

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

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

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

ZUSAMMENFASSUNG

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

Heinz Kastien, Gasshof
6014 Littau/Luzern

LITERATURVERZEICHNIS

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

273. Thione, Imine, Oxime und Azine des Riboflavins Nucleophile Substitutionsreaktionen am Flavinkern¹⁾

Studien in der Flavinreihe, 10. Mitteilung²⁾

von F. Müller³⁾ und P. Hemmerich

(12. VIII. 66)

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

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

²⁾ Vorläufige Mitteilung: [1]; 9. Mitteilung dieser Reihe vgl. [9].

³⁾ Derzeitige Adresse: Medicinska Nobelinstitutet, Biokemiska avdelningen, Solnavägen 1, Stockholm 60, Schweden.

⁴⁾ Teilauszug aus der Diss. F. MÜLLER, Basel 1964.

unter anderem darauf zurückzuführen, dass für Studien am proteinfreien Flavin-Modell nur äusserst hydrophile Flavinderivate zur Verfügung standen, nämlich Flavinmononucleotid (FMN), Flavinadenindinucleotid (FAD) und Riboflavin (Vitamin B₂). Demgegenüber ist aber das Aktivzentrum vieler, wenn nicht der meisten Flavinproteine als eher lipophiles Milieu anzusprechen: Dies kommt zum Beispiel drastisch beim Spektrum der Dihydroliponamid-Dehydrogenase (vgl. z. B. [3]) zum Ausdruck, welches mit dem Spektrum des in Chloroform gelösten Flavin-Chromophors identisch ist, jedoch von demjenigen in wässriger Lösung stark abweicht [4].

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

In Weiterverfolgung unserer Vorarbeiten [5–7] konnten wir nun beliebige Reste in den Pyrimidonteil des Flavinkerns (I) in 2- und 4-Stellung einführen, und zwar sowohl in der Lumiflavin-Reihe (I, R'' = CH₃) wie in der Riboflavin-Reihe (I, R'' = Ribityl). Diese Synthesen werden derzeit auf die Flavinmononucleotid-Reihe (I, R'' = Ribityl-5-phosphat) ausgedehnt [8].

In der vorliegenden Arbeit werden die Synthesen und chemischen Eigenschaften dieser neuen Flavine beschrieben. Ihre optischen Daten haben wir schon gemeinsam mit DUDLEY & EHRENBURG [9] mitgeteilt und interpretiert; weiterhin wurde mit MCCORMICK & ARSENIS [10] über ihre enzymatische Phosphorylierung berichtet. Untersuchungen sind im Gange über die aus der Elektronenspinresonanz-Hyperfeinaufspaltung abzuleitenden Strukturen der analogen Flavosemichinone⁵⁾ sowie über die Elektronenspinresonanz der zugehörigen Flavochinon-Triplettzustände [11]. Die neuen Flavine eignen sich vornehmlich zum Studium der Metallchelate der analogen Flavosemichinone (diesbezügliche optische Daten, s. Übersicht in [12]).

Unsere Synthesen gehen von den tiefroten Thioflavinen II₂ und II₄⁶⁾ aus. II₂ wird durch Kondensation aus 2-Thiobarbitursäure erhalten [5], II₄ durch selektive Sulfhydrierung von I. Beide Thioflavine werden leicht oxydativ unter quantitativer Rückbildung von I entschweifelt (s. Formelschema).

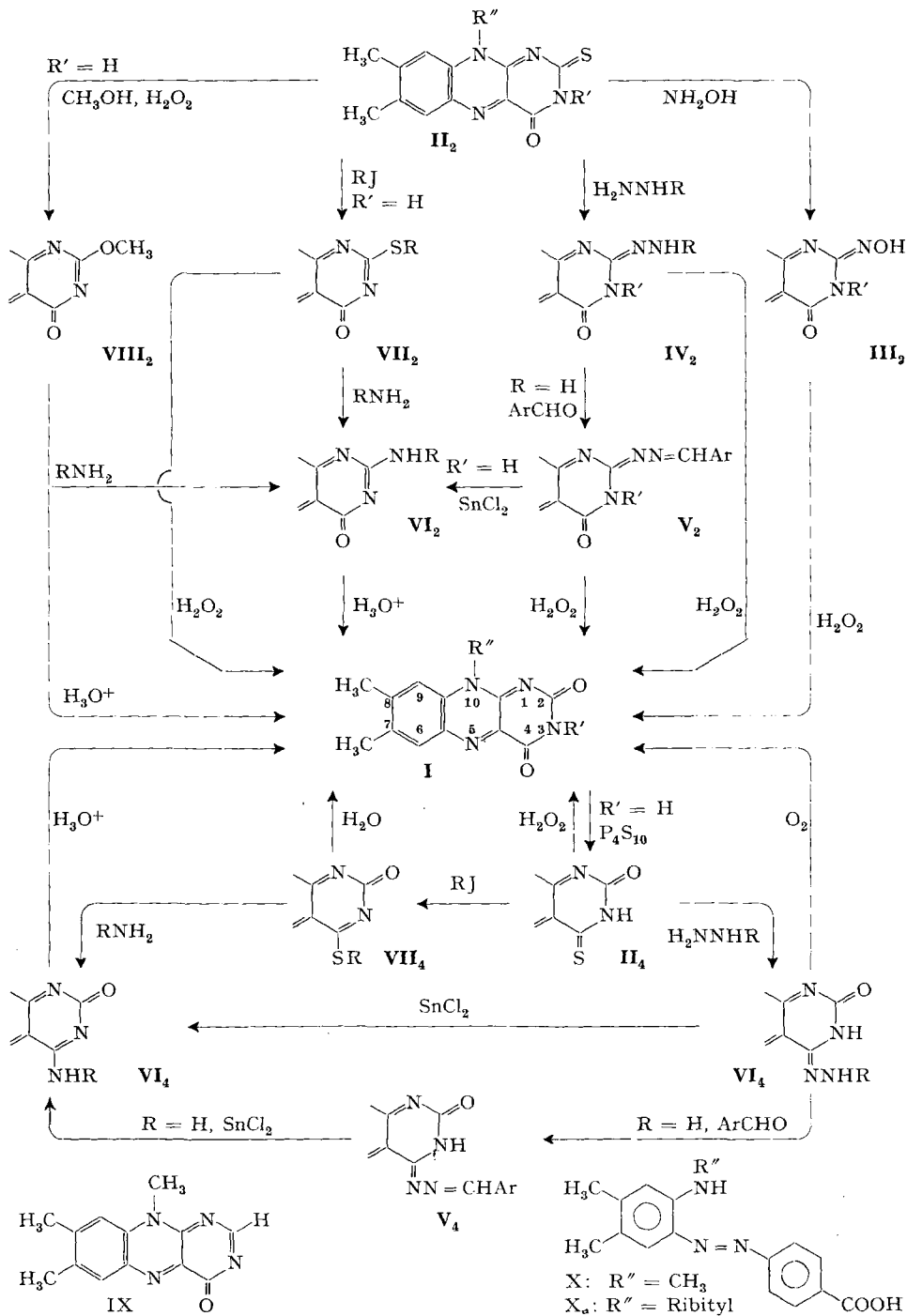
Hydroxylamin und Hydrazine H₂NNR₂ ersetzen den Schwefel in II unter Bildung der Flavoxime III und Flavohydrazone IV, welche letztere im Falle R = H mit Aldehyden die Flavazine V ergeben. Alle diese Flavin-Derivate sind als Neutralkörper tiefviolett bis blau gefärbt. III und IV sind nur in Form ihrer Salze beständig: Die freien Basen disproportionieren sich langsam, was darauf schliessen lässt, dass es sich um eine Hydridverschiebung aus der Oxim- resp. Hydrazon-Gruppe in den Kern handelt, wonach der Kern autoxydiert und der Substituent durch Hydrolyse entfernt wird unter Rückbildung von I. Die Azine V und die Hydrazone IV lassen sich mit SnCl₂ in Salzsäure zu den Iminen VI (R = H) reduzieren.

Die Thione II₂ reagieren, anders als mit CO-Reagentien, mit «harten» Basen [13] wie z. B. Ammoniak nur schlecht. Die Umsetzung wird jedoch möglich, wenn man die

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

⁶⁾ Zur Erklärung der Formelnummern, z. B. IV_{2a}, vgl. Legende des Formelschemas.

Formelschema

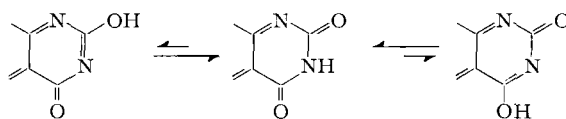


Das Formelschema ist so abgefasst, dass möglichst viele analoge Verbindungen durch die gleiche Formel ausgedrückt werden können. Die Indices 2 und 4 kennzeichnen den Substitutionsort an den betreffenden Flavinen, die Indices a, b, c kennzeichnen die Substituenten in 3- und 10-Stellung: a = Lumiflavinderivat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

Thione II zuvor in die entsprechenden Thioester VII überführt. Diese Alkylierungen verlaufen unter Ausschluss von Wasser bei Raumtemperatur und im Falle von II_2 sogar ohne Basenkatalyse. Dabei tritt bei II_2 entgegen früheren Annahmen [6] aus unserem Laboratorium⁷⁾ keine N(3)-Alkylierung ein. 3-Alkylderivate, z. B. II_{2a} , lassen sich jedoch durch direkte Kondensation aus 1-Methyl-2-thiobarbitursäure gewinnen.

Die Thioester VII, die S-Alkylthioflavine oder Alkylmercapto-desoxyflavine darstellen, sind die ersten stabilen Flavine mit einer streng einwertigen Funktion im Pyrimidin-Teil. Aus derselben Verbindungsreihe haben wir inzwischen auch O-Alkylflavine VIII_2 [14] [15] erhalten, ferner haben wir das Desoxyflavin IX_2 [15] dargestellt. Alle diese Flavinderivate sind durch ihre Basizität gekennzeichnet: Schon in verdünnter Essigsäure sind sie vollständig protoniert und können daher von den spektral ähnlichen Stammkörpern I leicht unterschieden werden. Wir bezeichnen sie als «aktive» Flavine, da die Flavin-OR- resp. Flavin-SR-Gruppen wie aktive Ester reagieren.

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



sehr gross sein muss. Iminol-Tautomere liefern somit zur Struktur der Flavochinone⁵⁾ keinen Beitrag.

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

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

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

Experimenteller Teil

1. Allgemeines

1.1. *Zur Dünnschichtchromatographie*: Als chromatographisch rein wurden Substanzen angesehen, die im Sichtbaren und im UV. nur einen einzigen Fleck zeigten. Als chromatographisch identisch wurden Substanzen gleicher Farbe und Fluoreszenz betrachtet, wenn sie in mindestens 3 Fliessmittelgemischen den gleichen Rf-Wert zeigten. Als stationäre Phase wurde MN-Kieselgel S⁸) verwendet.

Angewandte Fliessmittelgemische: A: *n*-Butanol/Eisessig/Wasser = 6:2:2; B: *n*-Butanol/Äthanol/Wasser = 6:2:2; C: *n*-Butanol/Äthanol/2N NH₃ = 6:2:2.

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

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

1.4. *Dissoziationskonstanten*: Die pK_a -Werte wurden in 0,1N NaClO₄ bei 20° ± 1° durch Titration mittels eines METROHM-Combitrators mit Glaselektrode XU 100 bestimmt.

2. Synthesen

2.1. *2-Thiolumiflavin (II_{2a})*: Modifikation der Lit.-Vorschrift [5]. In einen 500-ml-Sulfierkolben mit Rührer, Kühler, Kontaktthermometer und N₂-Zuführung werden 150 ml Eisessig und 4 g Azosäure X [5] eingeführt und mit einem Thermostat auf 53° vorgewärmt. Nach 5 Min. gibt man 3 g 2-Thiobarbitursäure (FLUKA, St. Gallen) zu und lässt 3 Std. reagieren. Hierauf filtriert man das Gemisch noch warm, wäscht den Niederschlag mit wenig Eisessig und Äther und trocknet 3 Std. im Vakuum; 4,0 g braunviolett Pulver, Zersetzung bei 238°. Dünnschichtchromatogramm A zeigte 2 Komponenten, X und II_{2a}, in ungefähr gleichen Teilen. II_{2a} ist im System A violett, ohne Fluoreszenz, beim Stehen an der Luft gelb (autox. Entschwefelung), mit grüner Fluoreszenz. Aus dem Filtrat lässt sich durch Zufügen von 10 ml 60-proz. HClO₄ nach 12stündigem Stehen bei 0° 0,6 g Azosäure-perchlorat (X-Perchlorat) in schönen violetten Kristallen zurückgewinnen.

2 g der Verbindung (X + II_{2a}) werden mit 50 ml 100-proz. HCOOH auf 50–60° erwärmt. Die klare rotbraune Lösung versetzt man mit dem gleichen Volumen Äther und lässt zunächst bei 0°, dann bei –15° stehen. Man filtriert die ausgeschiedenen rostbraunen Nadeln ab und wäscht sie gut mit Äther; 0,9 g II_{2a}-Formiat, welches bei 200° HCOOH verliert und sich bei 300° zersetzt. Aus der Mutterlauge scheiden sich nach Zufügen von 5 ml 60-proz. HClO₄ und 12stündigem Stehen bei 0° 1,2 g X-Perchlorat ab: Gesamtausbeute an II_{2a} = 73% d. Th. bezogen auf verbrauchte Azosäure X.

Die Base wird aus dem Salz durch Digerieren mit NaHCO₃ aq. in rotvioletten Nadeln erhalten. Sie löst sich gut in Chloroform und in wässrigen Basen, ist mässig löslich in Alkoholen und Eisessig und unlöslich in Äther. IR-Spektrum: ν NH(3) 3060; ν CO(4) 1710 cm⁻¹; kein ν CO (2).

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

C₁₃H₁₂ON₄S, HCOOH (318,4) Ber. N 17,6 S 10,0% Gef. N 17,2 S 9,7%

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

⁸) Produkt der MACHEREY, NAGEL & Co., 516 Düren (Deutschland).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.5. *2-Oximinolumiflavin* (III_{2a}): 1 g II_{2a} und 1,5 Äq. Hydroxylamin-hydrochlorid werden in 70 ml abs. Dimethylformamid gelöst und mit 1 ml Triäthylamin versetzt. Man erwärmt kurz auf 50°, lässt 4 Std. bei Raumtemperatur stehen und filtriert hierauf vom gebildeten Niederschlag ab: 0,9 g (94%) violettes Pulver, das aus Alkohol/20-proz. $HClO_4$ III_{2a} -Perchlorat in gelben hygroscopischen Polyedern liefert.

Spektren: in 2N HCl (als Kation): λ_{max} 456, 382, 274 nm
in $CHCl_3/Et_3N$ (99:1): λ_{max} 526, 294 nm

$C_{13}H_{13}O_2N_5 \cdot HClO_4$	Ber. C 42,0	H 3,8	N 18,8	Cl 9,5%
(371,8)	Gef. „ 42,2	„ 3,7	„ 18,8	„ 9,4%

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

2.6. *2-Lumiflavinhydrazon* (IV_{2a} , $R = H$): Eine Lösung von 2 g VII_{2a} in 70 ml Dimethylformamid und 4 ml Hydrazinhydrat wird 3 Std. bei Raumtemperatur in einer Schliffbirne geschüttelt, danach mit gleichem Volumen Äther versetzt und filtriert: 1,5 g (79%) dunkelviolettes Pulver. Bei der Kristallisation aus Pikrinsäure-gesättigtem Alkohol erhält man gelborange Polyeder von IV_{2a} ($R = H$)-Pikrat. Das Perchlorat wird analog durch Kristallisation aus $HClO_4$ aq./Alkohol erhalten; sehr hygroscopisch. $pK_{LH^+}^H = 5,66$.

Spektren: in 6N HCl (als Dikation): λ_{max} 396, 284(S), 266 nm
in 2N CH_3COOH (als Kation): λ_{max} 462, 374, 282 nm
in $CHCl_3/Et_3N$ (99:1): λ_{max} 512, 296 nm

$C_{13}H_{14}ON_6 \cdot C_6H_3O_7N_3$ (499,4)	Ber. C 45,7	H 3,4	N 25,3%	Gef. C 46,2	H 3,6	N 25,3%
---	-------------	-------	---------	-------------	-------	---------

VI_{2a} ($R = H$) ist in wässriger Lösung bei pH 7 nicht stabil und wird von Alkali unter vorübergehender Blaufärbung zerstört. VI_{2a} ($R = H$) kann auch direkt aus II_{2a} nach obiger Vorschrift erhalten werden, jedoch in schlechterer Ausbeute.

2.7. *2-Isonicotinoylhydrazinolumiflavin* (IV_{2a} , $R = COC_5H_4N$): 1 g II_{2a} und 1,5 Äq. Isonicotinsäurehydrazid lässt man in 70 ml abs. Dimethylformamid über Nacht bei Raumtemperatur stehen, versetzt das Gemisch mit dem gleichen Volumen Äther und filtriert: 0,9 g (69%). Nach Umkristallisation aus verd. $HClO_4$, IV_{2a} -Perchlorat, Smp. 300°.

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

$C_{19}H_{17}O_2N_2 \cdot 2 HClO_4$	Ber. C 39,5	H 3,3	N 17,0	Cl 12,3%
(576,4)	Gef. „ 39,1	„ 3,4	„ 16,9	„ 12,3%

2.8. *2-Lumiflavin-thiosemicarbazon* (IV_{2a} , $R = CSNH_2$): Hergestellt wie oben; 0,5 g VII_{2a} und 1,5 Äq. Thiosemicarbazid ergeben 0,45 g (77,2%). Aus Alkohol braunschwarze Kristalle. Smp. 284–286°. IV_{2a} -Perchlorat erhält man als orangefarbene Polyeder bei der Kristallisation aus Alkohol/60-proz. $HClO_4$. IV_{2a} löst sich mit violetter Farbe in Chloroform.

$C_{14}H_{15}ON_7S \cdot \frac{1}{2} H_2O$ (338,4)	Ber. C 49,8	H 4,7	S 9,5%	Gef. C 49,7	H 5,0	S 9,8%
--	-------------	-------	--------	-------------	-------	--------

2.9. *2-Lumiflavin-p-Nitrophenylhydrazon* (IV_{2a} , $R = C_6H_4-NO_2$ (p)): Darstellung wie oben. 0,5 g VII_{2a} und 1,5 Äq. p-Nitrophenylhydrazin ergeben 0,4 g (79%) als braunschwarzes Pulver. Zur Analyse aus 20-proz. $HClO_4$ /Alkohol umkristallisiert: gelbbraune Polyeder des Perchlorats vom Zersp. 193°.

$C_{19}H_{17}O_3N_7 \cdot HClO_4 \cdot 2H_2O$	Ber. C 43,3	H 4,1	N 18,5	Cl 6,7%
(527,85)	Gef. „ 43,6	„ 3,7	„ 18,5	„ 7,0%

2.10. *N-Pyridiniumacethydrazon des Lumiflavins* (IV_{2a} , $R = COCH_2NC_5H_5$): Eine Lösung von 0,6 g VII_{2a} in 40 ml Dimethylformamid wird zu einer Lösung von 1,5 Äq. N-Pyridiniumacethydrazid-chlorid in 2 ml H_2O gegeben. Nach einem Tag Stehen bei Raumtemperatur wird

filtriert; 0,6 g (95%) braune Polyeder vom Smp. 255–260°. Aus Alkohol/20-proz. HClO_4 gelbbraune Polyeder von IV_{2a} -Perchlorat. $\text{pK}_{\text{LH}^+}^{\text{H}} = 9,3$.

Spektren: in 2N HCl (als Dikation): λ_{max} 430, 390, 265 nm
 bei pH 5 (als Kation): λ_{max} 490, 305 nm
 in 2N NaOH (als Zwitterion): λ_{max} 528, 300 nm

$\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_6\text{N}_7, \text{HClO}_4, \text{H}_2\text{O}$ Ber. C 39,4 H 3,7 N 16,1 Cl 11,8%
 (608,4) Gef. „ 39,3 „ 3,7 „ 16,2 „ 11,8%

2.11. *3-N-Methyl-lumiflavin-2-hydrazon* (IV_{2b} , $R = \text{H}$): 3 g II_{2b} in 50 ml abs. Dimethylformamid gelöst, werden mit 5 ml Hydrazinhydrat 2 Std. auf 50° erwärmt. Hierauf lässt man 12 Std. bei Raumtemperatur stehen, verdünnt mit gleichem Volumen Äther und filtriert; 2,1 g (70,5%) violette Kristalle. Aus Alkohol/60-proz. HClO_4 orangefarbene Polyeder.

Spektren: in 2N CH_3COOH (als Kation): λ_{max} 461, 368, 280 nm
 bei pH 5 λ_{max} 509, 301 nm

$\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{ON}_6, \text{HClO}_4, \text{H}_2\text{O}$ (402,8) Ber. C 41,8 H 4,7 Cl 8,9% Gef. C 41,8 H 4,7 Cl 9,1%

Die Verbindung ist nur als Salz längere Zeit beständig.

2.12. *2-Riboflavin-isonicotinoylhydrazon* (IV_{2c} , $R = \text{COC}_6\text{H}_4\text{N}$): 0,2 g VII_{2c} werden in 5 ml abs. Dimethylformamid mit 1,5 Äq. Isonicotinoylhydrazin 2 Std. auf 50° erwärmt, dann wird mit dem gleichen Volumen Aceton verdünnt und vom violett-schwarzen Niederschlag filtriert. Der Rückstand wird in 20-proz. HClO_4 aufgenommen, die Lösung mit Kohle filtriert, mit NaHCO_3 aq. auf pH 7 gestellt und mit gleichem Volumen Aceton verdünnt. Bei 12 Std. Stehen bei 0° scheiden sich 0,15 g (52%) dunkelviolette Polyeder ab.

$\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{O}_6\text{N}_7, \text{HClO}_4$ (595,5) Ber. C 46,5 H 4,4 N 16,4% Gef. C 46,5 H 4,5 N 16,3%

2.13. *4-Lumiflavinhydrazon* (IV_{4a} , $R = \text{H}$): 0,1 g II_{4a} werden in 10 ml Hydrazinhydrat unter Rühren 15 Min. auf 50° erwärmt. Der dunkelviolette Niederschlag wird filtriert und mit Alkohol und Äther gut gewaschen; 0,09 g (89%). Aus 60-proz. HClO_4 /Alkohol gelbbraune Prismen.

$\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{ON}_6, \text{HClO}_4$ (370,8) Ber. C 42,1 H 4,0 Cl 9,5% Gef. C 42,0 H 3,8 Cl 9,2%

IV_{4a} ist nur als Salz beständig. In neutraler Lösung zersetzt es sich unter vorübergehender Blaufärbung.

2.14. *2-Lumiflavin-benzaldazin* (V_{2a} , $\text{Ar} = \text{C}_6\text{H}_5$): Darstellung wie V_{2a} aus IV_{2a} und frisch destilliertem Benzaldehyd. Ausbeute 65%. Zur Analyse wurde aus 2N HCl umkristallisiert: braunrote Nadeln, Zersp. 179–184°. $\text{pK}_{\text{LH}^+}^{\text{H}} = 4,88$.

Spektren: in 2N CH_3COOH (als Kation): λ_{max} 474, 392, 320 nm
 in 2N NH_3 : λ_{max} 510, 340 nm

$\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_5\text{N}_6, \text{HCl}$ Ber. C 52,3 H 4,1 N 18,3 Cl 7,7%
 (458,9) Gef. „ 52,0 „ 4,3 „ 18,1 „ 7,5%

2.15. *2-Lumiflavin-salicylaldazin* (V_{2a} , $\text{Ar} = (\text{o})\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$): 1 g IV_{2a} wird in 30 ml Gemisch 20-proz. HClO_4 /Alkohol = 1:1 heiss gelöst und die Lösung mit einigen Tropfen frisch destilliertem Salicylaldehyd versetzt. Beim Anreiben fallen sofort rotorange Kristalle aus. Die Mischung wird noch heiss filtriert und der Niederschlag mit Alkohol und Äther gewaschen; 1,2 g (68,2%). Smp. 293–295°. V_{2a} lässt sich aus Äthanol/20-proz. HClO_4 umkristallisieren.

$\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_2\text{N}_6, \text{HClO}_4, \text{H}_2\text{O}$ Ber. C 48,6 H 4,2 N 16,6 Cl 7,4%
 (492,9) Gef. „ 48,7 „ 4,0 „ 16,3 „ 7,6%

2.16. *2-Lumiflavin-isonicotinaldazin* (V_{2a} , $\text{Ar} = (4)\text{C}_5\text{H}_4\text{N}$): Herstellung analog V_{2a} aus IV_{2a} und frisch dest. Isonicotinaldehyd. Ausbeute 61%, Smp. 248–250°. Aus 20-proz. HClO_4 /Alkohol: gelbbraune Prismen.

$\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{ON}_7, 2\text{HClO}_4, 4\text{H}_2\text{O}$ Ber. C 36,1 H 4,1 N 15,5 Cl 11,2%
 (631,9) Gef. „ 36,4 „ 4,1 „ 15,5 „ 11,1%

2.17. *3-Methyl-2-lumiflavinbenzaldazin* (V_{2b} , $\text{Ar} = \text{C}_6\text{H}_5$): Eine Lösung von 0,5 g VII_{2b} in gleichen Teilen heissem Alkohol und 20-proz. HClO_4 wird mit einem Tropfen frisch destilliertem

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Spektren: bei pH 13:	λ_{max} 453, 359, 270 nm			
in 2N HCl (als Kation):	λ_{max} 440, 383, 270 nm			
$C_{14}H_{15}N_5 \cdot HClO_4 \cdot H_2O$	Ber. C 41,5	H 5,0	N 17,2	Cl 8,8%
(405,8)	Gef. „ 41,6	„ 4,3	„ 16,9	„ 8,8%

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

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

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

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

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

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

mit Kohle und versetzt mit ges. NaHCO_3 -Lösung bis zur beginnenden Kristallisation. Danach kocht man nochmals auf, bis sich alles wieder gelöst hat, reibt an, und lässt zunächst bei Raumtemperatur und dann bei 0° 6 Std. stehen. Es fallen analysenreine, gelborange Prismen an. Die Verbindung ist von allen hier beschriebenen Riboflavinderivaten am besten in Wasser löslich.

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

2.29. 4-Lumiflavimin (VI_{4a} $R = \text{H}$): 0,1 g IV_{4a} werden in Alkohol und 60-proz. HClO_4 heiss gelöst. Die heisse Lösung wird auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 2 Äq. SnCl_2 versetzt. Hierauf reibt man an, filtriert nach einiger Zeit die ausgeschiedenen dunkelbraunen Kristalle ab und suspendiert letztere in Alkohol/60-proz. HClO_4 . Beim Zufügen von wenig Perhydrol tritt Auflösung unter Aufhellung nach gelb ein. Hierauf reibt man an und lässt bei 0° kristallisieren: 0,08 g (53%) gelbe Stäbchen. Zur Analyse wurde aus Methanol und 20-proz. HClO_4 umkristallisiert. Zersp. $193\text{--}203^\circ$. IR.-Spektrum: $\nu\text{NH}(3)$ 3400; $\nu\text{CO}(2)$ 1680 cm^{-1} ; kein $\nu\text{CO}(4)$.

Spektren: in CHCl_3 : $\lambda_{\max}$ 500 (S), 474, 378, 272 nm
bei pH 7: $\lambda_{\max}$ 456, 358, 268 nm
bei pH 2 (als Kation): $\lambda_{\max}$ 458, 384, 264 nm

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

2.30. 4-Morpholino-4-desoxy-lumiflavin (strukturenanalog zu VI_{4a}): Eine Suspension von 0,5 g II_{4a} in 40 ml Morpholin wird in einem 100-ml-Sulfierkolben 6 Std. unter N_2 bei Raumtemperatur gerührt. Hierauf wird mit einem gleichen Volumen Äther versetzt, abfiltriert und mit Äther gut gewaschen: 0,5 g (79%). Aus Alkohol/Wasser gelborange Prismen. Smp. $240\text{--}245^\circ$. Die Verbindung ist gut in Chloroform löslich. Sie lässt sich mit Chloroform aus alkalischer Lösung extrahieren, nicht aber aus saurer Lösung.

Spektren: in CHCl_3 : $\lambda_{\max}$ 510 (S), 478, 358, 276 nm
bei pH 7: $\lambda_{\max}$ 468, 360, 272 nm
in 2N HCl (als Kation): $\lambda_{\max}$ 466, 396, 266 nm

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

2stündige Behandlung in 6N HCl bei 60° ergab nahezu quantitativ Lumiflavin (I_a).

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

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

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

2.32. 4-Phenylimino-lumiflavin (VI_{4a} , $R = \text{C}_6\text{H}_5$): In einem 100-ml-Sulfierkolben wird eine Suspension von 0,1 g II_{4a} in 10 ml frisch destilliertem Anilin 24 Std. auf 60° gewärmt. Hierauf setzt man das gleiche Volumen Äther zu, lässt über Nacht bei 0° stehen und filtriert die entstandenen braunroten Prismen ab: 0,09 g (74%). Aus Alkohol/60-proz. HClO_4 Kristalle vom Smp. $257\text{--}259^\circ$.

Spektren: in CHCl_3 : $\lambda_{\max}$ 518 (S), 480, 366, 266 nm
in 2N HCl: $\lambda_{\max}$ 466, 394, 264 nm
bei pH 7: $\lambda_{\max}$ 470, 362, 264 nm

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

2.33. S-Methyl-2-thio-lumiflavin (VII_{2a} , $R = \text{CH}_3$) [2]: Eine Suspension von 0,5 g II_{2a} in 15 ml Chloroform und 2 ml Methyljodid wird 12 Std. bei Raumtemperatur geschüttelt. Dann wird der braunrote Niederschlag abfiltriert und mit Äther gewaschen: 0,63 g (83%) dunkelbraunrote Kristalle (die Farbe beruht auf Ladungstransfer zwischen Flavinium-Kation und J^-). Aus Alkohol und wenig 60-proz. HClO_4 strohgelbe Nadeln des VII_{2a} -Perchlorats, Smp. $221\text{--}223^\circ$. Die

Base kann mit NaHCO_3 aq. freigesetzt werden: orangerote Kristalle. $\text{p}K_{\text{LH}^+}^{\text{H}} = 4,42$. IR.-Spektrum (Base): $\nu\text{CO}(4)$ 1665 cm^{-1} ; kein $\nu\text{CO}(2)$.

Spektren: in CHCl_3 :	λ_{max} 488, 468, 378, 284 nm
bei pH 7:	λ_{max} 454, 392, 282 nm
bei pH 2 (als Kation):	λ_{max} 426, 286 nm
$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{ON}_4\text{S}\cdot\text{HClO}_4$ Ber. C 43,5 H 3,9 N 14,5 Cl 9,1%	
(386,8) Gef. „ 43,4 „ 3,9 „ 14,5 „ 9,0%	

Die Verbindung geht in 2N HCl (Freisetzung von CH_3SH) oder in peroxidhaltiger 2N NaOH quantitativ in Lumiflavin (I_a) über.

2.34. *S-Benzyl-2-thio-lumiflavin* (VII_{2a} , $R = \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$): Herstellung analog. Aus 0,5 g II_{2a} und 2 ml Benzylbromid 0,7 g (84%) Hydrobromid in gelbbraunen Polyedern. Durch Umkristallisieren aus Alkohol/60-proz. HClO_4 erhält man strohgelbe Nadeln des VII_{2a} -Perchlorats, welche sich bei 260° zersetzen.

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

2.35. *S-(β -amino-äthyl)-2-thio-lumiflavin* (VII_{2a} , $R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$): Eine Suspension von 0,5 g II_{2a} in 10 ml abs. Dimethylformamid wird mit 1,5 g-Äq. $\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{HBr}$ 7–8 Std. unter Stickstoff auf 75° erwärmt. Dann wird heiss filtriert und der Rückstand mit Dimethylformamid und Äther gewaschen. Ausbeute 0,33 g (50%). Durch Kristallisation aus Alkohol und einem gleichen Volumen 20-proz. HClO_4 erhält man gelbe Polyeder des VII_{2a} -Perchlorats, die sich bei 290° zersetzen.

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

2.36. *S-Methyl-2-thio-riboflavin* (VII_{2c} , $R = \text{CH}_3$): 0,3 g II_c werden 5 Std. in 50 ml abs. Methanol und 10 ml Methyljodid unter Rückfluss gekocht, danach wird das Gemisch heiss filtriert. Den Filtrerrückstand wäscht man mit wenig heisser 20-proz. HClO_4 . Man vereinigt die beiden Filtrate, versetzt mit Kohle und filtriert erneut. Das Filtrat wird auf dem Wasserbad im Vakuum bei 60° auf 10 ml eingengt, mit einem gleichen Volumen Wasser verdünnt und von neuem mit Kohle filtriert. Das dunkelrotbraune Filtrat stellt man vorsichtig mit gesättigter NaHCO_3 auf pH 7, reibt an und lässt 12 Std. bei 0° stehen. Die orangegelben Polyeder werden filtriert und mit Aceton und Äther gewaschen; 0,16 g (52%), Zersp. 203° . Mässig löslich in Wasser, Alkoholen, gut löslich in verdünnten Säuren, unlöslich in Äther und Aceton.

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

2.37. *S-Methyl-4-thiolumiflavin* (VII_{4a} , $R = \text{CH}_3$): Eine Lösung von 0,15 g II_{4a} in 30 ml abs. Dimethylformamid wird mit 5 ml Methyljodid und 0,5 g K_2CO_3 versetzt und $1\frac{1}{4}$ Std. bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Rühren stehengelassen. Hierauf setzt man 50 ml Chloroform und 100 ml Wasser zu und schüttelt im Scheidetrichter kräftig durch. Die abgetrennte Chloroformphase extrahiert man je 1mal mit 30 ml 0,1N NaOH und 30 ml Sulfatpuffer (pH 2), trocknet sie dann mit Na_2SO_4 , engt am Vakuum auf 5–10 ml ein und lässt bei Raumtemperatur kristallisieren; 0,12 g (77%) orange Nadeln. Smp. $261\text{--}264^\circ$. Gut löslich in organischen Lösungsmitteln ausser Äther, wenig löslich in Wasser. IR.-Spektrum: $\nu\text{CO}(2)$ 1675 cm^{-1} ; kein $\nu\text{CO}(4)$.

Spektren: in 100-proz. HCOOH (als Kation): λ_{max} 420, 386, 264 nm
in CHCl_3 : λ_{max} 514 (S), 480, 368, 272 nm
bei pH 7: λ_{max} 478, 368, 266 nm

Die Basizität von VII_{4a} konnte der starken Hydrolysenempfindlichkeit wegen nicht festgestellt werden.

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

VII_{4a} wird in 2N HCl wie auch in 0,1N NaOH augenblicklich zu Lumiflavin (I_a) verseift; selbst in Sulfatpuffer von pH 2 verläuft die Hydrolyse bei Raumtemperatur in 1 Std. quantitativ.

2.38. *N-Ribityl-3,4-dimethyl-6-(p-carboxyphenylazo)-anilin* (X_a): 7,0 g *p*-Aminobenzoesäure werden in 50 ml 20-proz. HClO_4 gelöst, mit wenig Kohle filtriert und auf -5° abgekühlt. Hierauf lässt man 5 g NaNO_2 in 5 ml Wasser gelöst, langsam unter Rühren durch einen Trichter unter die

Oberfläche obiger Lösung einlaufen, wobei die Temperatur 0° nicht übersteigen darf. Dann rührt man noch 10 Min. bei 0°, fügt 5 g Harnstoff zu, rührt weitere 15 Min., giesst eine auf 0° abgekühlte Lösung von 12,1 g N-Ribityl-3,4-dimethylanilin⁹⁾ in 60 ml Eisessig und 10 ml Wasser unter Rühren auf einmal zu, puffert mit Na₂CO₃ auf pH 4–5 und lässt über Nacht bei Raumtemperatur stehen. Der braunrote Niederschlag wird abfiltriert, gut mit Wasser gewaschen und in 2N NaOH aufgenommen. Diese Lösung giesst man unter Rühren in das doppelte Volumen heisser 2N Essigsäure und filtriert den ausgefällten Niederschlag heiss ab, der nach gutem Waschen mit heissem Wasser bei 50° getrocknet wird: 12,0 g (63,2%). Aus wässrigem Alkohol orangerote Prismen. Smp. 171–173°. $pK_a = 5,15$.

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

C₂₀H₂₃O₆N₃ (401,4) Ber. N 10,5% Gef. N 10,4%

SUMMARY

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

Institut für Anorganische Chemie
 Universität Basel

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] F. MÜLLER, P. HEMMERICH & H. ERLÉNMEYER, *Experientia* **18**, 498 (1962).
- [1a] P. HEMMERICH, C. VEEGER & H. C. S. WOOD, *Angew. Chem.* **77**, 699 (1965).
- [2] «Flavins and Flavoproteins», BBA Library, Vol. 8, Ed. by E. C. SLATER, Elsevier, Amsterdam 1966.
- [3] V. MASSEY & Q. H. GIBSON, *Federation Proc.* **23**, 18 (1964).
- [4] H. A. HARBURY, K. F. L'ANOUÉ, P. A. LOACHE & R. M. AMICK, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **45**, 1708 (1959); H. A. HARBURY & K. A. FOLEY, *ibid.* **44**, 662 (1958).
- [5] P. HEMMERICH, S. FALLAB & H. ERLÉNMEYER, *Helv.* **39**, 1484 (1956).
- [6] P. HEMMERICH & H. ERLÉNMEYER, *Helv.* **40**, 187 (1957).
- [7] P. BAMBERG, P. HEMMERICH & H. ERLÉNMEYER, *Helv.* **43**, 395 (1960).
- [8] W. FÖRY & P. HEMMERICH, in Vorbereitung.
- [9] K. H. DUDLEY, A. EHRENBERGER, P. HEMMERICH & F. MÜLLER, *Helv.* **47**, 1354 (1964).
- [10] D. B. MCCORMICK, C. ARSENIS & P. HEMMERICH, *J. biol. Chemistry* **238**, 3057 (1963).
- [11] J. M. LHOSTE, A. HAUG & P. HEMMERICH, *Biochemistry*, in Druck.
- [12] P. HEMMERICH, F. MÜLLER & A. EHRENBERG in «Oxidases and Related Redox Systems», Vol. 1, Ed. by T. E. KING, H. S. MASON & M. MORRISON, p. 157, John Wiley & Sons, Inc., New York 1965.
- [13] R. G. PEARSON, *J. Amer. chem. Soc.* **85**, 3533 (1963).
- [14] K. H. DUDLEY & P. HEMMERICH, in Vorbereitung.
- [15] F. MÜLLER, W. WALKER & P. HEMMERICH, *Helv.* **49**, 2365 (1966).
- [16] T. Y. WANG, C. L. TSOU & J. L. WANG, *Sci. sinica* **5**, 73 (1956); **14**, 1193 (1965).
- [17] E. B. KEARNEY, *J. biol. Chemistry* **235**, 865 (1960).
- [18] P. HEMMERICH, *Helv.* **43**, 1942 (1960).
- [19] A. H. COOK, I. HEILBRON, S. F. MACDONALD & A. P. MAHADEVAN, *J. chem. Soc.* **1949**, 1064.

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