

42. Stabile Dihydroflavine¹⁾ und quartäre Flaviniumsalze

Studien in der Flavinreihe, 12. Mitteilung²⁾

von **K. H. Dudley³⁾** und **P. Hemmerich**

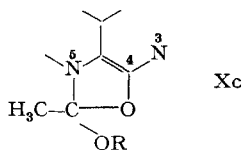
(13. XII. 66)

Die Chemie der Alloxazine (I) und Isoalloxazine (VIII), d. h. der Wirkungsgruppe des Vitamins B₂ resp. der Flavokoenzyme¹⁾, ist drastisch verschieden in den drei miteinander in thermodynamischem Gleichgewicht vorkommenden Redox-Stufen [2], welche wir im Falle des Flavins als Flavochinon, Flavosemichinon (= Flavinradikal), Flavohydrochinon (= Leukoflavin) bezeichnen. Das Flavochinon (VIII) reagiert infolge seiner extremen Elektrodefizienz einerseits leicht mit Nucleophilen an C(2) und C(4), was jedoch nur dann zur Substitution führt, wenn eine dieser Stellungen aktiviert ist [3], z. B. durch eine Alkylmercapto-Gruppe. Andererseits kann das Flavochinon (VIII) auch über eine Deprotonierung am CH₃(8) reagieren in stark basischem, hydroxylfreiem Milieu [4]. Das Flavohydrochinon hingegen reagiert vorzugsweise mit Elektrophilen an O(2), O(4), N(3) und N(5) – allerdings wird das Arbeiten erschwert durch die extreme O₂-Empfindlichkeit dieser Redox-Stufe. Eine Stabilisierung des Flavohydrochinons gegen Luft wird durch Acylierung an N(5) (III, IX) erreicht; die 5-Acylderivate sind dann im Pyrimidin-Teil kern leicht alkylierbar, und zwar vorzugsweise am Sauerstoff (vgl. Schema II), wie wir früher gezeigt haben [5]. 1,3-Dialkylisomere hingegen können nur ausgehend von Alloxazinen (I) durch nachträgliche Einführung des 10-ständigen Substituenten erhalten werden (vgl. Schema I) [5].

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der selektiven Entacylierung dieser Alkyl-derivate (IV, X) unter oxydierenden bzw. nicht-oxydierenden Bedingungen und der nachträglichen Einführung eines weiteren Alkyl-Substituenten in die frei gewordene 5-Stellung. Über die spektralen Eigenschaften der neuen Flavine ist schon früher in grösserem Rahmen berichtet worden [6].

In der bereits genannten Arbeit [5] hatten wir die bevorzugte O-Alkylierung am 10-substituierten 5-Acyl-flavohydrochinon (IX), welche in der heteroaromatischen Reihe eine Ausnahme ist, auf zwei Faktoren zurückzuführen versucht:

- 1) Sterische Hinderung der Alkylierung an N(1) durch den *peri*-ständigen Substituenten,
- 2) Begünstigung von *ψ*-Strukturen (Xc) durch Beteiligung der *peri*-ständigen Acylgruppe.



¹⁾ Zur Nomenklatur: Flavin = Isoalloxazin = 10-substituiertes 2,3,4,10-Tetrahydro-benzo[g]-pteridin-2,4-dion.

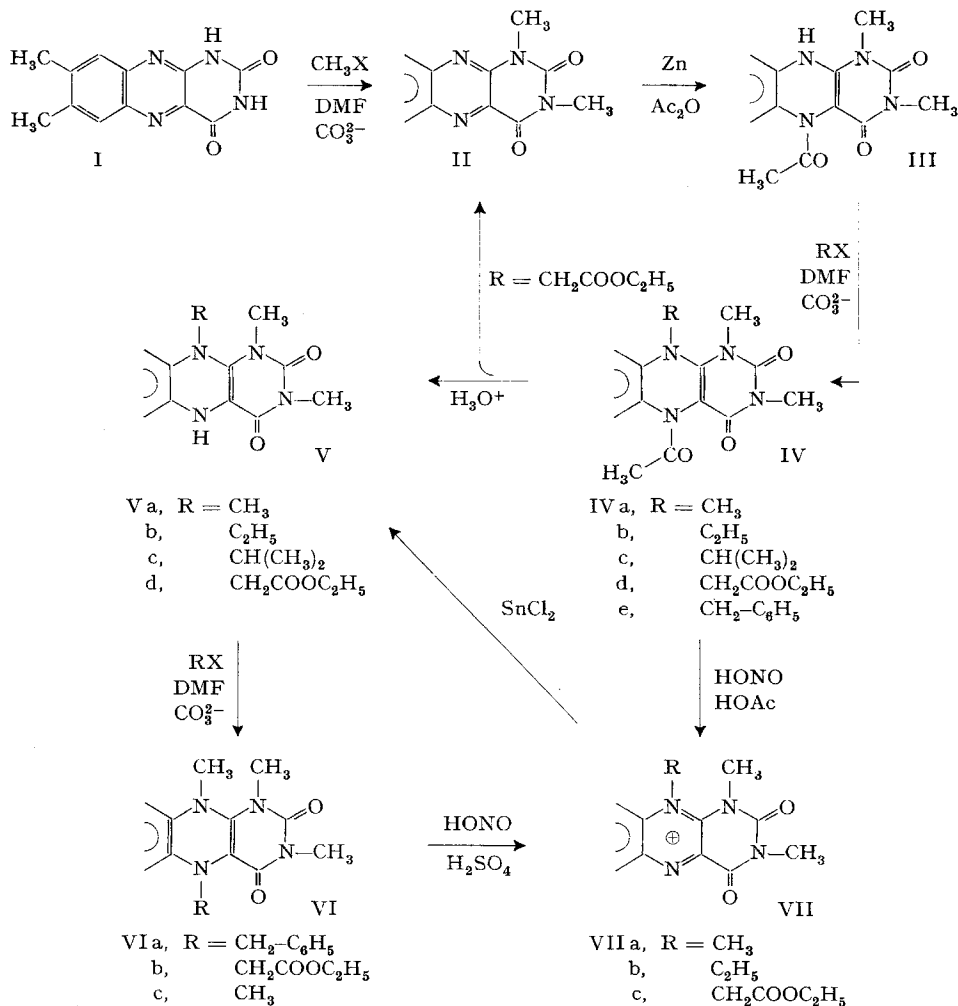
²⁾ 11. Mitteilung dieser Reihe: [1].

³⁾ National Science Foundation Postdoctoral Fellow, 1963–1964.

Durch unsere neuen Ergebnisse wird diese letzte Annahme jedoch eindeutig widerlegt: Die Acylgruppe lässt sich in allen Verbindungen des Typs X mit verdünnter Säure selektiv abspalten; eine nicht 2-ständige O-Alkylgruppe muss demnach direkt an O (4) fixiert sein wie in Xa. Dieser Reaktionsverlauf ist mit ausschliesslich sterischen Faktoren nicht zu begründen: Die Selektivität der 5-Desacylierung deutet bereits auf die aussergewöhnliche hydrolytische Stabilität der Iminoester X des Flavohydrochinons hin, welche erst durch die Autoxydation zum Flavochinon-Iminoester XII aufgehoben wird. Beide Phänomene zusammen gesehen, d. h. bevorzugte Bildung und hydrolytische Stabilität der Iminoester, legen eine thermodynamische Begründung nahe, derzufolge die prototrope Energie im Flavohydrochinon relativ gering sein muss, anders als beim Flavochinon, wie es auch schon durch unsere früheren Resultate [6] angedeutet wurde.

Die desacylierten Flavohydrochinone sind stabil gegen O_2 und kristallin fassbar, sofern N(1) substituiert ist, wie in V. Dies erklärt sich aus der – durch die sich stören-

Schema 1

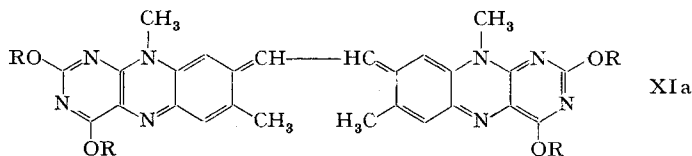


DMF = Dimethylformamid

den *peri*-Substituenten erzwungene – Nichtkoplanarität [6] unter der plausiblen Annahme, dass die Autoxydation über die koplanare Form verläuft, welche sich als angeregter Vibrationszustand des Flavohydrochinons verstehen lässt. Eine Planarisierung der Molekel lässt sich erreichen durch Elektronen-Entnahme mittels eines Radikal-Oxydants, als welches sich HONO am besten bewährt hat. Die entstehenden roten Flavosemichinon-Kationen (Rhodoflavin-Radikale [7]) reagieren sofort weiter mit HONO, jedoch weniger schnell mit H_2O_2 oder Fe^{3+} . Die Oxydation mit HONO erlaubt daher, die Radikalstufe verlustlos zu überspringen unter quantitativer Bildung der Flavochinon-Stufe. Diese schnelle Oxydation erlaubt es, wie wir fanden, quartäre Flavochinoniumsalze als kristalline Perchlorate abzufangen, aus wässriger Lösung, bevor noch hydrolytische Reaktionen an den extrem elektrodefizienten Kationen eintreten können. Hierbei sind zwei Substanzklassen zu unterscheiden:

1) *N,N*-Dialkyl-flavochinoniumsalze (VII), welche im pH-Bereich < 6 stabil sind. Bei höherem pH treten irreversible Reaktionen ein, welche vermutlich über eine intermediäre Pseudobase zu Umlagerungen führen⁴⁾. Die Quartärsalze VII können reduktiv (HSO_3^- , H_2 kat., SnCl_2) in die Flavohydrochinone V rücküberführt werden. In der Radikalstufe erleiden sie leicht Desalkylierung in Stellung 10 unter Rückbildung von II. Die Alkylgruppen in den Stellungen 1 und 3 sind demgegenüber absolut stabil.

2) *O,O*- und *O,N*-Dialkyl-flavochinoniumsalze XI und XIII, welche bei pH 2 ein Stabilitätsmaximum haben. Die nun extrem aktiven Iminolester-Gruppen werden aber auch bei diesem pH noch langsam angegriffen. Bei $\text{pH} \geq 7$ tritt zusätzlich zur Iminolester-Hydrolyse irreversible Dimerisierung ein ($\text{XI} \rightarrow \text{XIa}$), wie wir es für unsubstituierte Flavine in aprotisch-basischem Milieu fanden [4]. Diese Reaktion ist der Acidität der 8-ständigen Methylgruppe zuzuschreiben, welche im Falle von XI bei pH 7 schneller dissoziiert als die Iminolester hydrolysiert werden können.



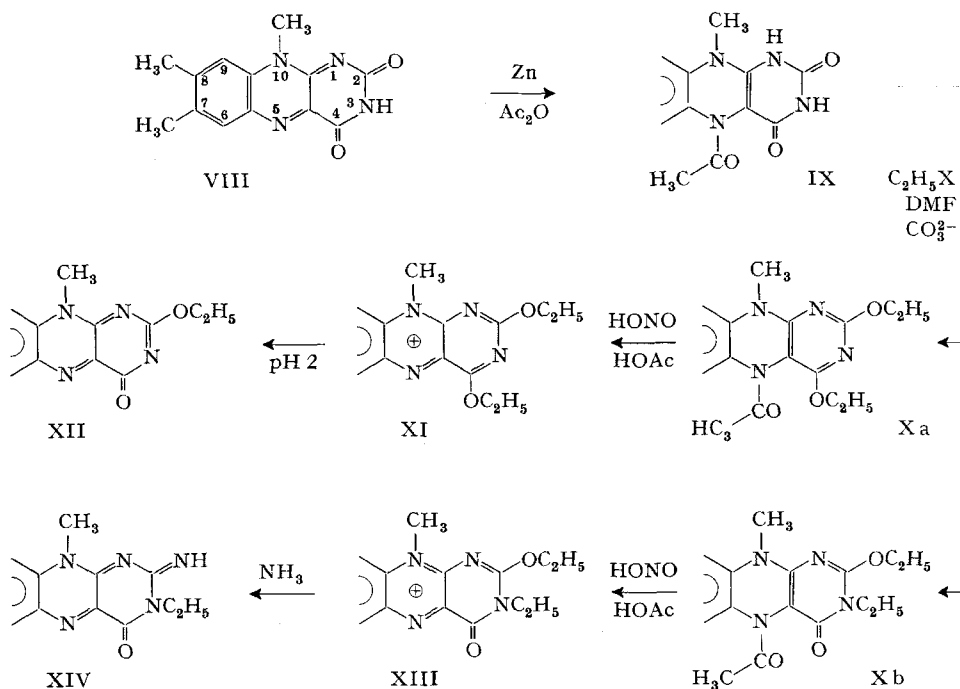
Im Falle des *O,O*-Dialkylderivates XI ist eindeutig die 4-Iminolestergruppe die reaktivere, man erhält zunächst das 2-O-Alkylflavin XII. Die Iminolester-Funktionen lassen sich mit NH-Basen leicht substituieren. Als Beispiel erwähnen wir die Reaktion von XIII mit NH_3 zum 3-Alkyl-2-Iminoflavin XIV.

Der Einsatz von HONO erlaubt es, Desacylierung und Reoxydation unter sehr milden Bedingungen (Essigsäure) einstufig auszuführen. Auf diese Weise war auch die Isolierung des Esters VIIc und seines Reaktionsproduktes Vd möglich, welches durch hydrolytische Desacylierung wegen gleichzeitiger Hydrolyse, Decarboxylierung und Desalkylierung der Seitenkette nicht erhältlich war.

⁴⁾ Eine Publikation von Daten über diese Folgereaktionen ist in Vorbereitung (K. H. DUDLEY). Die Reaktion selbst ist inzwischen auch schon von MAGER & BERENDS [8] beschrieben worden, ausgehend von dem von uns [5] dargestellten 1,3,10-Trimethylenkofflavin. Es ist jedoch zu beachten, dass 1,10-disubstituierte Flavine nicht als Vitamin-B₂-Modelle sondern – aus den im Text angeführten Gründen – als Flavine «unnatürlicher Reaktivität» zu betrachten sind.

Ausgehend vom stabilen Flavohydrochinon (Va) gelang es uns erstmalig, einen Substituenten in Stellung 5 einzuführen, nämlich durch Alkylierung unter milder Basenkatalyse in aprotischem Milieu. Die so erhaltenen 1,3,5-Trialkylflavohydrochinone VI sind gut kristallisierte, blassgelbe Verbindungen, was auf die erhöhte Nichtkoplanarität des Heteroaromaten hindeutet. Bei Entnahme eines Elektrons aus VI mittels H_2O_2 , oder Fe^{3+} erhält man tiefrote Radikal-Kationen, die so stabil sind, dass sie im Chromatogramm unzersetzt laufen, auch an der Luft. Die Disproportionierung dieser Radikale ist mangels aktiver Wasserstoffe ausgeschlossen. Setzt man Radikalfänger zu, so tritt Oxydation mit Desalkylierung in Stellung 5 ein unter Bildung von VIIa.

Schema II



Für die Reaktivität des N(5) im Flavin und ihre möglichen biologischen Konsequenzen ergeben sich damit weitreichende Perspektiven. Zu gleicher Zeit ist es uns, wie an anderer Stelle berichtet wird [9], gelungen, 5-ständiges Alkyl auf photochemischem Wege direkt ins Flavochinon einzuführen. Es gelingt damit, 5-RF1 sowohl aus R^+ und Fl^- , wie aus R^- und Fl^+ zu erhalten, und als $\text{R}^+ + \text{Fl}^- + 2e^-$ oxydativ wieder abzuspalten. Es besteht die Möglichkeit, dass dieser Formalismus kennzeichnend ist für die Flavin-katalysierte biologische Dehydrierung, und nicht etwa der bisher bevorzugt angenommene Hydrid-Transfer-Mechanismus [10].

Wir danken der NATIONAL SCIENCE FOUNDATION, Washington D.C., für das K. H. DUDLEY gewährte Postdoctoral Fellowship (43065) sowie Herrn Professor H. ERLÉNMYER für seine Förderung dieses Projektes.

Experimenteller Teil

Smp. wurden auf einem KOFLER-Block (korrigiert) oder im Röhrchen (unkorrigiert) bestimmt. Der letztere Fall wird durch * angezeigt. – IR.-Spektren wurden von KBr-Presslingen auf einem BECKMAN-IR-8-Gerät gemessen.

Dünnschichtchromatographieplatten wurden mit MN-Silicagel-S⁵) beschichtet. Die Abkürzungen bezeichnen folgende Systeme:

- (A) Benzol : Isopropyläther : Chloroform (4 : 4 : 1)
- (B) Benzol : Isopropyläther : Chloroform (2 : 2 : 1)
- (C) Benzol : Isopropyläther : Äthanol (4 : 4 : 0,25)
- (D) Benzol : Isopropyläther : Äthanol (4 : 4 : 1)
- (E) Benzol : Isopropyläther : Äthanol (2 : 2 : 1)
- (F) Butanol : Eisessig : Wasser (6 : 2 : 2)
- (G) Butanol : Eisessig : Wasser (2 : 4 : 4)

1,3-Dimethylumichrom (II): Zu einer Lösung von 15,0 g Lumichrom (I) [11] und 30 g K₂CO₃ in 250 ml Dimethylformamid (DMF) wurden langsam unter Rühren und bei 90° 60 ml 1:1 (CH₃)₂SO₄/DMF während 45 Min. zugegeben. Nach 1 Stunde wurden nochmals 10 g K₂CO₃ beigegeben. Die Reaktion wurde in den Systemen A und F dünn-schichtchromatographisch verfolgt; sie ist nach 3 Std. vollständig. Das Gemisch wurde auf dem Wasserbad im Vakuum zur Trockene eingengt und der gelbe, kristalline Rückstand in 200 ml 2N NH₃ aufgenommen und abfiltriert. Der Rückstand wurde gut mit 2N NH₃, H₂O (bis Filtrat farblos), Aceton und Äther gewaschen. Ausbeute nach Trocknen (70°, 15 Torr) 15,0 g (90,5%), Smp. 248–249°.

1,3-Dimethyl-5-acetyl-leukolumichrom (III): Unter Rühren und Rückfluss wurden in eine Lösung von 12,0 g II in 200 ml 1:3 Ac₂O/HOAc 12,0 g Zn-Pulver in kleinen Portionen eingetragen. Die Reaktion wurde im System E dünn-schichtchromatographisch verfolgt. Nach Beendigung der Reaktion wurde von Zn-Salzen abfiltriert und im Vakuum zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in H₂O suspendiert und mit kleinen Portionen verd. NH₃ behandelt zur vollständigen Hydrolyse des noch vorhandenen Ac₂O, dann abfiltriert und aus eiskalter 1N NaOH mit HOAc umgefällt, gut mit H₂O gewaschen und bei 70°/15 Torr getrocknet: Ausbeute 14,5 g (~100%) gelbe Kristalle, welche im Chromatogramm nur Spuren von Ausgangsmaterial (II) aufwiesen. Das Produkt ist eine Säure vom pK 10 und dadurch vom Ausgangsmaterial leicht unterscheidbar.

1,3-Dimethyl-5-acetyl-leukolumiflavin (IVa): Unter Rühren und N₂-Einleitung wurden zu einer Suspension von 8,0 g III und 16,0 g K₂CO₃ in 200 ml Dimethylformamid bei 80° langsam 25 ml 1:4 (CH₃)₂SO₄/DMF getropft. Die Reaktion wurde dünn-schichtchromatographisch im System E verfolgt. Nach 4 Std. wurde das Gemisch zur Trockene eingengt, in 250 ml H₂O aufgenommen und mit HOAc auf pH 5 gestellt. Der unlösliche Teil wurde abfiltriert, mit H₂O gewaschen und im Vakuum getrocknet. Aus Chloroform/Isopropyläther 2,5 g farblose Nadeln (IVa), Smp. 238–241°. Die Substanz ist chromatographisch rein (System E). – Die Mutterlauge und das Waschwasser wurden vereinigt und mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden gut mit eiskalter 0,1N NaOH, 0,1N HOAc und H₂O gewaschen, mit K₂CO₃ getrocknet und eingedampft. Der ölige Rückstand kristallisierte aus CHCl₃/Isopropyläther: 2,9 g (34,6%) vom Smp. 224–240°. Das Produkt wurde bei 190–200°/0,1 Torr sublimiert und nochmals umkristallisiert: 1,7 g IVa, Smp. 238–241°; Gesamtausbeute 4,2 g (59,3%). IR.-Spektrum: ν_{CO} 1706, 1681, 1647 cm⁻¹.

C₁₇H₂₀O₃N₄ (328,4) Ber. C 62,2 H 6,1 N 17,1% Gef. C 62,1 H 6,1 N 17,2%

Folgende Verbindungen wurden in analoger Reaktion erhalten:

1,3,7,8-Tetramethyl-10-äthyl-5-acetyl-leukoflavin (IVb), mit (C₂H₅)₂SO₄. Zur Analyse wurde bei 215°/0,08 Torr sublimiert und wie oben umkristallisiert: Smp. 262–266°. IR.-Spektrum: ν_{CO} 1704, 1681, 1653 cm⁻¹.

C₁₈H₂₂O₃N₄ (342,4) Ber. C 63,2 H 6,5 N 16,4% Gef. C 63,4 H 6,6 N 16,2%

1,3,7,8-Tetramethyl-10-isopropyl-5-acetyl-leukoflavin (IVc), mit (CH₃)₂CHJ. Smp. nach der Umkristallisation aus Isopropyläther 196–198°. IR.-Spektrum: ν_{CO} 1704, 1667, 1655 cm⁻¹.

C₁₈H₂₄O₃N₄ (356,4) Ber. C 64,0 H 6,8 N 15,7% Gef. C 64,0 H 7,0 N 15,7%

⁵) Produkt der Firma MACHEREY, NAGEL & Co., 516 Düren, Deutschland.

1,3,7,8-Tetramethyl-10-äthoxycarbonylmethyl-5-acetyl-leukoflavin (IVd), mit $\text{BrCH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$. Zur Analyse wurde bei $210^\circ/0,2$ Torr sublimiert. Smp. $224\text{--}226^\circ$. IR.-Spektrum: ν_{CO} 1751, 1712, 1692, 1653 cm^{-1} .

$\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_5\text{N}_4$ (400,4) Ber. C 59,99 H 6,04 N 13,99% Gef. C 59,93 H 6,14 N 13,74%

1,3,7,8-Tetramethyl-10-benzyl-5-acetyl-leukoflavin (IVe), mit $\text{C}_7\text{H}_7\text{Br}$. Durch Umkristallisation aus 1:5 Chloroform/Isopropyläther erhält man farblose Prismen vom Doppel-Smp. $189\text{--}194$ und $257\text{--}260^\circ$. IR.-Spektrum: ν_{CO} 1727, 1712, 1672, 1653 cm^{-1} .

$\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_3\text{N}_4$ (404,5) Ber. C 68,3 H 6,0 N 13,9% Gef. C 68,6 H 6,1 N 13,7%

1,3-Dimethyl-leukolumiflavin (Va) (= *1,3,7,8,10-Pentamethyl-leukoflavin*: Eine filtrierte Lösung von 2,0 g IVa in 300 ml Äthanol und 300 ml 2N HCl wurde unter N_2 während 2 Std. auf 80° erwärmt. Dabei bildeten sich gelb-orange Kristalle, welche schnell filtriert und dann mit Äthanol und Äther gewaschen wurden. Ausbeute 1,2 g (69%), Smp. $204\text{--}206^\circ$. IR.-Spektrum: ν_{NH} (nicht assoz.) 3344 cm^{-1} ; ν_{CO} 1695, 1650 cm^{-1} .

$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_2\text{N}_4$ (286,3) Ber. C 62,9 H 6,3 NCH_3 15,8% Gef. C 62,8 H 6,4 NCH_3 15,0%

Analog wurden erhalten:

1,3,7,8-Tetramethyl-10-äthyl-leukoflavin (Vb), Smp. $177\text{--}180^\circ$. IR.-Spektrum: ν_{NH} (nicht assoz.) 3322 cm^{-1} ; ν_{CO} 1692, 1647 cm^{-1} .

$\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{O}_2\text{N}_4$ (300,4) Ber. C 64,0 H 6,7% Gef. C 63,7 H 7,0%

1,3,7,8-Tetramethyl-10-isopropyl-leukoflavin (Vc), Smp. $153\text{--}156^\circ$. IR.-Spektrum: ν_{NH} (nicht assoz.) 3333 cm^{-1} ; ν_{CO} 1695, 1653 cm^{-1} .

$\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_2\text{N}_4$ (314,4) Ber. C 64,9 H 7,1 N 17,8% Gef. C 65,0 H 7,0 N 18,2%

1,3,7,8-Tetramethyl-10-äthoxycarbonylmethyl-leukoflavin (Vd): Einer Suspension von 0,2 g des Flaviniumsalses VIIc (s. S. 361) in 5 ml Acetonitril wurde 0,4 g SnCl_2 , 2 H_2O beigegeben, wobei augenblicklich eine tiefrote Färbung eintrat, welche bei langsamer Zugabe von 25 ml Wasser einem gelben, kristallinen Niederschlag von Vd Platz machte. Die Suspension wurde mit 3 Tropfen 6N HCl angesäuert und filtriert. Der Rückstand (0,12 g = 77%) zeigte nach Auswaschen mit Wasser und Methanol den Smp. $*148\text{--}150^\circ$. Zur Analyse wurde umkristallisiert durch Zugabe von warmem Wasser zur heissen äthanolischen Lösung. IR.-Spektrum: ν_{NH} (nicht assoz.) 3322 cm^{-1} ; ν_{CO} 1751, 1692, 1653 cm^{-1} .

$\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_4\text{N}_4$ (358,4) Ber. C 60,3 H 6,2 N 15,6% Gef. C 60,1 H 6,2 N 15,8%

Das so erhaltene Flavohydrochinon Vd gab beim Kochen an der Luft in 6N HCl/ $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ Rotfärbung erst nach Zugabe von Fe^{3+} .

1,3-Dimethyl-5-benzyl-leukolumiflavin (VIa): Ein Gemisch von 0,2 g Va, 0,4 g K_2CO_3 und 0,2 ml Benzylbromid in 25 ml Dimethylformamid wurde bei 60° unter N_2 während $\frac{1}{2}$ Std. gerührt. (Reaktion dünnsschichtchromatographisch im System B verfolgt). Dann wurde die Lösung mit 100 ml H_2O versetzt und mit 40 ml Chloroform extrahiert; dieses wurde dreimal mit H_2O gewaschen und mit K_2CO_3 getrocknet. Die filtrierte gelbe Lösung wurde im Vakuum zu einem gelben Sirup eingengt, der, in wenig Benzol gelöst, an einer Säule von Al_2O_3 (FLUKA, Typ 507c) mit Benzol als Elutionsmittel chromatographiert wurde. Eine intensiv gelbe Bande wurde in Portionen eluiert und erwies sich im System B dünnsschichtchromatographisch homogen. Das vereinigte Eluat wurde im Vakuum eingengt. Nach Zugabe von Petroläther 0,18 g (68,4%) gelbe Nadeln; Smp. $195\text{--}197^\circ$. IR.-Spektrum: ν_{CO} 1695, 1647 cm^{-1} .

$\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{O}_2\text{N}_4$ (376,4) Ber. C 70,2 H 6,4 N 14,9% Gef. C 70,6 H 6,5 N 14,9%

Analog wurden hergestellt:

1,3,10-Trimethyl-5-äthoxycarbonylmethyl-leukoflavin (VIb), mit $\text{BrCH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$ in 5 Std. bei 70° ; nach säulenchromatographischer Reinigung über Al_2O_3 aus Petroläther umkristallisiert, Smp. $177\text{--}179^\circ$. IR.-Spektrum: ν_{CO} 1748, 1695, 1629 cm^{-1} .

$\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_4\text{N}_4$ (372,4) Ber. C 61,3 H 6,5 N 15,0% Gef. C 61,1 H 6,5 N 14,8%

1,3,5,10-Tetramethyl-leukoflavin (VIc), mit CH_3J ; gelbe Nadeln aus Benzol-Petroläther nach säulenchromatographischer Reinigung über Al_2O_3 , Smp. $198\text{--}201^\circ$. IR.-Spektrum: ν_{CO} 1689, 1634 cm^{-1} .

$\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{O}_2\text{N}_4$ (300,4) Ber. C 64,0 H 6,7 N 18,6% Gef. C 63,7 H 6,8 N 18,3%

1,3,10-Trimethylflavinium-perchlorat (VIIa): Eine Lösung von 3,0 g IVa in 75 ml warmem Äthanol wurde auf 20° gekühlt, filtriert und zu 75 ml einer Lösung von 2,0 g NaNO₂ in 2 N HClO₄ gegeben. Während der leicht exothermen Reaktion wird die Lösung tief orange-gelb und gelbe Kristalle des Flaviniumsalzes beginnen sich abzuscheiden. Nach 1½ Std. wurde filtriert, gut mit Wasser, Äthanol und Äther gewaschen und getrocknet: 3,4 g (97%), Smp. *259–261° (Gasentwicklung), dünnschichtchromatographisch einheitlich (System F). Zur Analyse wurde aus Wasser und wenig 2 N HClO₄ umkristallisiert und 14 Std. bei 85°/0,07 Torr getrocknet. Das Perchlorat kann auch aus konz. HCl ohne Veränderung umkristallisiert werden. IR.-Spektrum: ν_{CO} 1736, 1695 cm⁻¹. C₁₅H₁₇O₆N₄Cl, H₂O Ber. C 44,7 H 4,8 N 13,91 NCH₃ 11,19%
(402,8) Gef. „ 44,8 „ 4,4 „ 13,89 „ 10,94%

Eine Suspension von 5,5 g KJ in 10 ml Wasser wurde mit einer Suspension von 0,075 g Flaviniumperchlorat VIIa in 10 ml Äthanol auf dem Wasserbad erwärmt bis sich eine einheitliche rote Lösung gebildet hatte. Die filtrierte Lösung wurde 2 Tage bei 0° stengelassen. Die roten, metallisch glänzenden Nadeln des *Flaviniumjodids* (Ladungstransfer-Färbung) wurden filtriert und gut mit Wasser, Äthanol und Äther gewaschen. Im Röhrchen erhitzt wurde die Substanz bei 150° rot-braun, bei 190° leuchtend gelb; Smp. (Zers.) 210–221°. IR.-Spektrum: ν_{CO} 1736, 1695 cm⁻¹.

C₁₆H₁₇O₂N₄J (412,2) Ber. C 43,7 H 4,2 N 13,6% Gef. C 43,5 H 4,2 N 13,5%

Reduktion des Flavinium-Ions. – a) Eine Suspension von 0,05 g Perchlorat VIIa in einem siedenden 1:1 Äthanol/2 N HCl Gemisch wurde mit 0,15 g SnCl₂, 2 H₂O versetzt und 3–5 Min. gekocht. Die blutrote Lösung des Radikal-Kations, das sich durch Zugabe von Sn²⁺ gebildet hatte, verblasste langsam und nach dem Abkühlen bildeten sich 0,03 g (80,6%) gelb-orange Kristalle, die mit *Leukoflavin Va*, nach Smp., IR.- und UV.-Spektren und Rf-Wert im System F identisch waren.

b) 0,05 g des Perchlorat VIIa wurde in 10 ml einer Lösung von 0,05 g NaHSO₃ in Wasser suspendiert und bei Zimmertemp. unter gelegentlichem Schütteln 1 Tag stengelassen. Weitere 0,05 g NaHSO₃ wurden beigegeben, dann wurde leicht erwärmt, filtriert und noch einen Tag stengelassen. Die klare Lösung wurde blutrot und es schied sich 0,02 g (53%) *Leukoflavin Va* in gelben Kristallen ab (identifiziert durch Dünnschichtchromatographie im System F).

c) Unter N₂ wurde eine Suspension von 0,1 g des Perchlorats VIIa in 5 ml Methanol mit 5 Tropfen Phenylhydrazin versetzt und ¾ Std. unter Rückfluss gekocht. Die gebildeten Kristalle wurden abfiltriert, mit Methanol gewaschen und mit Äther getrocknet: 0,06–0,07 g (80–90%) *Leukoflavin Va* (identifiziert durch Misch.-Smp.).

Analog wie VIIa wurden erhalten:

1,3-Dimethyl-10-äthyl-flavinium-perchlorat (VIIb), gelb-orange Kristalle vom Smp. 230–231° (Zers.). IR.-Spektrum: ν_{CO} 1742, 1701 cm⁻¹.

C₁₆H₁₉O₆N₄Cl (398,8) Ber. C 48,2 H 4,8 Cl 8,9% Gef. C 48,5 H 5,0 Cl 9,1%

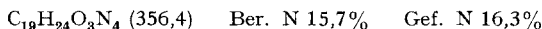
1,3-Dimethyl-10-äthoxycarbonylmethyl-flavinium-perchlorat (VIIc), Smp. *209–210° (Zers.). IR.-Spektrum: ν_{CO} 1751, 1754, 1695 cm⁻¹.

C₁₈H₂₁O₈N₄Cl (456,8) Ber. C 47,3 H 4,6% Gef. C 47,0 H 4,9%

Alkylierung von 5-Acetyl-leukolumiflavin (IX) [5] und Trennung der Isomeren O,O-Diäthyl-5-acetyl-leukolumiflavin (Xa) und O,N-Diäthyl-5-acetyl-leukolumiflavin (Xb): Zu einer Suspension von 7,3 g IX und 15 g K₂CO₃ in 150 ml Dimethylformamid wurden bei 80° unter Rühren und N₂ langsam 45 ml 1:2 (C₂H₅O)₂SO₂/DMF zugegeben. Die Reaktion (im System A dünnschichtchromatographisch verfolgt) war nach 4–5 Std. vollständig. Danach wurde im Vakuum zu einem dicken, braunen Sirup eingengt und langsam 100 ml Wasser beigegeben. Das Ungelöste wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und in Chloroform gelöst. Die Chloroform-Phase wurde mit Wasser gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und zu einem braunen Sirup eingengt. Dieser wurde in Äther gelöst, mit Tierkohle filtriert und nach Zugabe von Petroläther über Nacht bei –20° stengelassen: 6,5 g (75%) Kristalle, gemäss Dünnschichtchromatogramm im System A ein Gemisch von zwei Substanzen.

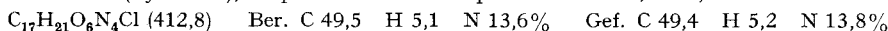
Trennung: Die 6,4 g Kristallgemisch wurden in 150 ml heissem Äthanol gelöst. Die Lösung wurde mit heissem Wasser auf das doppelte Volumen verdünnt und nach langsamem Abkühlen wurde sie 2 Tage bei Zimmertemp. stengelassen; es bildeten sich lange weisse Nadeln. Nach

8stdg. Stehen bei 0° wurden die Kristalle (*O,O*-Diäthyl-Isomeres *Xa* abfiltriert: 3,6 g vom Smp. 161–163° (Lit. [5]: Smp. 153–155°). Das Produkt war dünn-schichtchromatographisch einheitlich im System A. – Der erwärmten Mutterlauge wurden nochmals 150 ml warmes Wasser beigegeben. Im Laufe von 5 Tagen bei 0° bildeten sich 2,5 g nahezu farblose Kristalle vom Smp. *114–116°. Das Produkt erwies sich als das *N,O*-Diäthyl-Isomere *Xb*, welches noch kleine Mengen von *Xa* enthält. Zur Analyse wurde eine Probe der Substanz Smp. 114–116° aus Äthanol/Wasser umkristallisiert.

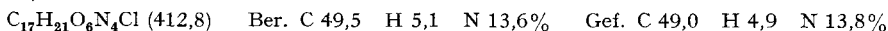


Je eine Probe jeder Fraktion wurde in Äthanol gelöst, die Lösung mit wenig 2N HClO_4 versetzt und bis zur Bildung der tiefroten Farbe des Radikal-Kations erwärmt. Dann wurde jede Lösung mit einigen Tropfen 30-proz. H_2O_2 versetzt und im Wasserbad bei 70° stehengelassen bis sie orange war. Dünn-schichtchromatographische Kontrolle im System F zeigte, dass die Reaktion aus Fraktion Smp. 161–163° (*O,O*-Diäthyl-Isomeres) nur Lumiflavin (*VIII*) ergab, Fraktion Smp. 114–116° jedoch ergab zwei Flecke: der grössere, intensivere war identisch mit 3-Äthyl-lumiflavin [5], der kleinere mit Lumiflavin (*VIII*).

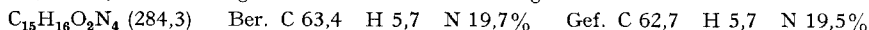
O,O-Diäthyl-lumiflavinium-perchlorat (*XI*): Zu einer Lösung von 0,5 g des Acetyl-leuko-Isomeren *Xa* in 10 ml Äthanol wurden langsam in kleinen Portionen 20 ml einer Lösung von 0,5 g NaNO_2 in 1N HClO_4 gegeben. Die anfänglich farblose Lösung wurde tief-orange. Nach Zugabe von weiteren 0,2 g festem NaNO_2 begannen sich gelbe Kristalle des Flavinium-perchlorats abzuschneiden. Danach wurde mit 300 ml Wasser verdünnt und filtriert. Der Rückstand wurde mit 30 ml Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet: 0,48 g (83%) dünn-schichtchromatographisch reines Produkt (System F), Smp. *173–175°. IR.-Spektrum: ν 1634, 1605, 1550 cm^{-1} .



O(2),N(3)-Diäthyl-lumiflavinium-perchlorat (*XIII*): Einer Lösung von 0,8 g des Acetyl-leuko-Isomeren *Xb* in 16 ml Äthanol wurden in kleinen Portionen und unter Rühren 32 ml einer Lösung von 0,8 g NaNO_2 in 1N HClO_4 beigegeben. Das anfänglich tief-rote Gemisch hellte sich nach gelb auf und es begannen sich gelbe Nadeln des Flavinium-perchlorats *XIII* abzuschneiden. Diese wurden filtriert, mit Wasser gewaschen und aus Äthanol umkristallisiert: 0,61 g vom Smp. *227° (Zers.). Die Mutterlauge wurde mit Wasser verdünnt; nach 2 Std. Stehen bei 0° wurden die ausgeschiedenen Kristalle abfiltriert und mit Wasser, Äthanol und Äther gewaschen: 0,2 g *XIII* vom Smp. *225°. Dünn-schichtchromatogramm im System F zeigte, dass beide Fraktionen Spuren von Lumiflavin enthielten. Gesamtausbeute: 0,81 g (87,5%). IR.-Spektrum: ν_{CO} 1715 cm^{-1} ; ν 1563, 1548 cm^{-1} .

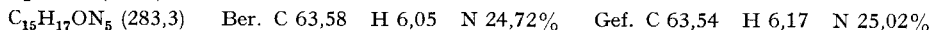


O(2)-Äthyl-lumiflavin (*XII*): 0,1 g *O,O*-Diäthyl-lumiflavinium-Salz *XI* wurde in 2N Essigsäure kurz erwärmt. Dünn-schichtchromatogramm im System F zeigte das Verschwinden des Startmaterials unter Bildung eines neuen Flavins von blau-grüner Fluoreszenz. Bei längerem Erwärmen geht dieses Zwischenprodukt in Lumiflavin über. Die Reaktion wurde bei maximaler Bildung des Zwischenproduktes, welches beim Abkühlen auskristallisierte, abgebrochen. Nach der Umkristallisation aus Chloroform/Äther orange Kristalle, dünn-schichtchromatographisch (System F) einheitlich; bei 200° Verfärbung und bei 212–214° Zersetzung.



Eine kleine Probe des *O(2)*-Äthyl-lumiflavins (*XII*) wurde mit einem Tropfen Morpholin $1\frac{1}{2}$ Std. auf 65° erwärmt, mit Chloroform verdünnt und mit 1N Phosphatpuffer pH 7 extrahiert. Dünn-schichtchromatogramm der Chloroform-Phase (System F) ergab nur einen gelb fluoreszierenden Fleck, welcher mit authentischem 2-Morpholino-lumiflavin [3] identisch war.

2-Imino-3-äthyl-lumiflavin (*XIV*): 0,2 g des Flaviniumsalses *XIII* wurde in 15 ml abs. Äthanol suspendiert und kurz mit flüssigem Ammoniak behandelt. Die Suspension ging sofort in eine Lösung von orange-roter Farbe über, aus der sich orange-rote Nadeln abschieden; nach $\frac{1}{2}$ Std. Stehen bei 0° wurde die Lösung filtriert und der Rückstand ergab, mit Äthanol und Äther gewaschen, 0,12 g (87,4%) vom Smp. *230–232° (Zers.); nach Umkristallisieren aus Äthanol, Smp. 239° (Zers.).



Zersetzung von 1,3-Dimethyl-10 α -äthoxycarbonyl-lumiflavinium-perchlorat (*VIIc*): Eine Suspension von 0,1 g *VIIc* in 5 ml 2N HCl wurde auf 65° erwärmt. Die wässrige Phase wurde inner-

halb von 5–10 Min. blutrot. Nach 6 Std. wurden die abgeschiedenen, gelben Kristalle von der nun orangen Lösung abfiltriert und getrocknet: 0,013 g (22,6%), dünnschichtchromatographisch identisch mit *Dimethylchrom* (II).

Desalkylierung von 1,3-Dimethyl-5-benzyl-leukolumiflavin (VIa): Eine Probe von VIa wurde in wenig konz. H_2SO_4 gelöst. Dann wurde die Lösung mit einem NaNO_2 -Kristall, danach mit Eis und schliesslich mit Wasser versetzt und mit festem NaClO_4 gesättigt; bald begannen sich die Kristalle eines Flavinium-perchlorats abzuscheiden, welches dünnschichtchromatographisch (Systeme F und G) mit VIIa identisch war.

SUMMARY

Flavohydroquinones (leucoflavins) protected by acetylation at N(5) have been alkylated to give derivatives substituted at oxygen and/or nitrogen functions in the pyrimidine part of the nucleus. Removal of the protecting group under oxidizing conditions gave N(1),N(3)-, O(2),N(3)- or O(2),O(4)-dialkyl-flavoquinonium salts. The N(1)-substituted type could be reduced to give free flavohydroquinones stable in air, which in turn could be further alkylated at N(5). On oxidation the N(5)-alkyl groups are readily removed through the radical intermediate. The N(10)-alkyl groups may be split from the flavoquinonium salt if they are activated (e.g. $-\text{CH}_2\text{COOR}$). The O-alkyl groups are readily hydrolysed under neutral or slightly acid conditions whereas a basic medium provokes deprotonation at the 8- CH_3 group and concomitant irreversible dimerization. The potential importance of these models for elucidating the mechanism of flavin-dependent biological dehydrogenation is mentioned.

Institut für Anorganische Chemie
Universität Basel

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] F. MÜLLER, W. WALKER & P. HEMMERICH, *Helv.* **49**, 2365 (1966).
 - [2] P. HEMMERICH, C. VEEGER & H. C. S. WOOD, *Angew. Chem.* **77**, 699 (1965).
 - [3] F. MÜLLER & P. HEMMERICH, *Helv.* **49**, 2352 (1966).
 - [4] P. HEMMERICH, B. PRIJS & H. ERLÉNMEYER, *Helv.* **42**, 2164 (1959).
 - [5] P. HEMMERICH, B. PRIJS & H. ERLÉNMEYER, *Helv.* **43**, 372 (1960).
 - [6] K. H. DUDLEY, A. EHRENBURG, P. HEMMERICH & F. MÜLLER, *Helv.* **47**, 464 (1964).
 - [7] R. KUHN & R. STRÖBELE, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **70**, 753 (1937).
 - [8] H. I. X. MAGER & W. BERENDS, *Biochim. biophysica Acta* **118**, 440 (1966).
 - [9] P. HEMMERICH, V. MASSEY & G. WEBER, *Nature*, **213**, 728 (1967).
 - [10] C. H. SUELTER & D. E. METZLER, *Biochim. biophysica Acta* **44**, 23 (1960).
 - [11] K. G. STERN & E. R. HOLIDAY, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **67**, 1442 (1934).
-