

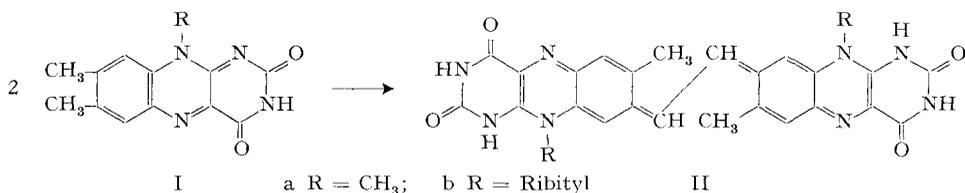
238. Studien in der Lumiflavin-Reihe VIII¹⁾

Die Kondensation von 8-Methyl-isoalloxazinen mit Aldehyden

von P. Hemmerich

(10. IX. 60)

In der 5. Mitteilung dieser Reihe²⁾ haben wir gezeigt, dass 8-Methyl-isoalloxazine wie Lumiflavin (Ia) und Riboflavin (Ib) in wasserfreiem, basischem Milieu nach Art von Nitrotoluolen³⁾ sich unter 8α , $8\alpha'$ -Verknüpfung dimerisieren.



Die Methylen-Aktivität der 8-CH₃-Gruppe wurde weiterhin durch die Reaktion von p-Chlorbenzaldehyd mit Lumiflavin (Ia) in konz. H₂SO₄ belegt, welche zu einem 8α -substituierten Derivat mit benzochinoidem Chromophor führte, für das wir die Struktur Va vorschlugen.

Eingehenderes Studium dieser Reaktion hat nun diese Erwartung bestätigt. Man muss annehmen, dass Va sich über ein intermediäres Aldol des Typus III und intramolekulare Oxydoreduktion (H-Verschiebung) zu IV bildet, welches sich seinerseits beim Aufarbeiten an der Luft zu V oxydiert. Man beobachtet bei der Kondensation einen langsamen Farbumschlag von Rot nach Grün, der bei Luftzutritt ausbleibt. Für diese Oxydation wäre demnach nicht, wie wir zunächst vermuteten²⁾, freies SO₃ des Milieus verantwortlich.

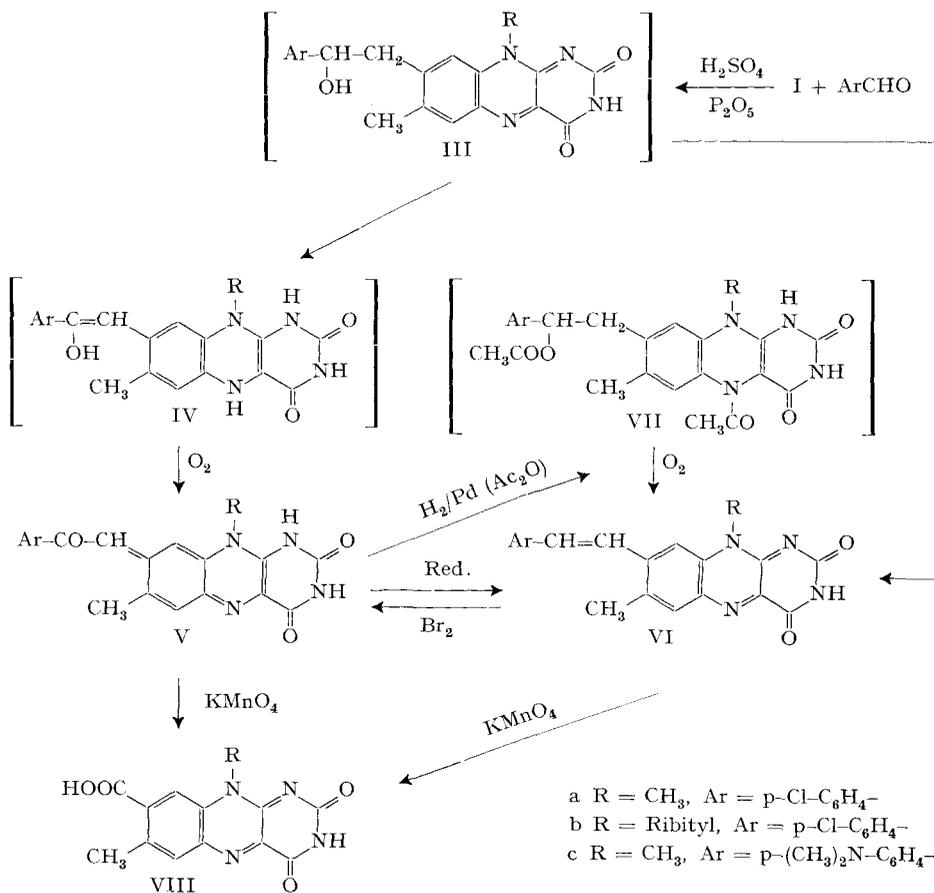
Vom hypothetischen Zwischenprodukt III muss erwartet werden, dass es sich unter Wasserabspaltung zum Styrol VI stabilisieren könne. Wir haben daher zunächst die roten, aus Lumiflavin (Ia), bzw. Riboflavin (Ib) erhaltenen Verbindungen Va, b in Eisessig-Acetanhydrid mit Pd auf Kohle hydriert. Die rohen, sehr empfindlichen Leukokörper der vermutlichen Struktur VII überliessen wir der Autoxydation in alkalischem Milieu. Dabei erhielten wir orangegelbe Produkte, welche auf Grund von Elementar- und Gruppen-Analysen als die gesuchten Styrole VI anzusprechen waren. Diese Struktur wird weiter durch die UV.-Spektren, die wir weiter unten diskutieren, belegt, sowie durch die Rücküberführung von VI in V beim Kochen mit Br₂ in Eisessig. Sowohl Va wie VIa ergeben beim oxydativen Abbau mit KMnO₄ als Hauptprodukt 7,10-Dimethyl-isoalloxazin-8-carbonsäure (VIII, R = CH₃), welche chromatographisch identisch ist mit dem früher von uns aus Lumiflavin und HONO²⁾ erhaltenen Material.

¹⁾ VII: P. BAMBERG, P. HEMMERICH & H. ERLNMEYER, *Helv.* 43, 395 (1960).

²⁾ P. HEMMERICH, B. PRIJS & H. ERLNMEYER, *Helv.* 42, 2164 (1959).

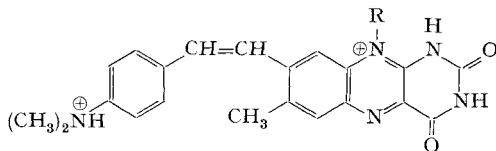
³⁾ Vgl. R. HUISGEN, *Liebigs Ann. Chem.* 559, 126 (1948), sowie T. TSURUTA, T. FUENO & J. FURUKAWA, *J. Amer. chem. Soc.* 77, 3265 (1955).

Reaktionsschema

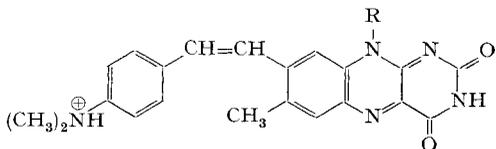


Farbe und Struktur von VIc in Abhängigkeit von pH und Lösungsmittel-Polarität.

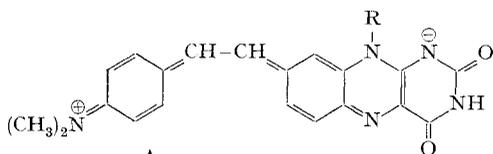
Es wird jeweils die wahrscheinlichste Mesomerie-Formel angeben.



Di-kation, orangegelb, ohne Fluoreszenz
 λ_{max} (HCOOH) 288, 460 m μ ;
 entsprechend Riboflavin-kation,
 λ_{max} (HCOOH) 266, 390 m μ

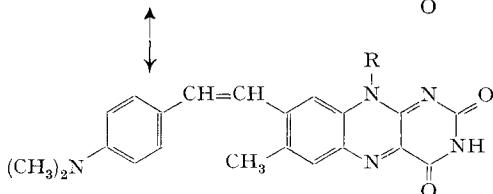


Mono-kation, orangegelb, gelbgrüne Fluoreszenz (VIc.HClO₄ in 6N CH₃COOH)
 λ_{max} 268, 286, 462 m μ ;
 entsprechend Riboflavin neutral,
 λ_{max} 268, 372, 445 m μ



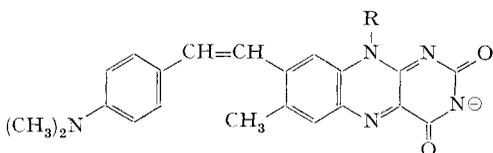
Neutralkörper, blau-violett, ohne Fluoreszenz, polar

λ_{\max} (C₂H₅OH) 288, 354, 554 m μ



Neutralkörper, rot, ohne Fluoreszenz, unpolar

λ_{\max} (Benzol) 278, 332, 524 m μ



Anion, violett, ohne Fluoreszenz (äthanol-NaOH)

λ_{\max} 272, 352, 512 m μ ;

entsprechend Riboflavin-Anion,

λ_{\max} 270, 358, 450 m μ

Ob bei der Kondensation von I mit Aldehyden Produkte des Typs V oder VI erhalten werden, hängt von der Natur der Aldehyd-Komponente ab. Bei Verwendung von Ia und Dimethylaminobenzaldehyd isolierten wir in ausgezeichneter Ausbeute ausschliesslich das in neutraler Lösung tiefblaue Styryl VIc. Dieses lässt sich mit Br₂ in Eisessig zum orangegelben Vc oxydieren. Das mittels Dünnschicht-Chromatographie vom Ausgangsprodukt abgetrennte Vc liess sich jedoch nicht in kristalliner Form rein erhalten, da die Lösungen in Abwesenheit von Oxydationsmittel langsam wieder blaue Farbe annehmen, was vermutlich auf Photoreduktion zurückzuführen ist. Mit Reduktionsmitteln wird das blaue VIc aus Vc quantitativ zurückerhalten.

Allgemein sind die «benzochinoiden» Flavine vom Typus V durch je eine Absorptionsbande im sichtbaren und im ultravioletten Bereich gekennzeichnet. Die sichtbare Bande erfährt bei Protonisierung der Farbstoffe nur eine schwache bathochrome Verschiebung, das Gesamtspektrum bleibt fast konstant. Die Variation des Substituenten Ar in V hat nur wenig Einfluss auf das Spektrum, es besteht nur schwache Resonanz zwischen Flavinkern und Seitenkette. Der rote Typus V unterscheidet sich damit grundlegend vom «pyrimidochinoiden» Flavin-Typ I.

Diesem letzteren Typus gehören die Styrylflavine VI an: Diese weisen in der Neutralform ebenso wie Riboflavin (Ib) neben der ultravioletten zwei langwellige Banden auf, deren Lage vom Substituenten Ar stark beeinflusst wird, da der Phenylkern der Seitenkette mit dem Flavinkern in Resonanz steht. Bei der Protonisierung verschwindet die kürzerwellige dieser beiden Banden, während die längerwellige stark hypsochrom verschoben wird.

Von besonderem Interesse ist wiederum das Dimethylaminoderivat VIc: Mit steigendem pH lassen sich hier vier verschiedene Spektren unterscheiden, welche dem Di-kation, dem Mono-kation, dem Neutralkörper und dem Anion zuzuordnen sind. Bemerkenswert ist weiterhin die stark positive Solvatochromie von VIc (vgl. Tabelle).

Die interessanten photochemischen, koordinationschemischen und Charge-transfer-Eigenschaften von V und VI sind Gegenstand unserer laufenden Untersuchungen.

Herrn Professor Dr. H. ERLIENMEYER danke ich für sein Interesse an dieser Arbeit sowie dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG für die gewährte Unterstützung. Fräulein E. ROMMEL bin ich für die selbständige Ausführung der chromatographischen und spektrophotometrischen Versuche zu grossem Dank verpflichtet.

Experimenteller Teil

Chromatographie: Es kamen WHATMAN-Papier Nr. 1 und Dünnschichten von Kieselgel G MERCK zur Anwendung. Zu Identifizierungen wurden jeweils Dünnschicht- und Papier-Chromatogramme in je zwei Fliessmitteln ausgeführt. Angegebene Rf-Werte beziehen sich auf WHATMAN Nr. 1 aufsteigend, 14 Std. bei 20°, Eisessig/Wasser/n-Butanol 2:2:6. Bezugswert: Lumiflavin = 0,46.

Spektren wurden mit einem UNICAM-Gerät SP 500 aufgenommen. (K) steht für «Kation, aufgenommen in abs. HCOOH». (N) steht für «Neutralkörper, aufgenommen in wässrigem Dimethylformamid, pH 6–8». Wellenlängen in $m\mu$, eingeklammerte Werte beziehen sich auf Schultern.

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Substanzen zur Analyse 12 Std. bei 120°/0,01 Torr getrocknet. Auch unter diesen Bedingungen halten die kondensierten Isoalloxazine oft Lösungsmittel zurück, während bei höherer Temperatur Zersetzung beginnt. Die scharf getrockneten Proben sind meist stark hygroskopisch und schwer verbrennbar, was sich auf die Genauigkeit der Bestimmungen auswirkt.

Kondensation von Isoalloxazinen mit aromatischen Aldehyden. – 1 Teil fein verriebenes 8-Methyl-isoalloxazin wird mit 20 Teilen konz. H_2SO_4 ca. 1 Std. geschüttelt, bis eine homogene, tiefrote Lösung entstanden ist. Man trägt unter Kühlung 1 Teil ArCHO und darauf 5 Teile P_2O_5 ein und lässt 4–6 Wochen unter Stickstoff bei Raumtemperatur stehen. Zum Aufarbeiten giesst man auf Eiswasser und filtriert den sofort oder nach vorsichtigem Neutralisieren mit NH_4OH ausfallenden Niederschlag durch ein Glasfilter, bei schwammigen Niederschlägen unter Zusatz von Kieselgel. Nach sorgfältigem Auswaschen mit 2N NaOH, 2N Essigsäure und Äthanol kristallisiert man aus konz. Perchlorsäure oder Ameisensäure um. Die Na-Salze der kondensierten Verbindungen sind wasserunlöslich.

Die Roh-Ausbeuten sind stark von ArCHO abhängig: p-Cl- C_6H_4 -CHO und p- $(CH_3)_2N-C_6H_4$ -CHO reagieren fast quantitativ, p-HO- und p- $CH_3O-C_6H_4$ -CHO zeigen daneben starke Verharzung, Pyridin-carboxaldehyde reagieren unvollständig. In letzteren Fällen gelingt die Reinigung nur durch präparative Dünnschichtchromatographie aus stark sauren Lösungsmittel-Gemischen, vorzugsweise 2N $HClO_4$ /Dimethylsulfoxyd/n-Butanol 2:2:6. Wir haben im einzelnen nur die folgenden gut kristallisierten Verbindungen dieser Reihe näher untersucht:

1. 8α -(p-Chlorbenzoyl)-lumiflavin (Va): Das schon früher beschriebene Präparat²⁾ zeigte nach nochmaliger Kristallisation aus HCOOH und Trocknung bei 180°/0,01 Torr die nunmehr exakt auf Va zutreffenden Analysenwerte. Rf = 0,48; λ_{max} 262, (295), 480 (K).

$C_{20}H_{15}O_3N_4Cl$	Ber. C 60,8	H 3,8	N 14,2	Cl 9,0%
	Gef. „ 60,8	„ 3,8	„ 14,5	„ 9,2%

2. 8α -(p-Chlorbenzoyl)-riboflavin (Vb): Kristallisiert aus 60-proz. $HClO_4$ in violetten, bronze-glänzenden Blättchen. Die Säure lässt sich daraus mit verd. Alkohol vollständig auswaschen, wobei Farbumschlag nach Rotorange eintritt. Rf = 0,27; λ_{max} 268, (290), 480 (K); 271, (290), 469 (N).

$C_{24}H_{23}O_7N_4Cl$	Ber. C 56,0	H 4,5	N 10,9	Cl 6,9%
	Gef. „ 55,8	„ 4,8	„ 10,4	„ 7,2%

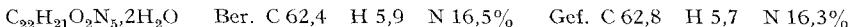
3. 8α -(p-Dimethylaminobenzal)-lumiflavin (VIc): Kristallisiert aus 60-proz. $HClO_4$ in roten, weichen Fasern (Di-perchlorat), welche beim Waschen mit Aceton in karminrote Stäbchen zerfallen (Mono-perchlorat). Chromatographisch rein aus HCOOH/Äthanol in karminroten Stäbchen (Monoperchlorat-Formiat). HCOOH lässt sich bei 120°/0,01 Torr nur zur Hälfte ent-

fernen – wie bei Flavinen allgemein der Fall⁴⁾ –, bei höherer Temperatur beginnt allmählich die Zersetzung. Rf = 0,14; Lichtabsorption vgl. Tabelle.



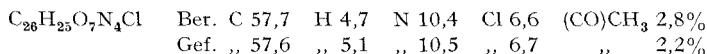
VIc ist in polaren organischen Lösungsmitteln relativ gut löslich. In NaOH löst es sich zunächst hellviolett, dann fällt das Na-Salz aus.

Wäscht man aus dem obigen Analysenpräparat die Säure mit verd. wässer. Na-Acetat aus, so erhält man stark hygroskopische, dunkelblaue Körner, welche nach üblicher Trocknung 2 Molekeln Wasser enthalten und sich oberhalb 150° langsam zersetzen:



Beim Kochen mit Perhydrol oder Brom in Eisessig tritt Aufhellung von Blauviolett nach Gelb ein. Die beim Abkühlen erhaltenen gelben Kristalle (Vc) sind chromatographisch nicht ganz rein. Beim Umkristallisieren tritt Rückbildung von blauem VIc ein, welches chromatographisch identifiziert wurde. Zur spektrophotometrischen Charakterisierung wurde das rohe Vc auf Kieselgel-Dünnschicht mit Eisessig/Wasser/n-Butanol 2:2:6 als Fließmittel chromatographisch gereinigt und die orangefarbene, stark gelbgrün fluoreszierende Hauptbande mit HCOOH bzw. HCON(CH₃)₂ bei 20° eluiert. Rf = 0,23; λ_{max} 272, 452 (K); 270, 470 (N).

4. 8α-(*p*-Chlorbenzal)-riboflavin (VIb): Rohes Vb wurde in Eisessig-Acetanhydrid-1:1-Gemisch 6 Std. bei 80° mit 10-proz. Pd-Kohle als Katalysator hydriert. Nach Filtration und Eindampfen im Vakuum nahm man mit Wasser auf. Wegen der Hydrolysen-Empfindlichkeit des hellgelben Niederschlags von Acetyl-Leukokörper wurde auf eine Reinigung verzichtet. Man löste in lauwarmer 2N NaOH und liess nach halbstündigem Stehen bei 50° an der Luft über Nacht kristallisieren. Das ausgeschiedene gelbe Na-Salz wurde zunächst aus 6N Essigsäure, dann aus viel Äthanol kristallisiert, wobei man den orangefarbenen Flavin-Neutralkörper der Zusammensetzung Monoacetyl-VIb erhielt:



In gleicher Weise erhielt man VIa aus Va: Rf = 0,72; λ_{max} 266, 400, (500) (K); 274, 348, 444 (N). VIa geht bei kurzer Behandlung mit Br₂ in heissem Eisessig wieder in das rote Va über, wie die chromatographische Identitätsprüfung zeigt. Verwendet man KMnO₄ statt Br₂, so tritt irreversible Abspaltung der Seitenkette ein; man findet als Hauptprodukt die Isoalloxazin-8-carbonsäure VIII, chromatographisch identisch mit authentischem Material²⁾.

Dem Mikroanalytischen Laboratorium der CIBA-AKTIENGESELLSCHAFT (Dr. H. GYSEL und W. PADOWETZ) sind wir für die Ausführung der schwierigen Elementaranalysen zu grossem Dank verpflichtet.

SUMMARY

Riboflavin and lumiflavin are shown to undergo condensations with aromatic aldehydes, giving rise to 8α-substituted derivatives with peculiar oxido-reductive properties, which are outlined.

Anstalt für Anorganische Chemie der Universität Basel

⁴⁾ Vgl. R. KUHN & K. REINEMUND, Ber. deutsch. chem. Ges. 67, 1932 (1934).