

beschrieben. Im Harn finden sich ebenfalls Farbstoffe der neuen Gruppe. Mit ihrer Isolierung sind wir beschäftigt.

Zusammenfassend handelt es sich um im Tierkörper vorkommende Farbstoffe, die in Wasser löslich und in indifferenten Lösungsmitteln unlöslich sind, die mit gelb-grünem Licht fluorescieren, und deren Molekül viel Stickstoff und Sauerstoff enthält. Wir schlagen für diese Farbstoffgruppe den Namen „Lyochrome“ vor.

Für die Arbeit standen Mittel aus der Ella-Sachs-Plotz-Foundation zur Verfügung.

60. Richard Kuhn, Paul György und Theodor Wagner-Jauregg: Über eine neue Klasse von Naturfarbstoffen (Vorläufige Mitteilung).

[Aus dem Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizin. Forschung Heidelberg, Institut für Chemie. u. aus d. Kinder-Klinik d. Universität Heidelberg.]

(Eingegangen am 14. Januar 1933.)

Die Bearbeitung eines neuen Haut-Faktors (Vitamin H)¹⁾ hat die chemische und biologische Differenzierung vom Vitamin B₂ erforderlich gemacht, das als Pellagra-Faktor ebenfalls zu Haut-Erkrankungen in Beziehung stehen soll. Die vorliegenden Erfahrungen stellen die Verschiedenheit beider Nahrungs-Ergänzungstoffe außer Frage. Das Vitamin H ist, wie die besten, bisher dargestellten Präparate¹⁾ (Wirksamkeit 5 γ pro Tag und Ratte) zeigen, farblos. Bei der Untersuchung des Vitamins B₂ haben wir dagegen die auffallende Beobachtung gemacht, daß genügend gereinigte Lösungen leuchtend gelbe Farbe und intensiv grüne Fluoreszenz zeigen. Für das Vitamin B₂ ist Adsorption aus saurer Lösung an Fuller-Erde bekannt²⁾. Die Adsorbate lassen sich, wie wir gefunden haben, durch verdünntes Pyridin oder Ammoniak, vorteilhaft unter Zusatz von Alkohol, eluieren. Durch Zusatz von Alkohol oder Aceton zu den von Pyridin befreiten Elutionen werden Begleitstoffe so weit ausgefällt, daß die gelbe Farbe und grüne Fluoreszenz rein zutage treten. Mit steigender biologischer Wirksamkeit (B₂) nimmt in allen bisher untersuchten Fällen auch die Farbstärke zu; Lösungen, die durch irgendwelche Operationen Farbe und Fluoreszenz verloren hatten (Ausnahme: Reduktion mit Hydro-sulfit, vergl. Fußnote 7), haben sich im Tierversuch immer wieder als wirkungslos erwiesen. Besonders auffallend ist der Zusammenhang zwischen der Verbreitung des Vitamins B₂ im Tier- und Pflanzenreich und der Verbreitung gelber, grün fluoreszierender, wasser-löslicher Farbstoffe. Von tierischen Organen sind reich an Vitamin B₂ und an solchen Farbstoffen Leber, Herz und Niere. Die Skelett-Muskulatur ist ärmer an Vitamin und Farbstoff als die eben angeführten Organe, aber farbstoff-reicher

¹⁾ P. György, Ztschr. ärztl. Fortbild. 28, 377 [1931]; vergl. auch W. Stepp-J. Kühnau im Handbuch d. norm. u. pathol. Physiol. XVIII, 140 [1932], Berlin. P. György, R. Kuhn u. E. Lederer, unveröffentlicht.

²⁾ Literatur bei E. Browning, The vitamins, London 1931, S. 294.

und wirksamer als die glatte Muskulatur des Uterus. Beim Huhn enthalten die Bein-Muskeln mehr Vitamin B₂ als die Brust-Muskulatur. Unterschiede im B₂-Gehalt der Milch verschiedener Herkunft finden sich im Gehalt an Farbstoff, der in die Molke übergeht, wieder. Ein Vergleich von Frauenmilch und Kuhmilch ergab z. B. für das Verhältnis des B₂-Gehaltes 1 : 2. Dasselbe Verhältnis wurde colorimetrisch für die aus den entsprechenden Molken durch Adsorption an Fuller-Erde und Elution gewonnenen Farbstoff-Lösungen gefunden. Im Hühnerei findet sich Vitamin B₂ zu einem beträchtlichen Teil im Eiklar, das nahezu farblos erscheint. Wir haben in frischem Eiklar und in Eier-Albumin (Handelsprodukt) die Anwesenheit wasser-löslicher, gelber, grün fluoreszierender Farbstoffe festgestellt, von denen einer in schön krystallisierter Form erhalten wurde (Ovoflavin).

Im Pflanzenreich sind verschiedene grüne Blätter, insbesondere Spinat, als Quelle des Vitamins B₂ bekannt. Nach unseren Feststellungen finden sich auch im Spinat und in Tomaten gelbe, grün fluoreszierende Farbstoffe. Dasselbe trifft für das bekannteste B₂-Material, die Hefe, zu. Die aus Hefe gewonnenen, durch Adsorption an Fuller-Erde und Elution gereinigten Farbstoff-Lösungen haben sich als sehr vitamin-reich erwiesen.

Die Frage, ob das Vitamin B₂ selbst Farbstoff ist, kann erst durch die Isolierung entschieden werden. Für die Farbstoff-Natur spricht, daß das Vitamin B₂, wie wir gefunden haben, licht-empfindlich ist. In gereinigten Lösungen wird es schon durch sichtbares (blaues, violettes) Licht verhältnismäßig leicht unter Entfärbung zerstört³⁾. Die photochemische Inaktivierung wurde nach Ausschaltung des Ultravioletts (Diphenylbutadien in Dekalin) an gereinigten B₂-Lösungen aus Milch, Herz und Eier-Albumin und im Kochsaft von Rinder-Muskel übereinstimmend festgestellt. Gegen die Annahme der Farbstoff-Natur scheint zu sprechen, daß durchaus nicht alle Farbstoff-Fractionen wirksam sind. Eine mögliche Erklärung dafür liefert die Erkenntnis, daß eine ganze Gruppe ähnlicher Farbstoffe im Tier- und Pflanzenreich vorkommt, von denen vielleicht nur einer oder wenige in Beziehung zum Vitamin B₂ stehen, ähnlich wie in der Gruppe der natürlichen Carotin-Farbstoffe nur α -, β - und γ -Carotin als Provitamine A erkannt sind.

Die zur neuen Gruppe gehörenden natürlichen Farbstoffe sind stickstoff-haltig und wasser-löslich. Sie sind unlöslich in Äther, Petroläther und Benzin, wodurch sie leicht von Carotin-Farbstoffen abgetrennt werden können. Ein im Eier-Albumin vorkommender Farbstoff läßt sich der konz. wäßrigen Lösung durch Butyl- oder Amylalkohol und Cyclohexanol entziehen und fluoresciert in diesen Lösungsmitteln besonders stark grün. Die Farbstoffe besitzen amphoteren Charakter. Von den Metallsalzen sind vielfach die Silbersalze durch geringe Löslichkeit ausgezeichnet und zur Isolierung geeignet. Die amphotere Natur kommt in der p_H-Abhängigkeit der Fluorescenz deutlich zum Ausdruck, die auf Zusatz von Alkalien und Mineralsäuren verschwindet. In alkalischer Lösung bleibt die gelbe Farbe ohne wesentliche Änderung erhalten, durch starke Mineralsäuren wird sie reversibel zum Verschwinden gebracht.

³⁾ Wenn das Vitamin nicht Farbstoff ist, so muß man an eine Sensibilisierung durch die grün fluoreszierenden Pigmente denken.

Von allen bekannten Naturfarbstoffen steht optisch den vorliegenden Pigmenten am nächsten das Xanthopterin, das H. Wieland und C. Schöpf⁴⁾ aus den Flügeln des Citronen-Falters isoliert haben, wie folgende Gegenüberstellung zeigt:

Farbstoff des	Farbe	5-n. HCl (1:1)	10-n. Essig- säure	Wasser (neutral)	verd. NH ₃	2-n. NaOH
Citronen-Falters	Fluorescenz	—	+	+	+	+
Farbstoffe aus	Farbe	—	+	+	+	+
Eier-Albumin ⁵⁾	Fluorescenz	—	+	+	—	—

Die blaugrüne Fluorescenz des Xanthopterins wird schon durch Eisessig zum Verschwinden gebracht, was für eine stärkere basische Natur spricht. Hrn. H. Wieland sind wir zu sehr großem Danke verpflichtet für die freundliche Überlassung von Xanthopterin und Citronen-Faltern, die einen unmittelbaren Vergleich ermöglicht haben. Ein Hauptunterschied gegenüber den hier behandelten Pigmenten liegt in der außerordentlich geringen Löslichkeit des Xanthopterins in Wasser. An B₂-frei ernährten Ratten ist Xanthopterin in täglichen Mengen von 400 γ wirkungslos. Wirkungslos sind auch die gesamten Flügel von Citronen-Faltern (entsprechend 1 Schmetterling pro Tag und Ratte). Im Ultraviolett zeigt Xanthopterin zwei Absorptionsmaxima bei 243 m μ und 267 m μ , an der Grenze des Sichtbaren eine niedrigere Doppelbande (360 und 391 m μ). Ein von uns isoliertes Farbstoff-Präparat aus Rinderherz (N = 30.0 %) ergab im Ultraviolett eine Absorptionskurve, die mit derjenigen des Xanthopterins (N = 36.6 %) fast zur Deckung zu bringen ist (Maxima bei 242 und 267 m μ), im Sichtbaren ein niedrigeres Band bei 445 m μ . Die langwellige Bande einer aus Leber gewonnenen Lösung besaß ihr Maximum bei 437 m μ . Ovoflavin aus Eier-Albumin (N = 15.9 %) besitzt zwei langwellige Absorptionsmaxima (360 und 440 m μ).

Charakteristisch für die neuen Farbstoffe ist das Reduktions-Oxydations-Verhalten, insbesondere die folgende Hydrosulfit-Brom-Reaktion: Die wäßrige, gelbe, grün fluoreszierende Lösung (aus Leber, Herz, Hefe, Eier-Albumin, Milch u. a.) wird mit etwas 2-n. Soda versetzt, wobei die Fluorescenz verschwindet, aber die Farbe erhalten bleibt. Fügt man einige Tropfen verd. Natrium-hydrosulfit (Na₂S₂O₄)-Lösung zu, so erfolgt Entfärbung. Man säuert nun mit 2-n. Schwefelsäure an und gibt tropfenweise Bromwasser zu. Dabei kehrt die gelbe Farbe, nach Abstumpfen mit Natriumacetat auch die grüne Fluorescenz zurück⁶⁾. Die Leukofarbstoffe lassen sich auch durch Methylenblau dehydrieren⁷⁾. Das Xanthopterin wird unter den beschriebenen Bedingungen durch Hydrosulfit nicht entfärbt. Auffallend ist, daß die hier beschriebenen Farbstoffe durch Kochen mit Bromwasser nicht zerstört werden. Farbgebend sind offenbar konjugierte >C:N-Bindungen.

Für die Bestimmung der B₂-Wirksamkeit diente die von A. Bourquin und H. C. Sherman⁸⁾ angegebene Grundkost. Als Einheit wurde jene

⁴⁾ B. 58, 2178 [1925]. ⁵⁾ Dasselbe gilt für die Farbstoffe aus Leber, Herz und Hefe.

⁶⁾ Überschüssiges Brom kann durch Wegkochen oder durch Ausschütteln mit Chloroform entfernt werden.

⁷⁾ Vielleicht erfolgt eine Dehydrierung auch im Organismus, da mit Hydrosulfit reduzierte Lösungen im Tierversuch mitunter wirksam waren.

⁸⁾ Journ. Amer. chem. Soc. 53, 3501 [1931].

Vitamin-Menge betrachtet, die in 30 (14) Tagen eine Gewichtszunahme der Ratten um 40 (20) g bewirkte. Von einem aus Eier-Albumin isolierten Farbstoff-Präparat genügten etwa 100 γ pro Tag. Für das beste B₂-Präparat der Literatur⁹⁾ werden 500 γ angegeben.

Im Cytoflav von J. Banga und A. Szent-Györgyi¹⁰⁾ und in der Farbstoff-Komponente eines Oxydations-Fermentes von O. Warburg und W. Christian¹¹⁾ sind bereits Farbstoffe beschrieben, die offenbar zu der hier behandelten Gruppe gehören; dasselbe gilt für den Farbstoff der Molke (Lactochrom)¹²⁾. Die eiweiß-freie Farbstoff-Komponente des Fermentes von O. Warburg zeigt ein Maximum der Licht-Absorption bei 445 μ in Übereinstimmung mit dem von uns aus Herz-Muskel erhaltenen Farbstoff. Das thermolabile Ferment der Hefe ist von dem kochbeständigen Vitamin B₂ sicherlich verschieden. Die Farbstoff-Komponenten gehören anscheinend zur selben Gruppe. Auch unsere B₂-Lösungen geben nach Belichtung in alkalischer Lösung und Ansäuern Farbstoff an Chloroform ab, wie es O. Warburg und W. Christian für die Farbstoff-Komponente des Fermentes beschrieben haben.

Als chemischen Gruppen-Namen schlagen wir die Bezeichnung Flavine vor. Dem in Amylalkohol löslichen, schön krystallisierenden Farbstoff aus Eier-Albumin geben wir entsprechend den Namen Ovoflavin.

61. Ernst Simon: Zur Frage der Existenz isomerer 2,4-Dinitrophenyl-hydrazone.

(Eingegangen am 16. Dezember 1932.)

In der Abhandlung von H. Bredereck¹⁾ findet sich der Satz: „Bisher ist das Auftreten isomerer Dinitrophenyl-hydrazone nie beobachtet worden“. Demgegenüber möchte ich darauf hinweisen, daß ich für das von ihm angeführte Beispiel des Furfurols und ferner für das α -Methyl-furfurol die gleiche Beobachtung vor $\frac{3}{4}$ Jahren²⁾ beschrieben und gleichzeitig angegeben habe, daß es sich um verschiedene Modifikationen der gleich zusammengesetzten Körper handelt. Daß der von A. Purgotti³⁾ angegebene Schmelzpunkt (202°) des Furfurol-2,4-Dinitrophenyl-hydrazone nicht der höchst erreichbare ist, habe ich gleichfalls vermerkt. Für die hoch schmelzende, dunkelrote Form fand ich Schmp. 222°, während Bredereck 230° angibt. Diese Differenz dürfte nur durch verschieden schnelles Erhitzen bedingt sein.

⁹⁾ J. C. Drummond u. M. White, zitiert bei J. C. Drummond, Recent research on the nature and function of vitamins, Royal Soc. of arts, London 1932.

¹⁰⁾ Biochem. Ztschr. **246**, 203 [1932].

¹¹⁾ Biochem. Ztschr. **254**, 438 [1932]; Naturwiss. **20**, 980 [1932].

¹²⁾ z. B.: B. Bleyer u. O. Kallmann, Biochem. Ztschr. **155**, 54 [1925].

¹⁾ B. **65**, 1835 [1932].

²⁾ Biochem. Ztschr. **247**, 171 [1932]; C. **1932**, I 3472. ³⁾ C. **1894**, II 433.

Berichtigungen.

Jahrg. **65** [1932], Heft 5, S. 798, 94 mm v. o. ist „ps“ zu streichen.

Jahrg. **65** [1932], Heft 5, S. 798, 102 mm v. o. lies „169“ statt „194“ und „194“ statt „169“.