Radda und J. A. T. Taylor, University of Oxford.

- [1] K. Wallenfels u. M. Gellrich, Liebigs Ann. Chem. 621, 149 (1959).
- [2] C. H. Suelter u. D. E. Metzler, Biochim. Biophys. Acta 44, 23 (1960).
- [3] P. Hemmerich, G. Nagelschneider u. C. Veeger, FEBS-Lett. 8, 69 (1970).
- [4] J. Mizoguchi, Y. Uetani, T. Sato, T. Matsubayashi u. T. Kashiwaya, Denki Kagaku 34, 124 (1966); Chem. Abstr. 65, 11762h (1966).
- [5] W.-R. Knappe u. P. Hemmerich, FEBS-Lett. 13, 293 (1971).
- [6] W. H. Walker, P. Hemmerich u. V. Massey, Helv. Chim. Acta 50, 2269 (1967).
- [7] G. Blankenhorn, Dissertation, Universität Konstanz 1971.
- [8] C. R. Jefcoate, S. Ghisla u. P. Hemmerich, J. Chem. Soc. C 1971, 1689.
- [9] E. L. Eliel: Stereochemie der Kohlenstoffverbindungen. Verlag Chemie, Weinheim 1966, S. 167.
- [10] W. H. Walker, P. Hemmerich u. V. Massey, Europ. J. Biochem. 13, 258 (1970).
- [11] F. J. Bullock u. O. Jardetzky, J. Org. Chem. 30, 2056 (1965).
- [12] W. Pfeleiderer, R. Mengel u. P. Hemmerich, Chem. Ber. 104, 2273 (1971).
- [13] P. Hemmerich in R. S. Harris, P. L. Munson u. E. Diczfalussy: Vitamins and Hormones. Academic Press, New York 1970, Bd. 28, S. 467.
- [14] S. J. Rhoads in P. de Mayo: Molecular Rearrangements. Interscience, New York 1963, Teil 1, S. 655; B. Miller in B. S. Thyagarajan: Mechanisms of Molecular Migrations. Interscience, New York 1968, Bd. 1, S. 247.
- [15] V. Massey u. C. Veeger, Biochim. Biophys. Acta 48, 33 (1961); V. Massey u. Q. H. Gibson, Fed. Proc. 23, 18 (1964); V. Massey u. B. Curti, J. Biol. Chem. 242, 1259 (1967); V. Massey, R. G. Matthews, G. P. Foust, L. G. Howell, C. H. Williams jr., G. Zanetti u. S. Ronchi in H. Sund: Pyridine Nucleotide-Dependent Dehydrogenases. Springer, Berlin 1970, S. 393.
- [16] P. Hemmerich in H. Kamin: Flavins and Flavoproteins. University Park Press, Baltimore 1971, S. 52.

VERSAMMLUNGSBERICHTE

Biologische Vorstufen und Genese von antikem Purpur

Von Herbert Fouquet und Hans-Joachim Bielig (Vortr.)^[*]

Als Bestandteil des von marinen Purpurschnecken (Murex-, Purpura- u. a. Arten) herrührenden antiken Purpurs (roter = purpura blatta, blauer = purpura hyacinthina und violettrotter = purpura dibapha) sind seit langem Indigo^[1] und

6,6'-Dibrom-indigo^[2] bekannt. Lebende Purpurschnecken enthalten jedoch keine indigoiden Farbstoffe. Zu deren Bildung bedarf es, wie bisher angenommen, der Einwirkung von Luftsauerstoff und Licht auf die autolytierte Purpurdrüse (Hypobranchialdrüse), wobei noch ein Enzym (Purpurase) im Spiel ist^[3,4]. Letelliers Isolierungsversuche^[5] von Chromogenen ergaben bei *Purpura lapillus* Lam. (Atlantik) zwei photolabile, unterschiedlich rasch Farbstoff liefernde Komponenten (wasserlösliches Leuko- und ätherlösliches Chlorolapillin) außer photostabilem, alkalilöslichem Xantholapillin. Die dem Leukolapillin analoge Komponente aus Purpurdrüsen von *Murex brandaris* bzw.

[*] Dr. H. Fouquet und Prof. Dr. H.-J. Bielig
Institut für Biochemie der Universität
66 Saarbrücken 11