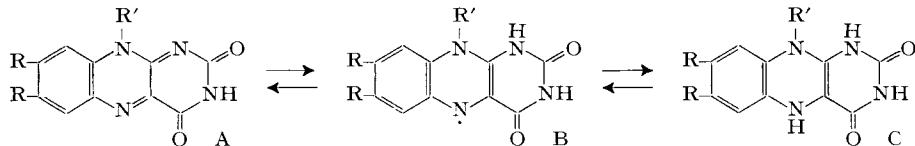


48. Studien in der Lumiflavin-Reihe VI¹⁾
Alkylierungs- und Desalkylierungs-Reaktionen an (Iso)alloxazinen²⁾;
1, 3, 10-Trimethylflavosemichinone

von P. HEMMERICH, B. PRIJS und H. ERLENMEYER

(5. XII. 59)

In Fortsetzung unserer Studien zur Charakterisierung von Flavin-Metallchelaten³⁾ als Flavoenzym-Modellen befassen wir uns damit, auch die autoxydablen Reduktionsstufen B und C des Flavin-Systems A der koordinationschemischen Untersuchung zugänglich zu machen. Die Flavosemichinone B⁴⁾, die erstmals von KUHN & STRÖBELE⁵⁾ untersucht wurden, sind nach neueren Arbeiten⁶⁾⁷⁾⁸⁾ massgebend für die elektronenübertragende Aktivität der Flavin-Metall-Enzyme in der Atmungskette. *In vivo* wird die stark autoxydable Form B durch das Milieu stabilisiert⁶⁾, wobei die



Chelatisierung und die Ausbildung von «Ladungs-Transfer»-Komplexen⁹⁾ mit π -Elektronendonatoren wie Tryptophan¹⁰⁾ und vermutlich auch Adenosin (im Flavin-Adenin-Dinucleotid) eine Rolle spielen muss¹¹⁾.

Durch die Einführung einer Methylgruppe in 1-Stellung hofften wir, das danach mit den beständigeren Alkylphenazyl-Radikalen¹²⁾ vergleichbare Flavosemichinon B *in vitro* gegen Sauerstoff stabilisieren zu können. In diesem Zusammenhang haben wir uns mit dem Studium der Alkylierungsreaktionen in der (Iso)alloxa-

¹⁾ V. Mitteilung: P. HEMMERICH, B. PRIJS & H. ERLENMEYER, Helv. 42, 2164 (1959).

²⁾ Zur Nomenklatur vgl. ¹⁾, Fussnote 2. «(Iso)alloxazine» bedeutet: Alloxazine und/oder Isoalloxazine.

³⁾ P. HEMMERICH & S. FALLAB, Helv. 41, 498 (1958).

⁴⁾ Wir schreiben B in der Azenium-Radikalform, welche nach B. & A. PULLMAN, Proc. nat. Acad. Sci. USA 45, 136 (1959), im LCAO-MO-Modell die wahrscheinlichste Struktur ist.

⁵⁾ R. KUHN & R. STRÖBELE, Ber. deutsch. chem. Ges. 70, 753 (1937).

⁶⁾ H. BEINERT, J. biol. Chemistry 225, 465 (1957); Biochim. biophys. Acta 20, 588 (1956); H. BEINERT & E. PAGE, J. biol. Chemistry 225, 479 (1957); H. WATARI & T. SHIGA, Kagaku (Tokio) 29, 209 (1959); Chem. Abstr. 53, 18994 (1959).

⁷⁾ H. BEINERT, J. Amer. chem. Soc. 78, 5323 (1956).

⁸⁾ J. R. MERKEL & W. J. NICKERSON, Biochim. biophys. Acta 14, 303 (1954); A. J. SWALLOW, Nature 176, 793 (1955).

⁹⁾ Vgl. H. A. STAAB, Einführung in die theor. org. Chemie, Weinheim 1959, S. 705.

¹⁰⁾ I. ISENBERG & A. SZENT-GYÖRGY, Proc. nat. Acad. Sci. USA 45, 519 (1959).

¹¹⁾ G. WEBER, Biochem. J. 47, 114 (1950); über eigene Studien in diesem Zusammenhang berichten wir demnächst.

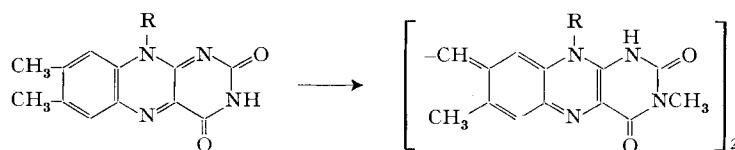
¹²⁾ Vgl. R. KUHN & K. SCHÖN, Ber. deutsch. chem. Ges. 68, 1537 (1935); K. H. HAUSSER & J. N. MURRELL, J. chem. Physics 27, 500 (1957).

zin-Reihe näher befasst. Die dabei aufgefundenen erheblichen Verhaltensunterschiede zwischen den (Iso)alloxazinen und ihren Leukoderivaten (vgl. C) erscheinen eingehender Diskussion wert.

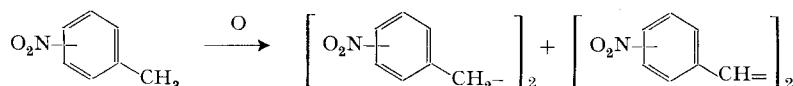
Alkylierung von (Iso)alloxazinen

Basenkatalysierte Alkylierungen lassen sich infolge Hydrolysen-Empfindlichkeit der Alkyl-derivate in dieser Reihe nur unter grossen Verlusten ausführen, wie eingehende Studien von BREDERECK & PFLEIDERER¹³⁾ am Alloxazin (Ia) und die von KUHN & RUDY¹⁴⁾ angegebene Methylierung des Lumiflavins (IIb) zeigen. Das Arbeiten bei tiefer Temperatur wird durch die mässige Wasserlöslichkeit der (Iso)alloxazin-Salze stark erschwert. Auch Alkylierungen mit Diazoalkanen¹⁵⁾ verlaufen aus Gründen der Löslichkeit nur langsam und oft unvollständig und eignen sich schlecht zur Darstellung grösserer Substanzmengen. Auch erschwert, wie wir fanden, das mitgebildete Polyalkylen die Aufarbeitung erheblich.

Wir haben daher das «alkylierungsaktive» Dimethylformamid¹⁶⁾ mit K_2CO_3 als basischem Katalysator herangezogen und fanden, dass Alloxazine (I) (s. Reaktionsschema I, S. 384) sich in diesem Milieu bei 120–150° mit überschüssigem Dialkylsulfat schnell und in hoher Ausbeute zu 1,3-Dialkylalloxazinen (z. B. III) umsetzen lassen. Methyliert man Ia bei tieferer Temperatur, so entsteht vorwiegend ein Gemisch von Monomethylalloxazinen, identisch mit dem Gemisch, welches bei der Kondensation von Methylalloxan und o-Phenyldiamin erhalten wird¹⁷⁾. In der Isoalloxazin-Reihe (vgl. IIa) erhält man analog bei 120–150° die 3-Alkyl-derivate IVa. 8-Methylflavine, so vor allem Riboflavin (A, R = CH₃, R' = Ribityl) und Lumiflavin (IIb), verhalten sich unter diesen Bedingungen anomal: Es tritt eine irreversible Dimerisierung ein, über die wir in der vorhergehenden Mitteilung¹⁾ berichtet haben:



Diese Reaktionsweise der 8-Methylisoalloxazine entspricht dem Verhalten o-, p-ständig elektrophil substituierter Toluol-Derivate¹⁸⁾ in basischem Milieu, z. B.



¹³⁾ H. BREDERECK & W. PFLEIDERER, Chem. Ber. 87, 1119 (1954).

¹⁴⁾ R. KUHN & H. RUDY, Ber. deutsch. chem. Ges. 67, 1125, 1462, Fussnote 5 (1934).

¹⁵⁾ Vgl. z. B. R. KUHN & H. RUDY, Ber. deutsch. chem. Ges. 67, 1826 (1934).

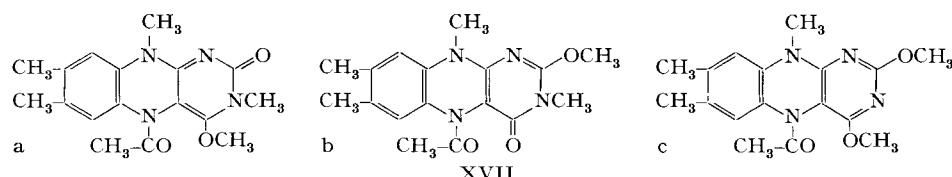
¹⁶⁾ Vgl. R. KUHN, H. TRISCHMANN & I. LÖW, Angew. Chem. 67, 32 (1955), Permethylierung von Zuckern in Dimethylformamid; T. F. RUTLEDGE, J. org. Chemistry 24, 840 (1959), Alkylierung von Acetyliden in Dimethylformamid; desgl. E. F. JENNY & K. D. MEIER, Angew. Chem. 71, 245 (1959).

¹⁷⁾ W. PFLEIDERER, Chem. Ber. 89, 1148 (1956).

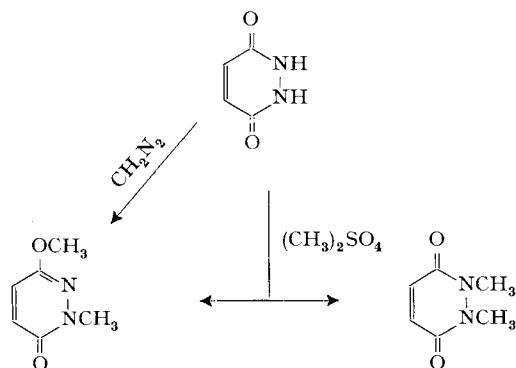
¹⁸⁾ Vgl. R. HUISGEN, Liebigs Ann. Chem. 559, 126 (1948), sowie T. TSURUTA, T. FUENO & J. FURUKAWA, J. Amer. Chem. Soc. 77, 3265 (1955).

Alkylierung von Leukoflavinen

Wir versuchten nun, die erschöpfende Alkylierung in der beschriebenen Weise an Leukoflavinen (C) durchzuführen, die wir nach dem früher von uns beschriebenen Verfahren¹⁹⁾ durch Acetylierung in 5-Stellung schützen, um dann durch Oxydation des erwarteten 1,3-Dimethylleukoflavins (vgl. V, VIII) zu einem stabilen Flavosemichinon (VI) zu gelangen. Bei der Methylierung von 5-Acetylleukolumiflavin (VII b) erhielten wir ein bei 225° unscharf schmelzendes Kristallisat, dessen Elementaranalyse auf ein Dimethyllderivat von VII b zutreffen würde. Überraschenderweise zeigten Gruppenbestimmungen jedoch neben NCH₃ auch OCH₃ an, und zwar mehr als ein Äquivalent²⁰⁾, so dass wir mit einem Isomerengemisch rechnen mussten. An Stelle des gewünschten N-1, N-3-Dimethyllderivats VIII b mussten drei mögliche Iminoäther-Strukturen (XVII a, b, c) sowie zwei isomere Oxazolin-Strukturen (IX b und X b, «*p*-Iminoäther») diskutiert werden. 1-Substituierte Derivate schieden auf Grund der Abbaureaktionen aus, die weiter unten beschrieben werden.



Iminoäther treten bei der Alkylierung von cyclischen Amiden immer dann auf, wenn der potentielle Gewinn an cyclischer Resonanz grösser oder gleich dem alternativen Gewinn an Amidresonanz ist. Eindrucksvolle Beispiele hierfür gibt BILTZ²¹⁾ in seiner zusammenfassenden Darstellung der Harnsäure-Methylierung. In jüngster Zeit lieferten DRUEY und Mitarb.²²⁾ hierzu einen interessanten Beitrag. Diese Autoren erhielten bei der Methylierung des Maleinhydrazins mit Dimethylsulfat ein Gemisch aus O-, N- und N, N-Dimethyllderivat:



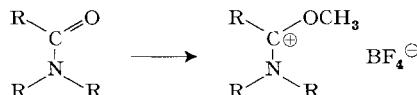
¹⁹⁾ P. HEMMERICH & H. ERLENMEYER, Helv. 40, 180 (1957).

²⁰⁾ Da in gewissen Fällen zyklischer Alkylimide (vgl. z. B. H. GYSEL, Mikrochim. acta 6, 743 (1954)) bei der ZEISEL-Bestimmung «scheinbares» O-Alkyl gefunden wird, haben wir eine Reihe von Methyl(leuko)(iso)alloxazinen, deren N-Substitution sichergestellt war (vgl. Exper. Teil), durch ZEISEL-Bestimmung analysiert. Es fand sich nur bei Va und VIIIa mehr als 0,4% «scheinbares» O-Alkyl.

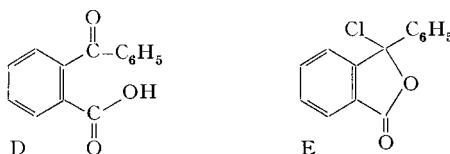
²¹⁾ H. BILTZ, Ber. deutsch. chem. Ges. 72, 807 (1939).

²²⁾ K. EICHENBERGER, A. STAHELIN & J. DRUEY, Helv. 37, 837 (1954).

Demgegenüber erhält man bei der gleichen Reaktion mit Diazomethan²³⁾ ausschliesslich das O,N-Dimethyl-derivat. Aber auch in Fällen ohne Ringresonanz tritt bei der Amid-Alkylierung zunächst O-Substitution auf; die Iminoäther lagern sich unter den Bedingungen der Reaktion allerdings schnell in die Alkylamide um, so dass sie nur in Ausnahmefällen, so z. B. ausgehend von Caprolactam²⁴⁾, isoliert werden können. MEERWEIN und Mitarb.²⁵⁾ erhielten Methoxy-carbeniumsalze bei der Methylierung von tertiären Amiden:

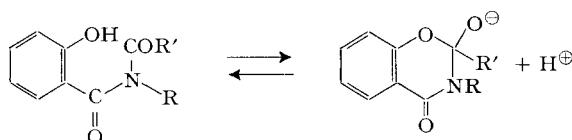


Das Auftreten von ψ -Strukturen (vgl. IX, X) war – in der Reihe der Benzophenon-o-carbonsäuren – kürzlich Gegenstand einer eingehenden Untersuchung durch GRAF und Mitarb.²⁶⁾. Demzufolge liegen die Carbonsäuren dieser Reihe in der offenen Form D, die Säurechloride hingegen ausschliesslich in der ψ -Form E vor:



Ester lassen sich in beiden Formen erhalten, wobei sich die ψ -Ester in polarer Lösung in die offenen Ester umlagern.

Eine unserem Fall noch ähnlichere Nachbargruppenbeteiligung postulieren BRENNER und Mitarb.²⁷⁾ bei den Salicylsäure-acylimiden, deren chemische und spektrale Eigenschaften die bevorzugte Existenz von ψ -Strukturen nahelegen:



In der den Leukoflavinen zunächst verwandten Uracil-Reihe²⁸⁾ sind hingegen ebenso wie bei den gut untersuchten Pteridonen²⁹⁾ bisher unseres Wissens nur N-Alkylierungen bekannt geworden.

Wir kristallisierten das bei der Methylierung von VIIb erhaltenen Isomeren-gemisch vom Smp. 225° fraktioniert aus Toluol und erhielten als schwerlösliche Hauptfraktion ein Kristallisat vom konstanten Doppel-Smp. 234–236°/246–248°, dessen Gruppen-Analyse jetzt präzis eine CH₃O- neben zwei CH₃N-Gruppen ergab. Das gleiche Produkt erhielten wir auch bei der Methylierung von VIIb und XIIb, R' = CH₃, mit CH₂N₂.

²³⁾ F. ARNDT, L. LOEWE & L. ERGEMER, Rev. Fac. Sci. Univ. Istanbul, A 13, 112 (1948).

²⁴⁾ R. E. BENSON & T. L. CAIRNS, J. Amer. chem. Soc. 70, 2115 (1948).

²⁵⁾ H. MEERWEIN, P. BORNER, O. FUCHS, H. J. SASSE, H. SCHRODT & J. SPILLE, Chem. Ber. 89, 2060 (1956), und dort zit. Arbeiten.

²⁶⁾ W. GRAF, E. GIROD, E. SCHMID & W. G. STOLL, Helv. 42, 1085 (1959).

²⁷⁾ M. BRENNER, J. P. ZIMMERMANN, J. WEHRMÜLLER, P. QUITT, A. HARTMANN, W. SCHNEIDER & U. BEGLINGER, Helv. 40, 1497 (1957).

²⁸⁾ F. H. CASE & A. J. HILL, J. Amer. Chem. Soc. 52, 1536 (1930).

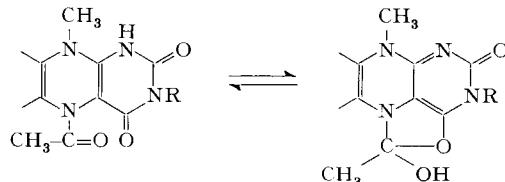
²⁹⁾ H. C. S. WOOD, in: Chemistry and Biology of Pteridines, CIBA Foundation Symposium, London 1954, S. 35 ff.

In analoger Weise ergab die Äthylierung von VIIb zunächst ein unscharf bei 110° schmelzendes Isomerengemisch. Daraus liess sich aus Isopropyläther/Petroläther eine schwerlösliche Hauptfraktion vom Smp. 153–154° herauskristallisieren, deren Elementar- und Gruppenanalyse auf ein O,O-Diäthylderivat von VIIb zutraf. Zur weiteren Abklärung der Strukturen leisteten die IR.-Spektren den wertvollsten Beitrag (Fig. 1–5), während UV.-Spektren keine signifikante Differenzierung ermöglichten (vgl. Fig. 6).

Diskussion der IR-Spektren³⁰⁾ (vgl. Fig. 1–5)

Aus den sehr bandenreichen Spektren der Acetylleukoflavine VIIb (Fig. 1) und XIb, R' = CH₃ (Fig. 2) stechen die drei CO-Schwingungen nach Lage und Intensität deutlich hervor, vgl. Tabelle S. 383. Durch Vergleich mit dem acetylfreien Flavin IVb, R' = CH₃ (Fig. 3) lässt sich die jeweils intensivste Bande bei 6,09 μ bzw. 6,14 μ leicht dem Acetyl-CO zuordnen. In guter Übereinstimmung damit liegt die Amid-Bande von N,N-Diäthylacetamid bei 6,10 μ³¹⁾. Die Zuordnung der beiden übrigen CO-Banden wird durch Vergleich mit bekannten Daten nah verwandter Purine und Pyrimidine³¹⁾ möglich, vgl. Tabelle. Die kurzwelligste CO-Schwingung im Bereich von 5,78 bis 5,88 μ ist danach dem 4-ständigen CO zuzuschreiben, welches der C=C-Bindung im Pyrimidinkern benachbart ist. Diese scharfe Bande entfällt bei den erschöpfend alkylierten Acetylleukoflavinen vom (Doppel-)Smp. 234–236°/246–248° (Fig. 5) und 153–154° (Fig. 4), die oben beschrieben wurden. Zugleich entfällt aber bei diesen Verbindungen auch die intensive Acetylamin-Bande im Bereich von 6,10 μ. Wir sehen daher die Oxazolin-Strukturen (ψ -Strukturen) IXb, R' = C₂H₅, für das O,O-substituierte Derivat vom Smp. 153–154° und Xb, R' = CH₃, für das N,O-substituierte Derivat vom Doppel-Smp. 234–236°/246–248° als gesichert an.

Schon das Spektrum des Acetylleukolumiflavins (VIIb) (Fig. 1) unterscheidet sich von demjenigen seines 3-Methylderivates XIb, R' = CH₃ (Fig. 2), durch weniger scharfe und weniger intensive CO-Absorption sowie durch das Auftreten von zwei neuen Banden im Bereich von 9 μ. Es liegt nahe, diese Banden neu auftretenden C-O-C-Bindungen³²⁾ zuzuordnen in der plausiblen Annahme, das Gleichgewicht



werde beim Übergang von R = CH₃ zu R = H mit zusätzlicher Tautomerisierungsmöglichkeit nach rechts verschoben. Während XIb, R' = CH₃ (Fig. 2) im Bereich von 9 μ nur geringe Absorption zeigt, liegen im Falle des Di-iminoäthers IXb, R' = C₂H₅ mehrere intensive Banden in diesem Bereich (Fig. 4). IXb, R' = C₂H₅ zeigt

³⁰⁾ Die IR.-Spektren wurden an KBr-Presslingen mit einem PERKIN-ELMER-Gerät, Modell 21, im Inst. für physik. Chemie der Universität Freiburg i. B., Leitung Prof. Dr. R. MECKE, aufgenommen.

³¹⁾ H. M. RANDALL, R. G. FOWLER, N. FUSON & I. R. DANGL, Infrared Determination of Organic Structures, New York 1952, S. 151, 172ff.

³²⁾ L. J. BELLAMY, The Infra-red Spectra of Complex Molecules, London 1954, S. 99ff.

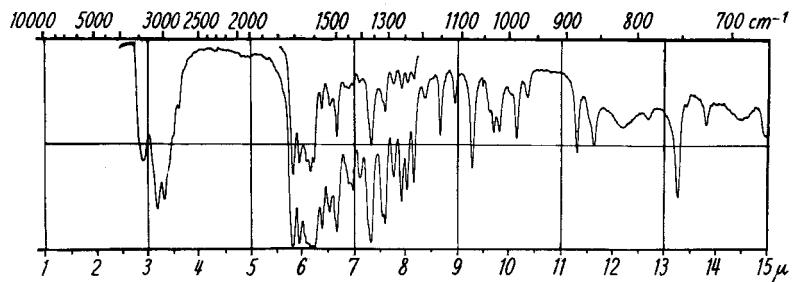
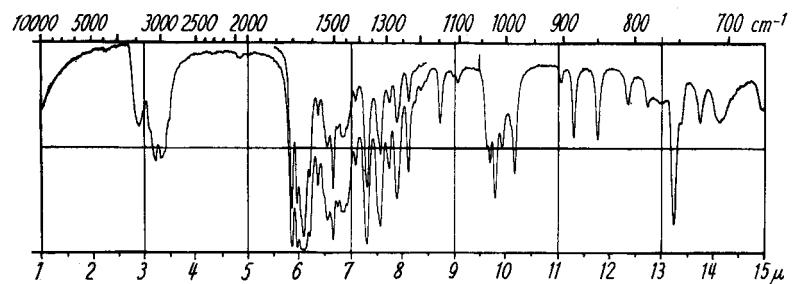
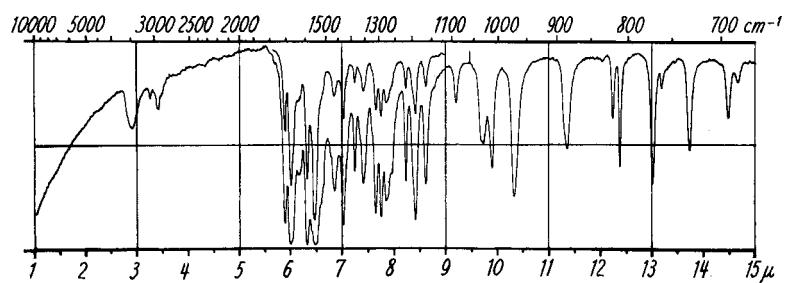
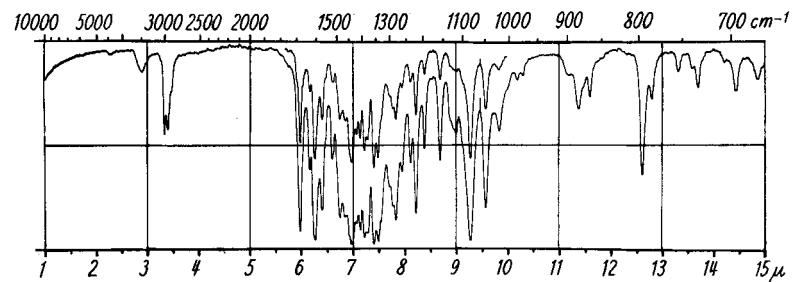


Fig. 1. IR.-Spektrum von VIIb

Fig. 2. IR.-Spektrum von XIb, $R' = \text{CH}_3$ Fig. 3. IR.-Spektrum von IVb, $R' = \text{CH}_3$ Fig. 4. IR.-Spektrum von IXb, $R' = \text{C}_2\text{H}_5$

dementsprechend im CO-Bereich nur noch eine mässig intensive Bande bei $5,98 \mu$, welche sich bei allen untersuchten Flavinen findet, wenigstens als Schulter (vgl. Tabelle). Sie ist zweifellos als Skelettschwingung anzusprechen. Demgegenüber tritt beim Mono-iminoäther Xb, $R' = \text{CH}_3$, neben der genannten Skelettschwingung ($5,99 \mu$) wieder die intensive 2-CO-Bande bei $5,92 \mu$ hervor. (Fig. 5.)

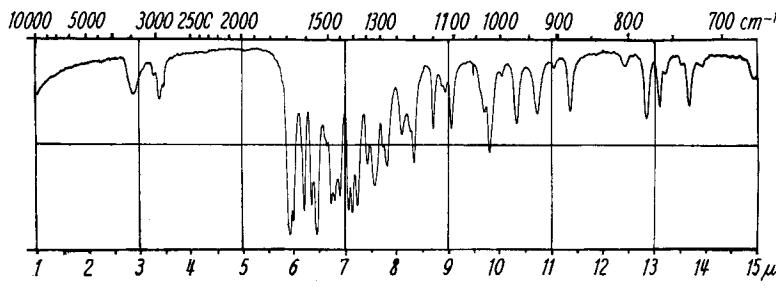
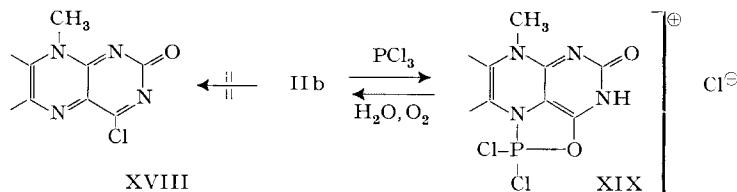
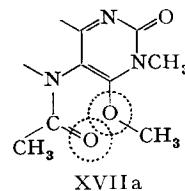
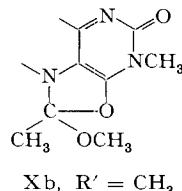


Fig. 5. IR.-Spektrum von Xb, $R' = \text{CH}_3$

Die Neigung der Leukoflavine zur Ausbildung peri-cyclisierter Acylderivate lässt sich auch durch chemische Daten belegen: So fanden wir schon früher, dass man aus 4-Imino³³⁾- bzw. 4-Thio-flavinen¹⁹⁾ keine stabilen Acylleukoderivate erhalten kann. Vermutlich kommt es in diesen Fällen zur Ausbildung anellierter Imidazol- bzw. Thiazol-Ringe von hoher Hydrolysen-Empfindlichkeit. Weiterhin erhält man bei der Umsetzung von Lumiflavin (IIb) mit PCl_3 in Dimethylformamid³⁴⁾ nicht das erwartete Iminochlorid XVIII, welches mit Aminen zu 4-Imino-flavinen reagieren müsste. Das entstehende Flavin- PCl_3 -Addukt bildet vielmehr bei der Aminolyse Lumiflavin zurück, was sich durch Annahme einer in Lösung stabilen ψ -Struktur XIX leicht erklären liesse.



Die ausgeprägte Neigung der 5-Acylleukoflavine zur O-Alkylierung findet so ihre Deutung in der Begünstigung der Lactim-Tautomerisierung durch die Nachbarschaft der Acyl-CO-Gruppe. Dieses besondere Verhalten der Leukoflavine könnte bei der in jüngster Zeit diskutierten Mit-



³³⁾ P. HEMMERICH, B. PRIJS & H. ERLENMEYER, Helv. 42, 1604 (1959).

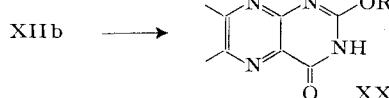
³⁴⁾ H. H. BOSSHARD, R. MORY, M. SCHMID & H. ZOLLINGER, Helv. 42, 1653 (1959); H. H. BOSSHARD & H. ZOLLINGER, Helv. 42, 1659 (1959), beschreiben die katalytische Wirkung von Dimethylformamid bei Reaktionen mit SOCl_2 und POCl_3 . Auch in unserem Fall tritt ohne Zusatz von Dimethylformamid keine Reaktion ein.

wirkung der Flavingruppe in der oxydativen Phosphorylierung³⁵⁾ eine Rolle spielen. Die ausschliessliche Bildung von ψ -Derivaten lässt sich auch dadurch verstehen, dass die 5-Acetylgruppe im hypothetischen Iminoäther XVIIa durch die peri-ständige 4-CH₃O-Gruppe auf Kosten der Amidresonanz aus der Ebene herausgedrängt wird. Dieser sterische Effekt lässt sich am Kalottenmodell gut erkennen.

Autoxydative Hydrolyse der alkylierten Acylleukoflavine

Dass es sich bei den Rohprodukten der Alkylierung von 5-Acetylleukoflavin (VIIb) um Isomerengemische handeln musste, zeigte nicht nur die Gruppen-Bestimmung, sondern auch die milde saure Hydrolyse der Rohkristallisate. Man erhält durch kurzes Erwärmen mit 4 bis 6 N HCl unter Autoxydation in Lösung violetttrote Flavosemichinon-Salze, welche beim Abkühlen meist in schönen rostbraunen Stäbchen kristallisieren und dem Typus der KUHN'schen «Rhodoflavine»⁵⁾ angehören. Diese oxydieren sich im Chromatogramm mit Butanol-gesättigtem 1-proz. H₂O₂ als Fliessmittel vollends auf, und man erhält eine Auf trennung in drei gelbe Flavochinon-Komponenten mit grüner Fluoreszenz: Von diesen ist die kleinste Fraktion vom niedrigsten Rf-Wert (0,35) mit Lumiflavin (IIb) identisch, die nächste mit dem entsprechenden 3-Alkyllumiflavin¹⁴⁾ IVb (R' = CH₃: Rf = 0,44; R' = C₂H₅: Rf = 0,60). Die jeweils unbekannte dritte Flavinkomponente zeigte den Rf-Wert 0,81 (Methylderivat) bzw. 0,88 (Äthylderivat).

Führt man die Hydrolyse nicht mit den Rohgemischen, sondern mit den gereinigten Produkten aus, so erhält man aus dem O,N-Dimethylderivat XIIb, R' = CH₃ ausschliesslich 3-Methyllumiflavin (IVb, R' = CH₃) und aus dem O,O,-Diäthylderivat IXb, R' = C₂H₅ bei vorsichtiger, schneller Verseifung nahezu ausschliesslich jene dritte, unbekannte Flavinkomponente vom Rf = 0,88. Wir schreiben daher den neuen Komponenten die Konstitution von 2-O-Alkyllumiflavinen XIIb (R' = Alkyl) zu. Die folgenden Beobachtungen dienen hierfür als weitere Belege: In der Farbe unterscheiden sich die O-Alkylflavine XIIb kaum vom Lumiflavin (IIb), während ihre Fluoreszenz deutlich tiefer grün ist als die von IIb, beides in Übereinstimmung mit den früher von uns beschriebenen Eigenschaften des 2-Desoxylumiflavins¹⁹⁾. Die Flavine XIIb sind in der Semichinon-Form wesentlich stabiler als alle uns bekannten Rhodoflavine (vgl. B), d. h. sie sind unter Luftabschluss in Lösung lange Zeit haltbar und laufen im Papierchromatogramm einheitlich. In der Chinonform sind die Flavine XIIb jedoch nur in neutraler Lösung bei niedriger Temperatur kurze Zeit haltbar. Beim Erwärmen gehen sie unter Wanderung der Alkylgruppe in die 3-Alkylflavine IVb, mit verdünnter Mineralsäure unter Verseifung in Lumiflavin (IIb) über, wie sich papierchromatographisch leicht verfolgen lässt. Diese beiden Reaktionen stehen im Einklang mit dem Verhalten einfacherer Iminoäther²⁴⁾, insbesondere auch in der Uracil-Reihe³⁶⁾.



Geringste Konzentrationen von Basen genügen zum Abbau der Flavine XIIb unter Bildung intensiv hellblau fluoreszierender Körper, die aber nicht mit dem ebenso

³⁵⁾ P. E. GLAHN & S. O. NIELSEN, Nature 183, 1578 (1959), postulieren Leukoflavin-4-Phosphate als P-Überträger *in vivo*.

³⁶⁾ G. A. HOWARD, B. LYTHGOE & A. R. TODD, J. chem. Soc. 1947, 1052.

fluoreszierenden Lumichrom (Ib) oder einem seiner N-Alkylderivate identisch sind, wie wir zunächst erwarteten. Wir vermuten daher, dass es sich um 2-O-Alkyl-lumichrome (XX) handelt, entstanden durch (N-10)-Demethylierung (vgl. weiter unten), was aber noch der Bestätigung bedarf.

Alkylierung von Leuko-alloxazinen (vgl. Fig. 6)

Alloxazine lassen sich, wie wir fanden, ebenso leicht in stabile 5-Acyl-leuko-derivate (vgl. XIII, XIV) überführen wie Isoalloxazine. Nachdem die 1,3-Dialkylierung in der Leukoflavin-Reihe nicht gelungen war, suchten wir das gewünschte 1,3,10-Trimethylleukoflavin (V) ausgehend von 5-Acetylleukoalloxazinen zu erhalten.

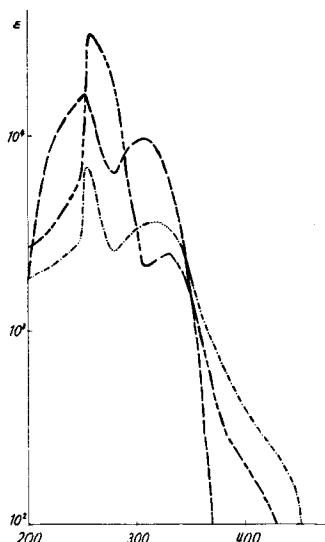


Fig. 6. UV.-Spektren von Leukoalloxazinen in HCOOH
 --- VIIIa - - - IXb, R' = C₂H₅ - · - · - XIVa

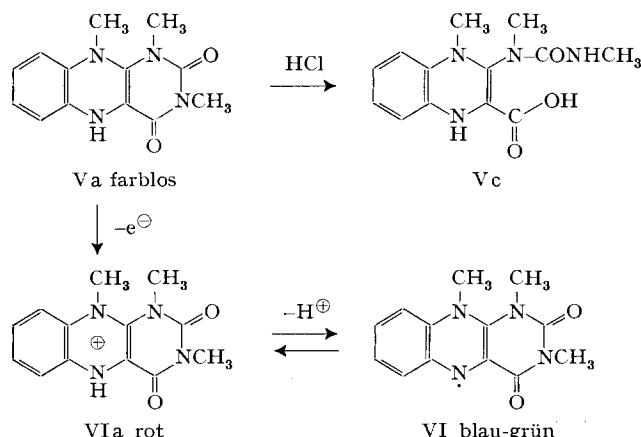
Bei der Methylierung von XIVa mit Dimethylsulfat in Dimethylformamid/K₂CO₃ erhielten wir ein komplexes Gemisch, welches nach saurer Hydrolyse und Autoxydation vorwiegend 1- und 3-Methylalloxazin¹⁷) neben 1,3-Dimethylalloxazin (IIIa) und wenig 3,10-Dimethylflavin (IVa) enthielt, wie die papierchromatographische Auftrennung zeigte. Wir gingen daher von 1,3-Dimethylalloxazin (IIIa) aus, dessen 5-Acetylleukoderivat XVa bei der Methylierung ein wasserlösliches, nach Extraktion mit CHCl₃ zunächst öliges Isomerengemisch ergab, aus welchem durch Kristallisation aus Toluol und Sublimation bei 180°/0,01 Torr ein Trimethyl-5-acetylleuko-(iso)alloxazin rein erhalten werden konnte. Der Smp. dieser Verbindung (208–211°) änderte sich bei wiederholter Sublimation nicht, ebenso blieb ein Anteil von 0,5 Äq. O-Methyl in der ZEISEL-Bestimmung konstant. Das Vorliegen eines Mischkristallisats konnte aber sowohl papierchromatographisch als durch Herstellung des isomeren ψ-O,N,N-Trimethyl-5-acetyl-leukoalloxazins (XVIa) ausgeschlossen werden.

Letzteres erhielten wir durch Methylierung von XVa mit Diazomethan in reiner Form; es zeigt in der ZEISEL-Bestimmung genau 1 Äq. OCH₃ neben 2 Äq. NCH₃ und

gibt bei saurer Hydrolyse und Autoxydation erwartungsgemäss 1,3-Dimethyl-alloxazin (IIIa). XVIa, Smp. 174–179°, gibt mit dem zuerst erhaltenen Isomeren vom Smp. 208–211° eine Smp.-Depression auf 165°, so dass diesem zweifelsfrei die Konstitution des gewünschten 1,3,10-Trimethyl-5-acetyl-leukoflavins (VIIIa) zugeordnet werden darf. Der nichtstöchiometrische OCH₃-Gehalt kann also in diesem Fall nicht real sein²⁰⁾. Offenbar treten bei N,N,N-Trimethyl-leukoflavinen systematische Fehler in der analytischen Unterscheidung von OCH₃ und NCH₃ auf, die auf besondere Labilität der dritten CH₃N-Gruppe zurückzuführen sind. Weitere Bestätigung hierfür gab das Produkt der sauren Verseifung von VIIIa, wie im folgenden beschrieben wird.

1,3,10-Trimethyl-leukoflavin (Va)

Bei kurzem Erwärmen mit 2 n HCl liess sich VIIIa unter nur geringer Autoxydation des Verseifungsproduktes entacetylieren. Das gewünschte 1,3,10-Trimethyl-leukoflavin scheidet sich in schönen gelben Kristallen ab und ist nach Kristallisation aus Äthanol analysenrein. Die ZEISEL-Bestimmung zeigt ebenso wie bei VIIIa einen «scheinbaren» CH₃O-Gehalt von 0,5 Äq. Das Vorliegen eines echten Iminoäther-Methoxyl-Anteils ist nach der Säurebehandlung vollends ausgeschlossen. Das Spektrum des – in saurer Lösung roten – Va in HCOOH zeigt jedoch zusätzlich zu der für Leuko-(iso)alloxazine charakteristischen Doppelbande im UV. (λ_{max} 258, 358 m μ) eine weitere Bande bei 460 m μ , die charakteristisch ist für 6,7,8,9-unsubstituierte Rhodo-(iso)alloxazin-semichinone. So fanden wir für reines 1,3-Dimethyl-rhodoalloxazin (erhalten durch saure Hydrolyse und partielle Autoxydation von XVIa) λ_{max} 258, 354, 468 m μ (vgl. Fig. 6). BEINERT⁷⁾ gibt für das nah verwandte Rhodoriboflavin-mononucleotid λ_{max} 260, 330, 500 m μ an. Va liegt also in partiell autoxydierter Form vor, wodurch auch die gelbe Farbe der Kristalle erklärt wird, die sich nicht ganz entfernen lässt. Durch Reacetylierung von Va mit Acetanhydrid unter N₂ erhält man die farblose Acetylverbindung VIIIa wieder zurück.



1,3,10-Trimethyl-leukoflavin (Va) ist somit, wie erwartet, wesentlich stabiler als alle bekannten Leukoflavine, die sich nur in Lösung unter absolutem Luftausschluss herstellen und analysieren lassen. Die Kristalle von Va sind hingegen lange Zeit un-

verändert haltbar. Auch in Lösung autoxydiert sich Va bei Zimmertemperatur nur langsam (vgl. unten).

In mineralsaurer Lösung tritt neben der Autoxydation Ringspaltung auf. Bei Ausschluss von O_2 erhält man aus Va durch Erwärmen mit 6 N HCl nach Neutralisation farblose, luftempfindliche Kristalle einer stark amphoteren Aminocarbonsäure, welche auf Grund von Elementar- und Gruppen-Analyse als 1,4-Dihydro-1-methyl-2-(N,N'-dimethylureido)-chinoxalin-3-carbonsäure (Vc) anzusehen ist. Vc zeigt in der ZEISEL-Bestimmung kein OCH_3 , sondern drei volle Äq. NCH_3 , womit der «scheinbare» OCH_3 -Gehalt von VIIIa und Va geklärt ist.

Oxydiert man Va vorsichtig mit H_2O_2 in $HCOOH$, so erhält man eine starke Vertiefung der Rotfärbung (Intensivierung und Verschiebung der langwelligen Bande nach 470 m μ) infolge vollständiger Ausbildung des Radikal-Ions VIa. An Stelle von H_2O_2 lassen sich andere Oxydationsmittel, z. B. auch Flavochinone, verwenden.

In unplerer Lösung (Toluol) autoxydiert sich Va (vgl. Fig. 7) langsam unter Bildung des grünlich blauen Radikals VI (λ_{max} 599 m μ). Beim Verdünnen mit Äthanol tritt eine bathochrome Verschiebung nach blaugrün auf (λ_{max} 625 m μ). Dies steht in guter Übereinstimmung mit der von BEINERT⁷⁾ gefundenen Bande des monomeren Verdo-riboflavin-mononucleotids im Bereich von 580 m μ . Im letzteren Fall wird diese Bande durch die Absorption des analogen dimeren Chinhydrons (λ_{max} ⁷⁾ ca. 800 m μ) überdeckt. Das Fehlen dieser Assoziationstendenz beim 1,3,10-Trimethyl-verdo-

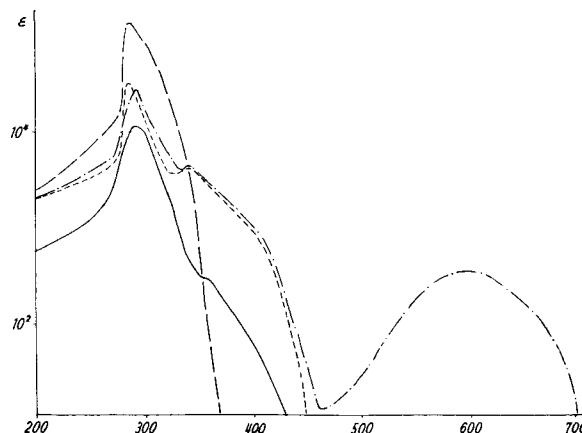


Fig. 7. Autoxydation von Trimethyl-leukoflavin Va in Toluol; UV.-Spektren:

- VIIIa (= Acetyl-Va)
- - - Va Frischbereitete Lösung
- · - · do. nach 5-stdg. Stehen an der Luft bei 20° = VI
- do. nach 3 Tagen (unbekanntes Zerfallsprodukt von VI)

flavin VI ist nach der von STAAB⁹⁾ gegebenen Kennzeichnung der Charge-transfer-Komplexe weniger auf das Fehlen von H-Brücken als auf Nonkoplanarität der Molekel zurückzuführen. Diese Struktureigenart resultiert bei VI aus der sterischen Wechselwirkung der peri-ständigen Methylgruppen, die auch durch das Kalottenmodell belegt wird. Dadurch wird auch die Frage beantwortet, warum Va, bzw. VI(a) nicht oxydativ in 10-Stellung demethyliert werden können unter Bildung von 1,3-Dimethyl-alloxazin (IIIa), wie dies weiter unten an analogen Flavosemichinonen beschrieben

wird: Für die Desalkylierungsreaktion gemäss $G \rightleftharpoons H \rightleftharpoons J$ (Reaktionsschema II) ist ebenfalls Koplanarität vorauszusetzen, welche bei VI(a) nicht gegeben ist. Man gelangt so auf zwei völlig unabhängigen Wegen zu gleichlautenden Festlegungen der räumlichen Struktur der Radikale VI(a), welche sich daher als Modelle zum Studium freier Flavosemichinone besonders eignen.

Tabelle. IR.-Spektren von Flavinen und Vergleichsverbindungen
Absorptions-Daten in μ

Verbindung	Nr.	4-CO	2-CO	Acetyl-CO	C-O-C*)	Skelettschwing.*)	
3-Methyl-lfl. (Fig. 3)	IV b, R' = CH ₃	5,88 m	6,00 s	—	—	6,02 w	6,15 w
3-Methyl-5-acetyl-leuko-lfl. (Fig. 2)	XI b, R' = CH ₃	5,85 s	5,96 s	6,09 s	—	6,02 w	6,19 m
5-Acetyl-leuko-lfl. (Fig. 1)	VII b	5,81 s	5,93 s	6,14 s	9,27 m	6,06 m	6,21 m
(O, N)-Dimethylderivat von VII b (Fig. 5)	X b, R' = CH ₃	—	5,93 s	—	9,05 m	5,99 m	6,21 m
(O, O)-Diäthylderivat von VII b (Fig. 4)	IX b, R' = C ₂ H ₅	—	—	—	9,28 s	5,98 s	6,16 m
1,3-Dimethyl-5-acetyl- leukoalloxazin	XVa	5,85 s	6,02 s	6,10 s	—	5,99 w	6,27 m
Xanthin ³¹⁾ Uracil ³¹⁾ Alloxan H ₂ O ³¹⁾		5,88 5,82 5,78	6,01 6,01 5,89				
N,N-Diäthyl-acetamid ³¹⁾				6,10			

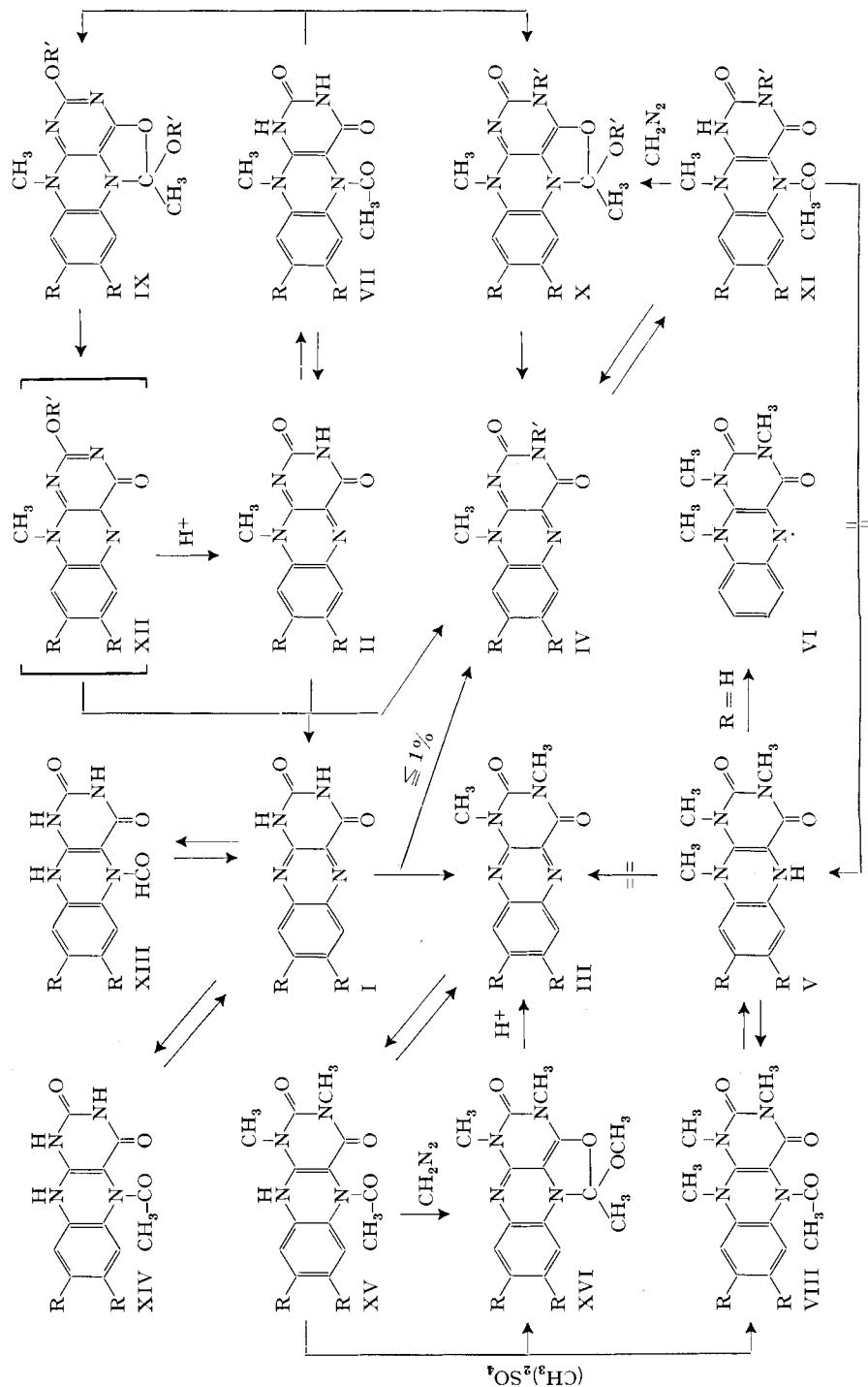
VI lässt sich aus der blauen Toluol-Lösung mit HCOOH – nicht aber mit Wasser – ausschütteln und geht dabei in die rote ionische Form VIa über. Daraus lässt sich abschätzen, dass die freien Semichinone die am stärksten basische Flavin-Struktur darstellen, deren Metallchelate acidimetrisch erfassbar sein sollten. Weitere Studien sind in diesem Zusammenhang von uns vorgesehen.

Desalkylierungsreaktionen an Isoalloxazinen

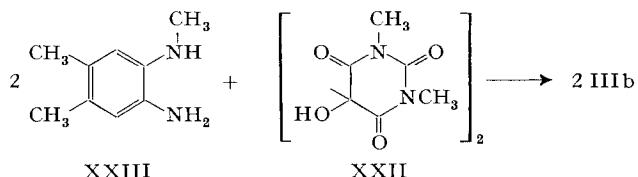
Parallel zur oben beschriebenen Synthese eines (N-1)-substituierten Flavose-michinons B haben wir die Möglichkeit zur direkten Kondensation dieses Verbin-dungstypus aus Tetramethylalloxanthin (XXII)³⁷ und N-Methyl-symm.-o-xylylen-o-

³⁷⁾ Alloxantine können formal als Chinhhydrone des Redox-Systems Alloxan-Dialursäure aufgefasst werden; zur Struktur vgl. R. MOUBASHER & A. M. OTHMAN, J. Amer. chem. Soc. 72, 2667 (1950).

Reaktionsschema I

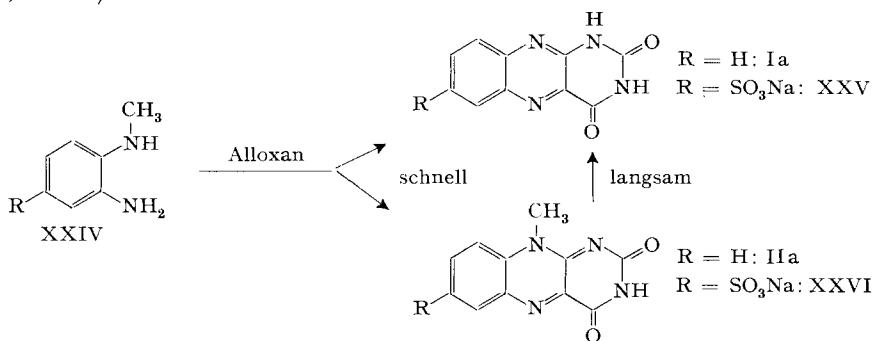


diamin (XXIII) geprüft. Die Reaktion – nach Art der Flavin-Synthese von KUHN³⁸⁾ – verlief bei Luftausschluss in Eisessig unter Bildung eines violetten «Rhodoflavins»⁵⁾, welches sich aus verd. HCl in bräunlichen Kristallen erhalten liess. Die Verbindung zeigte das für Rhodoflavine in saurer Lösung charakteristische Absorptionsmaximum bei 500 m μ ⁷⁾, nicht aber die erwartete Stabilität. Schon bei Raumtemperatur trat vielmehr langsame Autoxydation unter Bildung von farblosem 1,3-Dimethyl-lumichrom (IIIb) auf, welches durch Misch-Smp. und chromatographischen Vergleich mit authentischem Material identifiziert wurde.



Es erhebt sich nun die Frage, ob die hier auftretende (N-10)-Demethylierung bei der Kondensation selbst, in der Semichinon-Stufe oder aber erst nach der Autoxydation stattfindet. Wie MERKEL & NICKERSON⁸⁾ sowie WADA & SAKURAI³⁹⁾ feststellten, wird die photolabile 10-Ribitylgruppe des Riboflavins durch Spülen der Versuchslösung mit O₂ gegen Licht stabilisiert. Spaltung von (N-10)-Alkylbindungen am Flavin sind in der KUHN'schen Synthese unter mildesten Bedingungen in einigen Fällen als unerwünschte Nebenreaktionen beobachtet worden⁴⁰⁾.

In Nachprüfung dieses Befundes erhielten wir bei der Kondensation von N-Methyl-o-phenylenediamin (XXIV, R = H) oder negativ substituierten Derivaten (XXIV, R = SO₃Na) mit Alloxan unter Luftausschluss in Eisessig⁴¹) schon bei Raumtemperatur bis zu 30% Alloxazine (Ia, XXV) neben den entsprechenden Isoalloxazinen (IIa, XXVI).



Die Schnelligkeit des Reaktionsablaufes **XXIV** → **Ia**, **XXV** spricht dafür, dass die Demethylierung an einem koplanaren Zwischenprodukt der Kondensation erfolgt.

³⁸) R. KUHN & K. REINEMUND, Ber. deutsch. chem. Ges. 67, 1932 (1934).

³⁹ T. WADA & Y. SAKURAI, J. Japan. Soc. Food Nutrition 5, 44, 97, 208 (1952-53); vgl. Chem. Abstr. 50, 16899, 16900 (1956).

⁴⁰) D. M. HALL & E. E. TURNER, J. chem. Soc. 1945, 694.

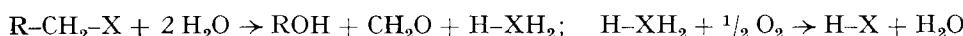
⁴¹⁾ R. KUHN & F. WEYGAND, Ber. deutsch. chem. Ges. 68, 1282 (1935), beschrieben dieses Verfahren nur an 7,8-Dimethylflavinen, bei welchen der Demethylierungs-Effekt ausbleibt.

wodurch die Demethylierung bei der Reaktion $2 \text{ XXIII} + \text{ XXII} \rightarrow 2 \text{ IIIb}$ und deren Ausbleiben im Falle des nicht koplanaren VI ($\text{VI} \xrightleftharpoons{\text{H}} \text{ IIIa}$) verständlich wird.

Die zunächst gebildeten, stark elektroaffinen Isoalloxazine können aber auch vom überschüssigen Diamin bis zur Radikalstufe reduziert werden, um dann unter Bildung der Alloxazine zu zerfallen. Dieselbe Reduktion wird bei der Riboflavin-Photolyse vom Licht induziert⁴²⁾. Lumiflavin (IIb) hingegen lässt sich bei Raumtemperatur nicht mehr demethylieren⁴²⁾, da seine 10-Methylgruppe einerseits weniger photosensibel ist als die Ribitylgruppe des Riboflavins, und andererseits der Beitrag des N-10 zur Resonanz gegenüber dem 10-Methylflavin (IIa) (vgl. oben) durch den + I-Effekt der 8-Methylgruppe¹⁾ herabgesetzt ist. In heißer neutraler bis schwach saurer Lösung wird hingegen, wie wir fanden, auch Lumiflavin photolytisch zu Lumichrom (Ib) abgebaut. Die sehr langsame Reaktion wird beschleunigt durch Zugabe reduzierender Metallionen wie Fe^{2+} , Sn^{2+} und Co^{2+} . Spült man die Lösung mit O_2 , so findet kein Abbau statt. Zu ganz äquivalenten Ergebnissen bezüglich Metallzusätzen gelangte SAKAI⁴³⁾ bei der Riboflavin-Photolyse, wie uns kurz vor Abschluss dieser Arbeit bekannt wurde. Bei den noch stabileren 8-Aminoflavinen³³⁾ konnten wir auch bei höherer Temperatur und Metallsalz-Zusatz keine (N-10)-Desalkylierung mehr feststellen. SHIMIZU⁴⁴⁾ hat überzeugend nachgewiesen, dass das C-1 der Seitenkette des Riboflavins (A, R = CH_3 , R' = Ribityl) bei der Photolyse quantitativ zu Formaldehyd abgebaut wird. Demzufolge war zu erwarten, dass die (N-10)-Desalkylierung in Gegenwart von überschüssigem Carbonylreagens beschleunigt abläuft. Dies konnten wir durch das Experiment bestätigen: Alle von uns untersuchten 10-Methylflavine (IIa,b und IVa, b) werden bei mehrtägigem Sieden mit überschüssigen Hydroxylaminsulfat in Eisessig in guter Ausbeute in die entsprechenden Alloxazine übergeführt. Mit Hydrazin und Phenylhydrazin erhält man den gleichen Effekt, es treten jedoch mehr Verharzungsprodukte auf.

Die Stabilität der 10-Alkyl-Gruppe ist daher in erster Linie eine Funktion der Elektroaffinität des entsprechenden Flavins. Licht ist kein spezifischer Katalysator der Reaktion, und diese ist nicht auf Hydroxyalkyl-Substituenten beschränkt, wie man bisher annahm⁴²⁾. Die eigentliche Zerfallsreaktion wird katalysiert durch Metallionen (vgl. G, H)⁸⁾⁴³⁾, in manchen Fällen auch durch Basen, so z. B. bei 2-Iminoflavinen⁴⁵⁾ – analog dem Pyocyanin-Abbau in der Phenazin-Reihe⁴⁶⁾ – und durch CO-Reagentien. Aus der Summe dieser Beobachtungen ergibt sich, dass der Flavin-Abbau nicht in der Chinonstufe ablaufen kann.

Die Metallkatalyse der Desalkylierungsreaktion ist höchstwahrscheinlich spezifisch für solche Metallionen, die über ein Redoxpotential von der Größenordnung des Flavinpotentials verfügen. Der irreversible Schritt muss in der Abspaltung von CH_2O aus einem Azomethin-ähnlichen Zwischenprodukt (vgl. J) liegen. Wir schlagen im folgenden einen Mechanismus vor, der all diesen Befunden gerecht wird (vgl. Reaktionsschema II). Die stöchiometrische Bilanz lautet:



⁴²⁾ P. KARRER, H. SALOMON, K. SCHÖPP & E. SCHLITTLER, Helv. 17, 1165 (1934).

⁴³⁾ K. SAKAI, Nagoya J. med. Sci. 18, 222 (1956); Chem. Abstr. 50, 11828 (1956).

⁴⁴⁾ S. SHIMIZU, J. Vitaminology (Japan) 7, 39 (1955).

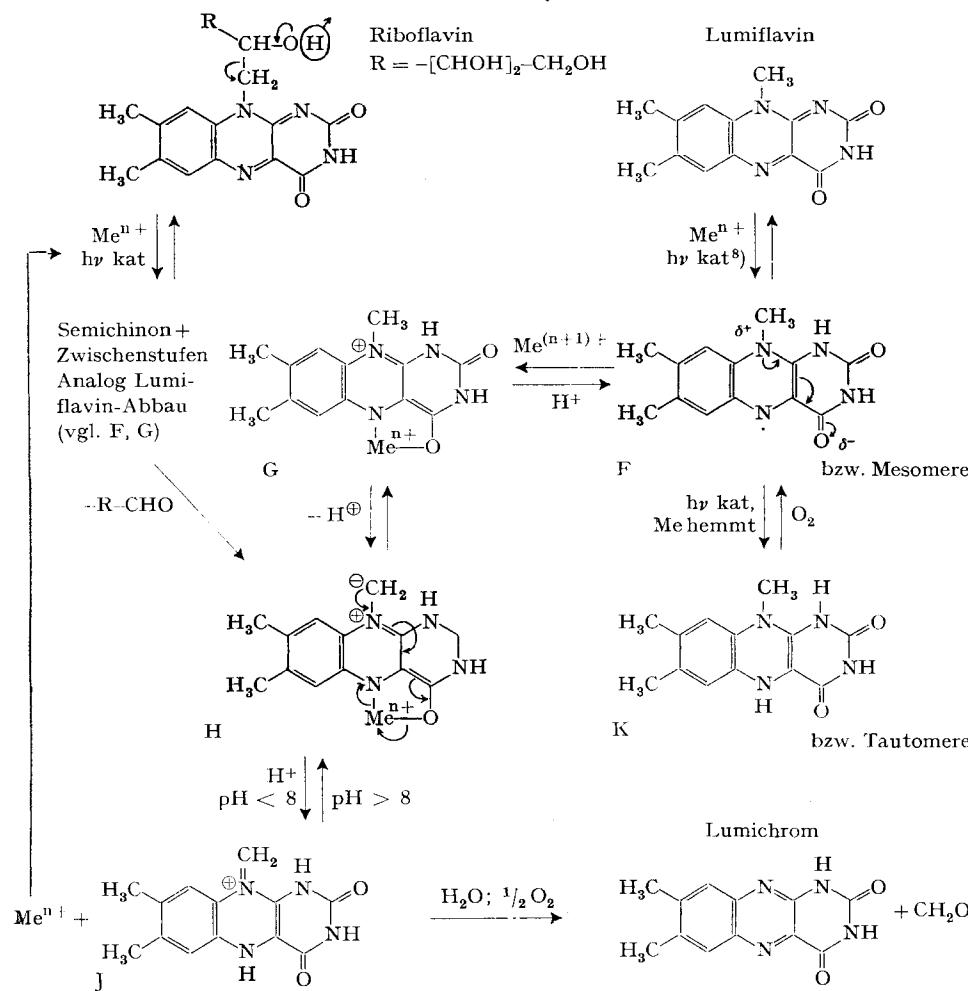
⁴⁵⁾ R. M. CRESWELL, A. C. HILL & H. C. S. WOOD, J. chem. Soc. 1959, 698.

⁴⁶⁾ F. WREDE & E. STRACK, Z. physiol. Chem. 177, 177 (1928).

Es handelt sich um eine «Fragmentierungsreaktion», wobei X für den (Iso)alloxazin-Rest steht. Dieser Reaktionstyp ist von C. A. GROB⁴⁷⁾ an mannigfachen Beispielen charakterisiert worden.

Reaktionsschema II

Zum Mechanismus des metallkatalysierten Flavin-Abbaus



Die zahlreichen Stoffe, welche den Flavin-Abbau hemmen³⁹⁾, lassen sich demzufolge einteilen in: a) überschüssige Oxydationsmittel, z. B. O_2 ; b) starke Reduktionsmittel, z. B. Reduktone; c) Radikal-Inhibitoren, z. B. Thioharnstoff; d) starke Charge-transfer-Komplexbildner, z. B. Tryptophan; und e) starke Metallkomplexbildner, z. B. Komplexon.

Alle diese Stoffklassen verschieben das Gleichgewicht $F \rightleftharpoons G$ zuungunsten des reaktiven Flavosemichinon-Metallkomplexes (G).

⁴⁷⁾ C. A. GROB, Experientia 13, 126 (1957).

Weitere Studien zur Kinetik dieser Prozesse und zur Stabilität der Zwischenprodukte sind im Gange.

Für diese Untersuchung standen Mittel des *Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung* zur Verfügung, für die wir auch an dieser Stelle herzlich danken möchten.

Wir sind zu Dank verpflichtet den Herren Prof. Dr. R. MECKE und cand. chem. G. NONNENMACHER, Freiburg i. B., für die präzise Aufnahme der IR-Spektren, der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, insbesondere Herrn Dr. W. PADOWETZ, Basel, für die sorgfältigste Ausführung der Mikroanalysen, vor allem der ZEISEL-Bestimmungen, sowie den Herren Prof. C. A. GROB, Prof. M. BRENNER und PD. A. MARXER, Basel, Drs. H. C. S. WOOD, Glasgow, und O. WEISSBACH, Frankfurt a. M., für wertvolle Diskussionen und Ratschläge.

Experimenteller Teil

Die Smp. wurden auf dem KOFLER-Block ermittelt und sind korrig., Fehler $\pm 2^\circ$. Zur Papierchromatographie und Spektrophotometrie vgl. 1). Zur Analyse wurden die Präparate, wo nicht anders erwähnt, 12 Std. bei $100^\circ/0,01$ Torr getrocknet.

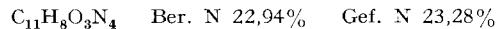
Reduktive Acylierung von (Iso)alloxazinen. — In Abänderung unserer früheren Vorschrift¹⁹⁾ suspendieren wir 1 Teil (Iso)alloxazin in 10–20 Teilen abs. HCOOH bzw. Eisessig/Acetanhydrid 1:1 und geben in der Siedehitze unter Röhren bis zu 1 Teil Zn-Staub in kleinen Portionen zu, bis die intermediaire Rhodo-Färbung nach 20–30 Min. einer hellen Gelb- und Grüntönung Platz gemacht hat. Nach weiteren 15 Min. bei Rückfluss wird siedendheiss filtriert. Aus dem Filterrückstand löst man die Zn-Salze mit Wasser heraus und trennt dann vom unverbrauchten Zn durch Eluieren mit kalter, zuletzt lauwärmer 2 n NH₄OH. Das essigsäure Filtrat wird im Vakuum so weit wie möglich eingedampft und der Rückstand mit Wasser bei 0° kristallisiert. Nach Filtration nimmt man die Kristalle mit dem obigen ammoniakalischen Eluat auf, versetzt bei möglichst niedriger Temperatur mit weiterer 2 n NH₄OH, bis fast alles gelöst ist, filtriert mit Kohle und fällt unter Kühlung durch Ansäuern mit konz. HCl gegen Kongo. Die nach 12-stdg. Stehen bei 0° reichlich abgeschiedenen farblosen Kristalle sind meist analysenrein. Gegebenenfalls kann die Umfällung wiederholt, oder aus Eisessig/Acetanhydrid kristallisiert werden. Ausbeuten 50–80%.

Die Acyl-leuko(iso)alloxazine werden schon bei kurzem Erwärmen in 6 bis 10 n Mineralsäuren hydrolysiert; aus der vorübergehend homogenen Lösung, die schnell karmin- bis violettrote Farbe annimmt, kristallisieren beim Abkühlen die semichinoiden Rhodo-(iso)alloxazin-Salze. Bei Zusatz weniger Tropfen Perhydrol werden die Rhodo-Verbindungen unter Aufhellung zu den Ausgangsprodukten rückoxydiert.

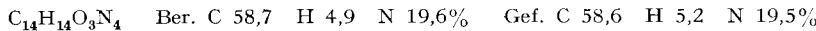
Beim Erwärmen der Acyl-leuko-Verbindungen in alkoholischer NaOH scheiden sich nach kurzer Zeit ebenfalls semichinoide Autoxydationsprodukte, die grünen bis olivfarbenen «Verdoflavine»⁵⁾ ab.

Die Acyl-leuko-Verbindungen haben im allgemeinen keine definierten Smp., sie zersetzen sich im Bereich von 300° langsam unter Rückbildung von (Iso)alloxazinen. Im einzelnen erhielten wir die folgenden neuen Verbindungen neben den schon früher beschriebenen¹⁹⁾:

5-Formylleukoalloxazin (XIIa) aus Alloxazin (Ia), farblose, zu Sternen geordnete Nadeln.

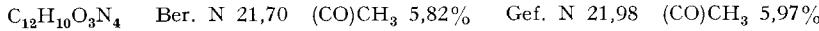


5-Formylleukolumiflavin aus Lumiflavin (IIb), schwach gelbstichige Stäbchen.

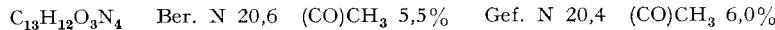


Die Formylverbindungen bilden NH₄-Salze, welche sich in kaltem Wasser nur schlecht lösen, wodurch die Reinigung erheblich erschwert wird.

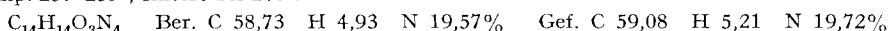
5-Acetyl-leukoalloxazin (XIVa) aus Alloxazin (Ia), hell cremefarbene Nadeln.



(1,3)-Methyl-5-acetyl-leukoalloxazin (Gemisch) aus (1,3)-Methyl-alloxazin-Isomerengemisch¹⁷⁾, schwach grünstichige Polyeder.

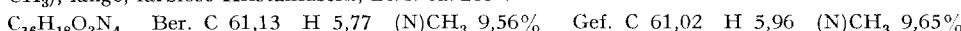


1,3-Dimethyl-5-acetyl-leukoalloxazin (XVa) aus 1,3-Dimethylalloxazin (IIIa), aus Äthanol Smp. 257–259°, sinteret bei 240°.



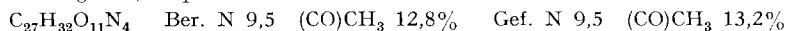
Bei der ZEISEL-Bestimmung ergibt diese Verbindung 0,3% «scheinbares» OCH_3 ²⁰.

3-Methyl-5-acetyl-leukolumiflavin (XIb, R' = CH_3) aus 3-Methylllumiflavin (IVb, R' = CH_3), lange, farblose Kristallfasern, Zers. ca. 285°.



Von den 9,65% gef. ($\text{N})\text{CH}_3$ reagieren 0,3% unter den Bedingungen der CH_3O -Bestimmung²⁰.

Pentaacetylleukoriboflavin aus Riboflavin oder Tetraacetylriboflavin⁴⁸). Diese Verbindung kristallisiert aus wässriger Suspension nicht. Man nahm daher nach Abdekantieren das abgesetzte Öl mit Tetrahydrofuran auf, filtrierte mit Kohle vom Ungelösten und engte das Filtrat im Vakuum scharf ein. Den hellgelben, ölichen Rückstand trocknete man bei 80°/0,01 Torr, wobei schaumige Kristallisation eintrat. Zur Analyse wurde zweimal aus Tetrahydrofuran/Iso-propyläther umgelöst; Smp. 155–156°.



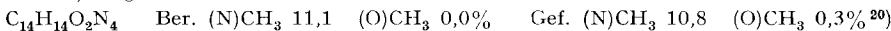
Tetraacetylriboflavin ist als Ausgangsmaterial vorzuziehen, da ke. e unvollständig acetylierten Nebenprodukte auftreten können, wodurch die Reinigung wesentlich erleichtert wird. Pentaacetylleukoriboflavin ist im Gegensatz zu Riboflavin und seinem Tetraacetyldeprivat sehr leicht löslich in Alkoholen, Eisessig, Aceton und Tetrahydrofuran. Auch die Wasserlöslichkeit wird durch die Leukoacetylierung merklich erhöht. Auch das bei saurer Hydrolyse unter Luftzutritt entstehende Tetraacetylrhodoriboflavin kristallisiert nicht.

Methylierung von (Iso)alloxazinen mit Dimethylsulfat in Dimethylformamid/ K_2CO_3 . – *Vorbemerkung:* Die Reaktion lässt sich so führen, dass man ausgehend von Alloxazinen ausschliesslich Gemische der (1,3)-Monomethyldeprivate erhält, so z. B. aus Ia mit 1 Äq. Dimethylsulfat und 1 Äq. K_2CO_3 1,3-Methylalloxazin-Gemisch, Smp. 330°, welches schon von PFLEIDERER¹⁷) auf anderem Weg erhalten und untersucht wurde. Für die Permethylierung ist das Arbeiten mit starkem Überschuss an Base bei über 100° erforderlich. Wir beschreiben das Verfahren im folgenden am Beispiel des *1,3-Dimethylalloxazins (IIIa)*:

Eine Suspension von 5 g Alloxazin (Ia) und 10 g K_2CO_3 in 80 ml abs. Dimethylformamid wird unter Rühren auf 100° erwärmt. Man lässt dann 20 ml $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$ / $(\text{CH}_3)_2\text{NCHO}$ -1:1-Gemisch langsam unter Röhren zutropfen, wobei sich das Gemisch tiefgrün färbt, offenbar infolge Bildung eines «Verdo»-Semichinons (vgl. ⁵). Mit Vervollständigung der Reaktion tritt wieder weitgehende Aufhellung ein. Nach ca. $\frac{1}{2}$ Std. wird die blassgrüne Suspension im Vakuum möglichst weit eingeeengt. Den Rückstand nimmt man mit kalter 2 n NH_4OH auf, filtriert, wäscht sorgfältig mit lauwarmem 1 n NaOH, Essigsäure, Aceton und Äther und trocknet: 4,1 g 1,3-Dimethylalloxazin (IIIa) in schwach grünstichigen Kristallen vom Smp. 243–245° (Lit. ¹⁸) 243°). Die Mutterlauge wird mit der Waschflüssigkeit vereinigt und mit Eisessig auf pH 6 gestellt. Im Laufe von 24 Std. bei 0° kristallisieren nochmals 0,3 g IIIa, zusammen 4,4 g (78%). Letzte färbende Verunreinigungen können durch Sublimation bei 230°/0,01 Torr abgetrennt werden. Die gelbe, stark grün fluoreszierende Mutterlauge wird mit NaCl gesättigt und erschöpfend mit CHCl_3 extrahiert. Aus dem Extrakt erhält man 0,1 g hellgelbes Kristallisat, welches sich auf Grund papierchromatographischer Auftrennung zu ungefähr gleichen Teilen aus farblosem, blau fluoreszierendem 1,3-Dimethylalloxazin (IIIa) und gelbem, grün fluoreszierendem 3,10-Dimethylflavin (IVa, R' = CH_3) zusammensetzt. Letzteres wurde durch Vergleich mit in eindeutiger Weise dargestelltem Material (vgl. unten) identifiziert. Die Ausbeute an Flavin beträgt somit maximal 1%⁴⁹.

In analoger Weise erhielten wir die folgenden Verbindungen:

1,3-Dimethylillumichrom (IIIb) aus Lumichrom (Ib), Smp. 254–256° (Lit.¹⁵) 252°), ohne Smp.-Depression mit authentischem, aus Tetramethylalloxantin (XXII) und symm.-o-Xylylen-diamin¹⁵) hergestelltem Material.



⁴⁸) R. KUHN & TH. WAGNER-JAUREGG, Ber. deutsch. chem. Ges. 66, 1577 (1933).

⁴⁹) K. G. STERN & E. R. HOLIDAY, Ber. deutsch. chem. Ges. 67, 1442 (1934), haben ebenfalls in sehr geringer Ausbeute Flavine aus Alloxazinen erhalten durch direkte Methylierung mit reinem Dimethylsulfat bei 120°. Die Reaktion ist ohne präparativen Wert.

1,3,7-Trimethyl-8-amino-alloxazin aus 7-Methyl-8-amino-alloxazin⁵⁰⁾, orangegelbe Stäbchen aus Dimethylformamid.

$C_{13}H_{13}O_2N_5$ Ber. C 57,5 H 4,9 (N)CH₃ 11,1% Gef. C 57,4 H 5,1 (N)CH₃ 11,4%

3,10-Dimethylflavin (IVa, R' = CH₃) aus 10-Methylflavin (IIa). Zur Abtrennung von Resten unveränderten Ausgangsmaterials extrahierte man IVa aus 2 n NaOH-Suspension mit CHCl₃. Die so erhaltenen gelben Kristallnadeln waren chromatographisch rein. Smp. (Zers.) 322° (Lit.⁴⁹⁾ 320–325°).

3,7,10-Trimethyl-8-amino-flavin aus 8-Nor-8-amino-lumiflavin³³⁾. Zur Abtrennung von Resten unveränderten Ausgangsmaterials wurde das Reaktionsprodukt auf dem Filter gut mit lauwärmer 2 n NaOH ausgewaschen; es war danach papierchromatographisch einheitlich und identisch mit authentischem Material³³⁾.

Alkylierung von 5-Acetyl-leuko(iso)alloxazinen. – 1 Teil Substanz wurde mit 2 Teilen K₂CO₃ in 10–20 Teilen abs. Dimethylformamid auf 80° erwärmt. Im Lauf von 10–20 Min. liess man darauf 2 Teile Dimethylsulfat-Dimethylformamid-1:4 langsam zutropfen. Man rührte weitere 30 Min. bei 80° und engte dann die meist hellgelbe, klare Lösung im Vakuum auf dem Wasserbad so weit wie möglich ein, nahm mit Eiswasser auf und liess 1 Std. bei 0° stehen. Die Aufarbeitung erfolgte wie in einzelnen beschrieben.

1,3,10-Trimethyl-5-acetyl-leukoflavin (VIIIa). 1. Ausgehend von 1 g 1,3-Dimethyl-5-acetyl-leukoalloxazin (XVa) erhielt man zunächst eine kristalline Abscheidung von 0,06 g verseiftem Ausgangsprodukt (IIIa), welche abfiltriert wurde. Das Filtrat extrahierte man erschöpfend mit CHCl₃. Der Extrakt ergab nach Auswaschen mit 1 n NH₄OH, Trocknung mit K₂CO₃ und Eindampfen ein fast farbloses Öl, welches beim Anreiben mit Aceton teilweise kristallisierte. Die kristalline Suspension wurde mit abs. Äther verdünnt und filtriert: 0,61 g (58% ber. auf Methyl-XVa), Smp. 180–186°. Aus der Mutterlauge kristallisierten im Laufe mehrerer Tage bei –10° weitere 0,2 g vom Smp. 165–175°. Die Hauptfraktion zeigte nach Kristallisation aus Toluol den Doppel-Smp. 180°/204–206°. Nach Sublimation bei 180°/0,01 Torr farblose Polyeder vom Smp. 208–211° konstant. Erneute Kristallisation des Sublimats aus Toluol ergab wieder den obigen Doppel-Smp.

$C_{15}H_{16}O_3N_4$ Ber. C 59,99 H 5,37 N 18,66 (CO)CH₃ 5,00%
Gef. „ 59,71 „ 5,53 „ 18,80 „ 5,2%

Die ZEISEL-Bestimmung (vgl. ²⁰⁾ und theor. Teil) zeigte ca. 0,5 Äq. OCH₃, welches auch nach Resublimation konstant blieb:

$C_{15}H_{16}O_3N_4$ Ber. 1 CH₃ 5,0 2 CH₃ 10,0 3 CH₃ 15,0%
Gef. (O)CH₃ 2,4; 2,6 (N)CH₃ 11,7; 11,6 (N+O)CH₃ 14,1; 14,2%

Es muss sich dennoch (vgl. theor. Teil) um das N,N,N-Trimethylderivat VIIIa handeln. Es zeigte mit dem ψ -Isomeren XVIa (aus XVa + CH₂N₂, vgl. unten) eine Smp.-Depression auf 165°. Dieser Misch-Smp. ist identisch mit dem Smp. der aus der Mutterlauge von VIIa erhaltenen Kristalle.

1,3,10-Trimethyl-5-acetyl-leukoflavin (VIIIa) ist mässig löslich in H₂O, gut in Alkoholen, Ketonen, Tetrahydrofuran und Chloroform, mässig in Toluol, unlöslich in Äther und Petroläther. Es bildet in wässriger Lösung keine Salze mit Säuren oder Basen.

VIIIa ist papierchromatographisch einheitlich. Die Entwicklung des Chromatogramms geschieht mit 4 n HCl, 10-proz. an H₂O₂, bei ca. 50°: Rotfärbung. Das saure, mit verd. H₂O₂ behandelte Hydrolysat von VIIIa ist papierchromatographisch frei von 1,3-Dimethylalloxazin (IIIa). Die aus der Mutterlauge von VIIIa erhaltenen Kristalle vom Smp. 165–175° ergeben dagegen IIIa bei der sauren Hydrolyse, Smp. und Misch-Smp. 243–245°, blaue Fluoreszenz im Papierchromatogramm.

2. Ausgehend von 2 g *5-Acetylleukolumiflavin (VIIb)* erhielt man eine fast farblose Kristallsuspension, welche man filtrierte; die Mutterlauge ergab bei der sauren Hydrolyse nur sehr wenig Flavin und wurde verworfen. Der Filterrückstand ergab nach Auswaschen mit eiskalter NH₄OH und verd. Essigsäure sowie Trocknung bei 20°/12 Torr über P₂O₅ 1,2 g (55% ber. auf Dimethyl-derivat von VIIb) farbloses Kristallgemisch, Smp. 220–226° (Zers.). Beim Umkristallisieren aus

⁵⁰⁾ K. GANAPATI, J. Indian chem. Soc. 15, 77 (1938).

Äthanol-Äther ändert sich der Smp. nicht. Die Analyse traf auf ein Dimethylderivat von VIIb zu, die ZEISEL-Bestimmung ergab neben N-Methyl einen Methoxyl-Gehalt von mehr als 1 Äq.

$C_{17}H_{20}O_3N_4$	Ber. C 62,18	H 6,14	N 17,06	(O)CH ₃ 4,58%
	Gef. „	61,90	„ 5,89	„ 17,07 „ 5,1; 5,2%

Nach zweimaliger Kristallisation aus Toluol erhielt man aus dem Rohgemisch schöne Nadeln vom konstanten Doppel-Smp. 232–237°/244–248° (Kristallumwandlung zu rhomboedrischen Prismen). Die Elementarzusammensetzung dieses Kristallisats (Xb, R' = CH₃) ist die gleiche wie die des Rohgemisches, die Gruppenbestimmung ergibt nunmehr genau 1 OCH₃ neben 2 NCH₃-Gruppen:

$C_{17}H_{20}O_3N_4$	Ber. C 62,18	H 6,14	N 17,06	(O)CH ₃ 4,58	(N+O)CH ₃ 13,74%
	Gef. „	62,42	„ 6,15	„ 17,02 „ 4,88 „	13,40%

Die Methylierung von VIIb mit CH₂N₂ (vgl. unten) ergab ein farbloses Kristallisat (60% ber. auf Dimethylderivat von VIIb), Smp. 230–235°, ohne Depression mit Xb, R' = CH₃. In allen übrigen Eigenschaften ist das Präparat identisch mit demjenigen, welches bei der Methylierung mit Dimethylsulfat/K₂CO₃ erhalten wurde; möglicherweise ist das Isomeren-Mischungsverhältnis leicht zugunsten von Xb verschoben.

3. Ausgehend von 0,4 g 5-Acetylleukolumiflavin (VIIb) erhielt man bei Reaktion mit *Diäthylsulfat* anstelle von Dimethylsulfat eine ölige Suspension, die man mit CHCl₃ extrahierte. Der nach Trocknung und Einengung des Extraktes erhaltene ölige Rückstand wurde mit Äthanol aufgenommen und nach Zusatz von H₂O bis zur beginnenden Trübung über Nacht bei 0° stehen gelassen. Man erhielt so 0,25 g eines farblosen Kristallisats, welches nach Trocknung bei 20°/12 Torr über P₂O₅ bei ca. 110° sehr unscharf schmolz. Nach zweimaliger Kristallisation aus Isopropyläther/Petroläther farblose Polyeder vom konstanten Smp. 153–155°, auf Grund von Elementar- und Gruppen-Analyse O, O-Diäthylderivat von VIIb (IXb, R' = C₂H₅). Ausbeute 53%.

$C_{19}H_{24}O_3N_4$	Ber. C 64,02	H 6,79	N 15,72	(O)C ₂ H ₅ 16,30	(N)CH ₃ 4,22%
	Gef. „	63,97	„ 6,73	„ 15,84 „ 16,43; 16,29 „ 3,90%	

4. Ausgehend von 0,2 g 5-Acetyl-8-nor-8-acetylaminol-lumiflavin³⁹⁾ erhielt man mit Dimethylsulfat eine Kristallsuspension, welche filtriert wurde. Nach Kristallisation aus Äthanol erhielt man 0,13 g (60%) eines Dimethylderivates vom Smp. 265–268°, bei welchem es sich der Gruppenanalyse zufolge wohl ebenfalls um ein (O, N)-Isomerengemisch handelte:

$C_{18}H_{21}O_4N_5$	Ber. C 58,2	H 5,7	N 18,9	(O)CH ₃ 4,0	(N+O)CH ₃ 12,1%
	Gef. „	57,7	„ 6,1	„ 18,5 „ 5,8; 6,3 „ 11,8; 12,0%	

Das Gemisch liess sich durch Kristallisation nicht gut trennen und wurde daher nicht weiter untersucht.

3-Äthyllumiflavin (IVb, R' = C₂H₅). Die von KUHN & RUDY¹⁴⁾ angegebene Alkylierung des Lumiflavins (IIb) wurde mit Dimethylsulfat und Diäthylsulfat nachgearbeitet. Wir geben hier die Vorschrift für die Äthylierung als Beispiel: 0,21 g Lumiflavin (IIb) wurden in 10 ml 1 N NaOH gelöst und mit 10 ml Diäthylsulfat/Äthanol-(1:10) versetzt. Bei 0° verlief die Reaktion der papierchromatographischen Kontrolle zufolge nur sehr langsam. Man schüttelte daher 5 Std. bei 20° unter Luftausschluss, wobei starke Dunkelfärbung beträchtliche Zersetzung anzeigen. Nach Abdampfen des Äthanols im Vakuum extrahierte man die dunkle alkalische Suspension erschöpfend mit CHCl₃. Beim Eindampfen des gelben, stark grün fluoreszierenden Extraktes kristallisierten 25 mg (11%) reines 3-Äthyllumiflavin (IVb, R' = C₂H₅), Smp. ca. 283°, subl. > 260°. Aus der wässrigen Phase konnte man durch Ansäuern mit Eisessig 0,1 g kristallines Lumiflavin (Smp. 322° (Zers.), subl. nicht) zurückgewinnen. Bei Erhöhung der Reaktions temperatur sinkt die Ausbeute infolge Hydrolyse weiter ab.

3-Methyllumiflavin (IVb, R' = CH₃) wurde nach der gleichen Methode mit Dimethylsulfat und NaOH (vgl. oben) in 21-proz. Ausbeute gewonnen. Zum Vergleich wurde 3-Methyllumiflavin direkt synthetisiert: 1 g N-Methylbarbitursäure wurde analog einer früher von uns für Lumiflavin angegebenen Vorschrift⁵¹⁾ mit N,3,4-Trimethyl-6-(p-carboxyphenyl-azo)-anilin⁵¹⁾ umgesetzt. Man erhielt 1,1 g (58%) kristallines, chromatographisch reines 3-Methyllumiflavin, Smp.

⁵¹⁾ P. HEMMERICH, S. FALLAB & H. ERLENMEYER, Helv. 39, 1242 (1956).

283° (Lit.¹⁴) 286°), papierchromatographisch identisch mit dem durch Methylierung von Lumiflavin erhaltenen Produkt.

Methylierung von 5-Acetyl-leuko(iso)alloxazinen mit CH₂N₂. ~ 0,2 g Leukoverbindung wurden in 50 ml abs. Methanol suspendiert. Bei 30–40° liess man unter Röhren so lange ätherische Diazomethan-Lösung zufließen, bis die Gelbfärbung ca. 15 Min. bestehen blieb. Dabei entstand meist eine homogene Lösung. Nach dem Eindampfen extrahierte man den ölichen Rückstand mehrfach mit warmem Petroläther.

Aus 1,3-Dimethyl-5-acetyl-leukoalloxazin (XVa) erhielt man so ein gelbliches Öl, aus welchem sich in Aceton/Äther 0,05 g Kristalle abschieden; nach Kristallisation aus Toluol/Petroläther, Smp. 177–181° konstant. Nach der Analyse handelt es sich um das *O,N,N-Trimethyl-derivat XVIa*.

C ₁₅ H ₁₆ O ₃ N ₄	Ber. C 60,0	H 5,4	N 18,7	(O)CH ₃ 5,0	(N+O)CH ₃ 15,0	(CO)CH ₃ 5,0%
	Gef. „ 60,6	„ 5,9	„ 18,3	„ 4,8	„ 14,9	„ 5,4%

Der Misch-Smp. mit dem N,N,N-Isomeren VIIIa liegt bei 165–175°. XVIa wird durch kurzes Erwärmen mit 6 n HCl und Zugabe von H₂O₂ bis zur Entfärbung nahezu quantitativ in 1,3-Dimethylalloxazin (IIIa) übergeführt, welches in schön kristalliner, papierchromatographisch reiner Form ausfällt, Smp. und Misch-Smp. mit authentischem IIIa 243–245°.

Aus 3-Methyl-5-acetyl-leukolumiflavin (XIb) erhielt man analog 0,13 g (60%) farblose Kristalle, welche in Smp., Misch-Smp. und dem papierchromatographischen Verhalten des Hydrolysats mit dem oben schon beschriebenen Xb übereinstimmten.

1,3,10-Trimethyl-leukoflavin (Va). – 1,0 g 1,3,10-Trimethyl-5-acetyl-leukoflavin (VIIIa) wurde in 20 ml 1 n HCl auf dem Wasserbad erwärmt, bis nach ca. 5–10 Min. fast alles unter geringer Rotfärbung in Lösung gegangen war. Beim Abkühlen schieden sich sofort gelbe Kristalle reichlich ab, nach 1 Std. bei 0° 0,48 g; nach Kristallisation aus Äthanol schöne ocker-gelbe Blättchen vom Smp. 176–178°. Ebenso wie bei VIIIa findet sich auch hier bei der Gruppenbestimmung ca. 0,5 Äq. «scheinbares» OCH₃.

C ₁₈ H ₁₄ O ₂ N ₄	Ber. C 60,45	H 5,46	O 12,39	(CO)CH ₃ 0,0	1 CH ₃ 5,8	3 CH ₃ 17,4%
	Gef. „ 60,27	„ 5,50	„ 12,54	„ „	0,5 (O)CH ₃ 2,6	(N+O)CH ₃ 16,3%

Die nicht ganz quantitative Erfassung der Methylgruppen ist in Anbetracht des komplexen radikalischen Zerfallsmechanismus von Va nicht erstaunlich.

Reaktionen von Va. – 1. 0,2 g Va wurden mit 5 ml Acetanhydrid 10 Min. auf dem Wasserbad erwärmt. Man filtrierte die bräunliche Lösung heiß mit Kohle und dampfte im Vakuum ein. Der Rückstand kristallisierte beim Aufnehmen mit Aceton teilweise: 0,06 g schwach bräunliche Stäbchen, nach Sublimation bei 180°/0,01 Torr schwach gelbliche Polyeder vom Smp. 207–211°, ohne Depression mit VIIIa.

2. 0,1 g Va wurden in 3 ml 6 n HCl unter N₂ 5 Min. auf 80° erwärmt. Nach dem Abkühlen neutralisierte man vorsichtig unter Kühlung mit NH₄OH auf pH 5–6, wobei sich aus der rotbraunen Lösung 0,04 g farblose Kristallstäbchen abschieden, welche sich in 1 n HCl und ges. NaHCO₃-Lösung unter Salzbildung lösten. Beim Erwärmen der sauren Lösung unter Luftzutritt erhält man wieder Rotfärbung, ebenso beim Lagern der Kristalle an der Luft im Lauf von mehreren Tagen. Nach Trocknung bei 20°/0,01 Torr, Smp. 192–193° unter vorübergehender Violettfärbung und Gasentwicklung (Decarboxylierung). Die Analyse passt auf 1,4-Dihydro-1-methyl-2-(N,N'-dimethylureido)-chinoxalin-3-carbonsäure (Vc).

C ₁₈ H ₁₆ O ₃ N ₄	Ber. C 56,5	H 5,8	N 20,3	(N)CH ₃ 16,2	(O)CH ₃ 0,0%
	Gef. „ 55,9	„ 5,9	„ 20,4	„ 15,7	„ 0,1%

Dieselbe Verbindung erhält man direkt aus VIIIa durch Hydrolyse in 6 n HCl.

3. Die Autoxydation von Va lässt sich in neutraler Lösung (Toluol, 10⁻⁴ molar) spektrophotometrisch gut verfolgen. Die zuerst farblose Lösung ist nach 6–8 Std. bei 20° tiefblau und verblasst wieder im Laufe mehrerer Tage (vgl. Fig. 7). In saurer Lösung ist die Autoxydation noch langsamer. Eine Rhodosemichinon-Lösung lässt sich am leichtesten durch Zusammengaben äquimolarer Lösungen von Va und Riboflavin in HCOOH einstellen.

Durch Zusatz von H₂O₂ wird Rhodo-Va entfärbt, unter Bildung von Zersetzungprodukten, die sich beim Neutralisieren weiter verändern und noch nicht identifiziert werden konnten.

10-Desalkylierung von Flavinen mit NH₂OH. – 1. 0,5 g Lumiflavin (IIb) wurden mit 0,5 g Hydroxylaminsulfat in 100 ml Eisessig 5 Tage bei Rückflusstemperatur gehalten. Die papierchromatographische Kontrolle der Reaktion zeigte danach nur noch sehr wenig IIb. Man engte im Vakuum bis fast zur Trockne ein, nahm mit Wasser auf und filtrerte. Der fast farblose Rückstand (0,22 g, 47%) bestand aus papierchromatographisch fast reinem Lumichrom (Ib). Zur letzten Reinigung wurde das charakteristische schwerlösliche, tiefgelbe Na-Salz aus heißer 1 n NaOH kristallisiert und daraus die Säure mit Eisessig wieder freigesetzt.

C ₁₂ H ₁₀ O ₂ N ₄	Ber. C 59,50	H 4,16	N 23,13	(N)CH ₃ 0,00%
	Gef. „	59,62	„	4,36 „ 23,13 „ 0,00%

Im Parallelversuch ohne Zusatz von Hydroxylaminsulfat findet man papierchromatographisch nur Spuren von Lumichrom (Ib) neben unverändertem IIb. Zum Vergleich wurde Ib aus *symm.-o-Xylylen-o-diamin* und Alloxan¹⁵⁾ hergestellt.

2. Analog erhielt man aus 0,1 g 3-Methylumiflavin (IVb, R' = CH₃) 0,045 g 3-Methylumichrom (47%), schöne schwach gelbliche Stäbchen aus H₂O.

C ₁₃ H ₁₂ O ₂ N ₄	Ber. N 21,87	(N)CH ₃ 5,87%	Gef. N 21,87	(N)CH ₃ 6,10%
---	--------------	--------------------------	--------------	--------------------------

Ebenso wie Lumichrom (Ib) ist das 3-Methylderivat mit gelber Farbe in NaOH löslich und kristallisiert dann als Na-Salz. Die neutrale, wässrige Lösung zeigt intensiv blaue Fluoreszenz.

3. Weiterhin erhielt man aus 0,050 g 10-Methylflavin (IIa) 0,038 g Alloxazin (Ia) (81%), papierchromatographisch identisch mit authentischem Material.

Kondensation von 1 - Methylamino - 2 - amino - 4,5 - dimethyl - benzol (XXXIII) mit Tetramethylalloxantin (XXII). – 0,5 g N,3,4-Trimethyl-6-nitranilin⁵²⁾⁵³⁾ wurden in 20 ml Eisessig bei 20°/740 Torr mit Pd-Kohle hydriert. Die vom Katalysator filtrierte Lösung wurde unter N₂ mit einer Suspension von 0,5 g Tetramethylalloxantin (XXII)⁵⁴⁾ und 0,2 g H₃BO₃ in 10 ml Eisessig⁴¹⁾ vereinigt. Man schüttelte über Nacht unter N₂ und erwärmt dann 1 Std. unter N₂-Spülung auf dem Wasserbad. Nach dem Abkühlen wurde die olivfarbene Lösung mit wenig Kohle filtriert und mit einem gleichen Vol. 2 n HCl versetzt, wobei Farbumschlag nach tiefrot eintrat. Beim Eindampfen der Lösung im Vakuum setzte Kristallisation von ockerfarbenen Stäbchen ein. Nach dem Stehen über Nacht bei 0° erhielt man 0,27 g Kristalle, welche sich in verd. Säuren mit tiefroter «Rhodoflavin»-Farbe lösen. In HCOOH liegt das langwellige Abs.-Max. bei 506 mμ, vergleichsweise 3-Methyl-rhodolumiflavin 503 mμ, 1,3-Dimethyl-rhodolumichrom 504 mμ. Die Vergleichsmessungen wurden in 0,01 n SnCl₂-HCOOH-Lösung ausgeführt. In diesem Milieu gehen die genannten (Iso)alloxazine bei kurzem Erwärmen in die Rhodoform über, welche längere Zeit haltbar ist. Aus der Lit.⁷⁾ ist ferner das Abs.-Max. des Rhodoflavin-mononucleotids in 1 n HCl bekannt (503 mμ). Eine Differenzierung der Rhodo(iso)alloxazine schien uns daher spektrophotometrisch nicht möglich.

Die erhaltenen Kristalle schmelzen unter Zers. unscharf ab 220° und zersetzen sich auch schon beim Trocknen im Vakuum. Die Zersetzung wird vollständig bei kurzem Erwärmen der roten salzauren Lösung mit einigen Tropfen Perhydrol. Nach der Entfärbung kristallisiert beim Abkühlen reines 1,3-Dimethylumichrom (IIIb), Smp. 254–256° (Lit.¹⁵⁾ 252°), ohne Depression und papierchromatographisch identisch mit authentischem Material (vgl. oben).

10 - Desalkylierungs - Nebenreaktion bei der Flavinsynthese nach KUHN³⁸⁾^{41).} 1. *10-Methylflavin-7-sulfosäure (XXVI)*⁵⁵⁾: Reinstes N-Methyl-o-nitranilin-p-sulfosaures Ammonium stellten wir durch Umsetzung von o-Nitrochlorbenzol-p-sulfosäure mit reinstem Methylaminhydrochlorid und Na-Methylat in Methanol bei 120° im Autoklav her. Zur Reinigung wurde zweimal aus konz. Ammoniumacetatlösung kristallisiert.

C ₇ H ₁₁ O ₅ N ₃ S	Ber. C 33,7	H 4,5	(N)CH ₃ 6,03%	Gef. C 34,2	H 4,7	(N)CH ₃ 6,22%
--	-------------	-------	--------------------------	-------------	-------	--------------------------

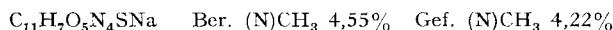
⁵²⁾ R. KUHN & F. WEYGAND, Ber. deutsch. chem. Ges. 67, 1459 (1934).

⁵³⁾ P. HEMMERICH, Helv. 41, 514 (1958).

⁵⁴⁾ A. C. COPE, D. HEYL, D. PECK, C. EIDE & A. ARROYO, J. Amer. chem. Soc. 63, 356 (1941).

⁵⁵⁾ Wir erwähnten die Darstellung dieser Verbindung schon früher³⁾. Schon damals beobachteten wir das Auftreten von demethyliertem Nebenprodukt, ohne jedoch sicher zu sein, ob nicht eine Verunreinigung des Ausgangsprodukts vorlag. Dies veranlasste uns zur vorliegenden genaueren Untersuchung der Reaktion.

0,5 g dieses Nitrokörpers hydrierten wir bei 20°/740 Torr mit Pd-Kohle (Ber. 147 ml H₂, gef. 145 ml H₂) und setzten das so erhaltene Diamin wie früher angegeben³⁾ mit Alloxan um. Das rohe Reaktionsprodukt (0,4 g) besteht zu ungefähr gleichen Teilen aus Alloxazin-(XXV) und Isoalloxazin-sulfosäure (XXVI), wie die papierchromatographische Kontrolle zeigte. Das Gemisch lässt sich leicht durch fraktionierte Kristallisation aus verd. NaCl-Lösung trennen. Nach zwei Kristallisationen enthält die schwerlösliche, fast farblose Fraktion nur noch 0,8% (N)CH₃, ber. 4,6%. Nach einer weiteren Kristallisation ist das Produkt papierchromatographisch rein und identisch mit authentischer *Alloxazin-7-sulfosäure* (XXV)³⁾. Aus den Mutterlaugen lässt sich auch das leichter lösliche gelbe Na-Salz der 10-Methylflavin-7-sulfosäure (XXVI)³⁾ durch wiederholte Kristallisation rein erhalten:



2. *10-Methylflavin (IIa)*⁵⁶⁾: Führt man die von KUHN & WEYGAND erstmals beschriebene Synthese statt in HCl in Eisessig unter Luftausschluss durch, so erhält man analog zum vorstehend beschriebenen Fall ein Gemisch von 10-Methylflavin (IIa) und Alloxazin (Ia), welch letzteres sich auf Grund der Schwerlöslichkeit seiner Alkalalisalze leicht abtrennen lässt.

Der Desalkylierungseffekt findet sich hingegen nicht bei der Synthese von Flavinen, die im aromatischen Kern positiv substituiert sind, insbesondere nicht bei der Riboflavin- und Lumiflavin-Synthese nach KUHN (vgl. ³⁸⁾⁴¹⁾⁵³⁾ und dort zit. Lit.).

SUMMARY

The complex alkylation reactions of leucoflavin derivatives are shown to give O-substituted products of a new type rather than N-substituted ones. Characteristic differences in the chemical behaviour of (iso)alloxazines and of their leuco-compounds are outlined. Stabilization and decomposition of flavosemiquinones have been further studied. It is shown, that flavin catabolism (N-10-dealkylation) occurs in the semiquinonoid state at room temperature, and is neither confined to hydroxyalkyl-flavins, nor to specific catalysis by light. Based upon these and recent findings of other authors, a new mechanism of metal-catalysed flavin catabolism is proposed. 1,3,10-Trimethyl-leucoflavin was prepared and found to give a stabilized monomeric semiquinone on oxidation.

Anstalt für anorganische Chemie der Universität Basel

⁵⁶⁾ R. KUHN & F. WEYGAND, Ber. deutsch. chem. Ges. 67, 1409 (1934).
