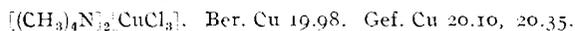


schieden sich, wie aus der schwankenden Zusammensetzung der Präparate hervorging, Gemische aus, vermutlich Gemische des Trichloro-dicupraats, das sich bei dem Mengen-Verhältnis 1:1 bildet, mit dem Tetramethylammonium-trichlorocupraat, das aus Lösungen mit dem Mengen-Verhältnis 1:6 sich abscheidet. Das letztgenannte Salz schmilzt, nach vorherigem Sintern, bei 112–115<sup>0</sup> zu einer braunen Flüssigkeit.



## 120. Richard Kuhn, Paul György und Theodor Wagner-Jauregg: Über Ovoclavin, den Farbstoff des Eiklars.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für medizin. Forschung, Institut für Chemie, Heidelberg u. aus d. Kinder-Klinik d. Universität Heidelberg.]  
(Eingegangen am 20. März 1933.)

Isolierung: Die schwach gelbliche Färbung des Eiklars ist bedingt durch einen Farbstoff, der als Ovoclavin bezeichnet worden ist<sup>1)</sup>. Der Farbstoff läßt sich dem frisch geschlagenen Eiklar durch Methanol entziehen und auf diese Weise auch aus käuflichem getrockneten Eier-Albumin, frei von dem außerordentlichen Überschuß an Proteinen, in Lösung bringen.

Aus den gelben, grün fluorescierenden Methanol-Auszügen wird der Farbstoff nach Ansäuern durch Fullererde adsorbiert und das Adsorbat durch verd. Pyridin eluiert. Man wiederholt die Adsorption an Fullererde in neutraler Lösung. Zur weiteren Reinigung wird der Farbstoff durch Silbernitrat gefällt und das braunrote Silbersalz durch Schwefelwasserstoff zerlegt. Aus 2-n. Essigsäure krystallisiert das Ovoclavin in schön ausgebildeten, schmalen Nadeln, die nahezu gerade Auslöschung zeigen und mitunter büschelig verwachsen oder auch zu Drusen vereinigt sind. Die Farbe der Präparate ist orange, derjenigen des Diphenyl-dekapentaens sehr ähnlich. Beim Erhitzen im zugeschmolzenen Röhrchen findet von etwa 240<sup>0</sup> an Dunkelfärbung statt. Bei 265<sup>0</sup> (Berl-Block) zersetzt sich der Farbstoff unter Gasentwicklung. In Chloroform und Äther ist Ovoclavin bei jedem p<sub>H</sub> unlöslich. Aus konz. wäßriger Lösung läßt es sich durch Butyl- oder Amylalkohol und Cyclohexanol ausschütteln. Farbstoff-Präparate aus Hefe, Herz und Leber verhalten sich gleichartig. Das Verteilungsverhältnis liegt in jedem Fall sehr zugunsten der wäßrigen Lösung.

30 kg getrocknetes Eier-Albumin, entsprechend etwa 10000 Eiern, enthalten mindestens 180 mg Farbstoff (colorimetrisch bestimmt nach der ersten Adsorption an Fullererde). Daraus sind 30 mg 3-mal umkrystallisiertes Ovoclavin erhältlich.

Zusammensetzung: Ovoclavin enthält weder Schwefel noch Phosphor. Die für C, H und N gefundenen Werte stimmen für Präparate verschiedener Darstellungen noch nicht genau überein. Sie sind annähernd mit der Formel C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> vereinbar. Unter der Annahme, daß bei der gelinden katalytischen Hydrierung mit Palladium (s. u.) 1 Mol. Wasserstoff verbraucht wird, müssen jedoch 4 Stickstoffatome im Molekül vorhanden sein. Danach kämen die Formeln C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>, C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> und ähnliche in Betracht.

<sup>1)</sup> R. Kuhn, P. György u. Th. Wagner-Jauregg, B. 66, 317 [1933]. — Ähnliche Farbstoffe aus Molke haben gleichzeitig Ph. Ellinger u. W. Koschara, B. 66, 315 [1933], unter dem Namen „Jyochrome“ beschrieben.

Hydrierung: 1.505 mg Ovoflavin wurden in 0.25 ccm  $n/_{10}$ -NaOH gelöst und mit 17 mg Palladiumoxyd (reduziert) in Wasserstoff bei 25° geschüttelt. Nach 10 Min. waren 95.8 cmm Wasserstoff aufgenommen und vollkommene Konstanz erreicht. Unter Annahme der Formel  $C_{16}H_{20}N_4O_6$  sind 1.03 Mole Wasserstoff aufgenommen worden. Die grüngelb gefärbte Lösung nahm beim Schütteln mit Luft ihre anfängliche, intensiv orange-gelbe Farbe wieder an.

Hydriert man mit Platinoxid, so geht die Wasserstoff-Aufnahme weiter. Nach Aufnahme von 3 Molen  $H_2$  war die Lösung vollkommen entfärbt. Beim Schütteln mit Luft kehrte die ursprüngliche Farbe zurück.

Absorptionsspektrum: Ovoflavin stimmt spektroskopisch auffallend nahe überein mit einem Farbstoff  $C_{12}H_{12}N_4O_2$ , den O. Warburg u. W. Christian<sup>2)</sup> aus der Farbstoff-Komponente eines gelben Oxydations-Fermentes aus Hefe durch Belichten in alkalischer Lösung gewonnen haben. O. Warburg und W. Christian<sup>3)</sup> haben das Absorptionsspektrum ihres Präparates in Chloroform-Lösung gemessen. Da unser Farbstoff in Chloroform unlöslich ist, wurde zum Zwecke eines unmittelbaren Vergleichs der kristallisierte, chloroform-lösliche Farbstoff aus Hefe, für dessen Überlassung wir Hrn. O. Warburg zu sehr großem Danke verpflichtet sind, auch in wäßriger Lösung licht-elektrisch photometriert<sup>4)</sup>. Das Ergebnis des Vergleichs ist aus Figur 1 ersichtlich.

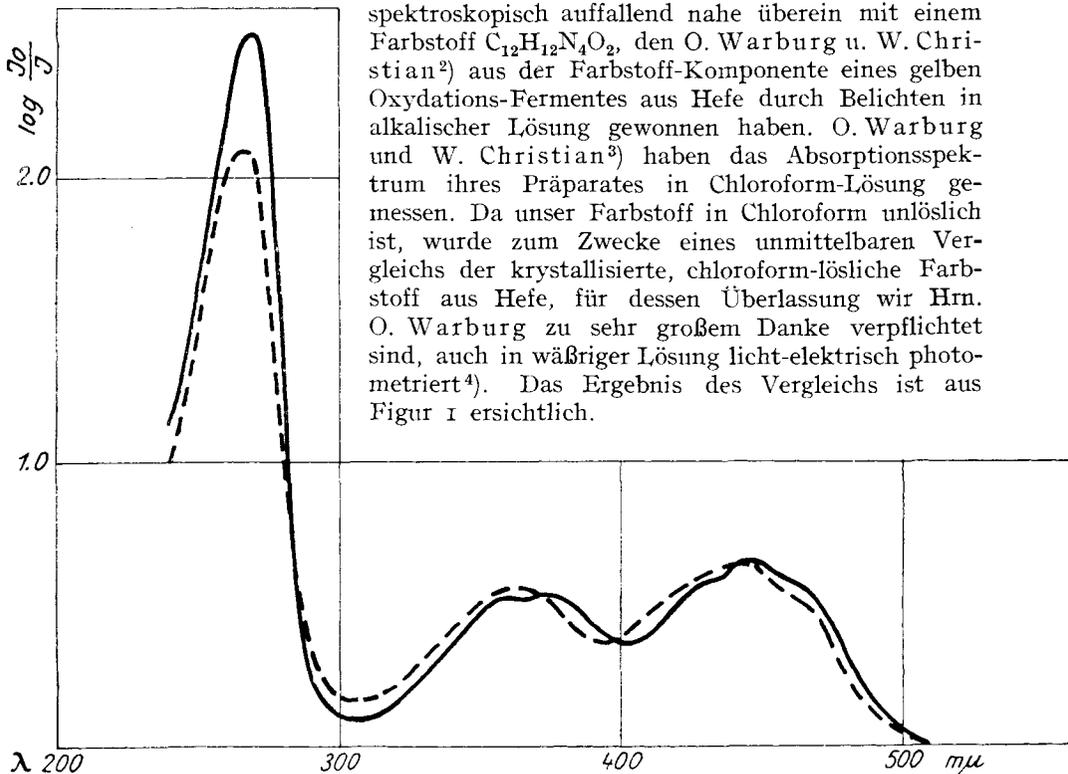


Fig. 1. Absorptionsspektren der 0.005-proz. Lösungen in Wasser.  $d = 0.508$  cm.  
 — Farbstoff aus Eiklar      - - - - Umgelagerter Farbstoff aus Hefe.

Die maximalen molaren Extinktionskoeffizienten für Ovoflavin  $\kappa = 2.30/c \times d \log J_0/J$  betragen unter Annahme des Molekulargewichts 364:

$\lambda = 446$ m $\mu$	$\kappa = 2.11 \times 10^4$
$\lambda = 366$ m $\mu$	$\kappa = 1.75 \times 10^4$
$\lambda = 267$ m $\mu$	$\kappa = 8.5 \times 10^4$

<sup>2)</sup> Naturwiss. 20, 980 [1932]; Biochem. Ztschr. 257, 492 [1933].

<sup>3)</sup> Biochem. Ztschr. 258, 496 [1933].

<sup>4)</sup> Wir verdanken die Messungen der Freundlichkeit von Hrn. K. W. Hausser.

Für die Chloroform-Lösung des Hefe-Farbstoffs ergibt die Messung von O. Warburg und W. Christian:

$\lambda = 452 \text{ m}\mu$	$\kappa = 2.58 \times 10^4$
$\lambda = 350 \text{ m}\mu$	$\kappa = 1.94 \times 10^4$
$\lambda = 270 \text{ m}\mu$	$\kappa = 6.16 \times 10^4$

Das grüne Fluoreszenzlicht des Ovocflavins erstreckt sich von 500  $\text{m}\mu$  bis über 630  $\text{m}\mu$ . Nach spektrographischen Aufnahmen liegt das Maximum der Intensität bei etwa 565  $\text{m}\mu$ . Wie schon erwähnt, verschwindet die Fluoreszenz auf Zusatz von Alkalien und Mineralsäuren. Die damit verbundenen Änderungen des Absorptionsspektrums sind in Figur 2 dargestellt.

Alkalien und Säuren: 3.09 mg Farbstoff wurden in 10 ccm Wasser gelöst und unter Zusatz von Phenol-phthalein mit  $n/100$ -NaOH nach F. Pregl titriert. Schon nach 0.02 ccm trat Umschlag ein. Für 1 Äquiv. Alkali waren 0.90 ccm berechnet. Ovocflavin besitzt danach keine frei titrierbare Carboxylgruppe. Die titrierte Lösung wurde auf 33 ccm verdünnt und nach Kjeldahl-Pregl mit 7 ccm 30-proz. Natronlauge der Wasserdampf-Destillation unterworfen. Für 1 Äquiv. Ammoniak waren 0.90 ccm  $n/10$ -HCl (Methylrot) berechnet, verbraucht wurden 0.00 ccm. Der Farbstoff ist somit kein Ammoniumsalz und enthält keine entsprechend leicht abspaltbare Aminogruppe<sup>5)</sup>. Erhitzt man den Farbstoff mit  $n$ -Natronlauge zum Sieden, so ist er nach 1–2 Min. unter Entfärbung zerstört.

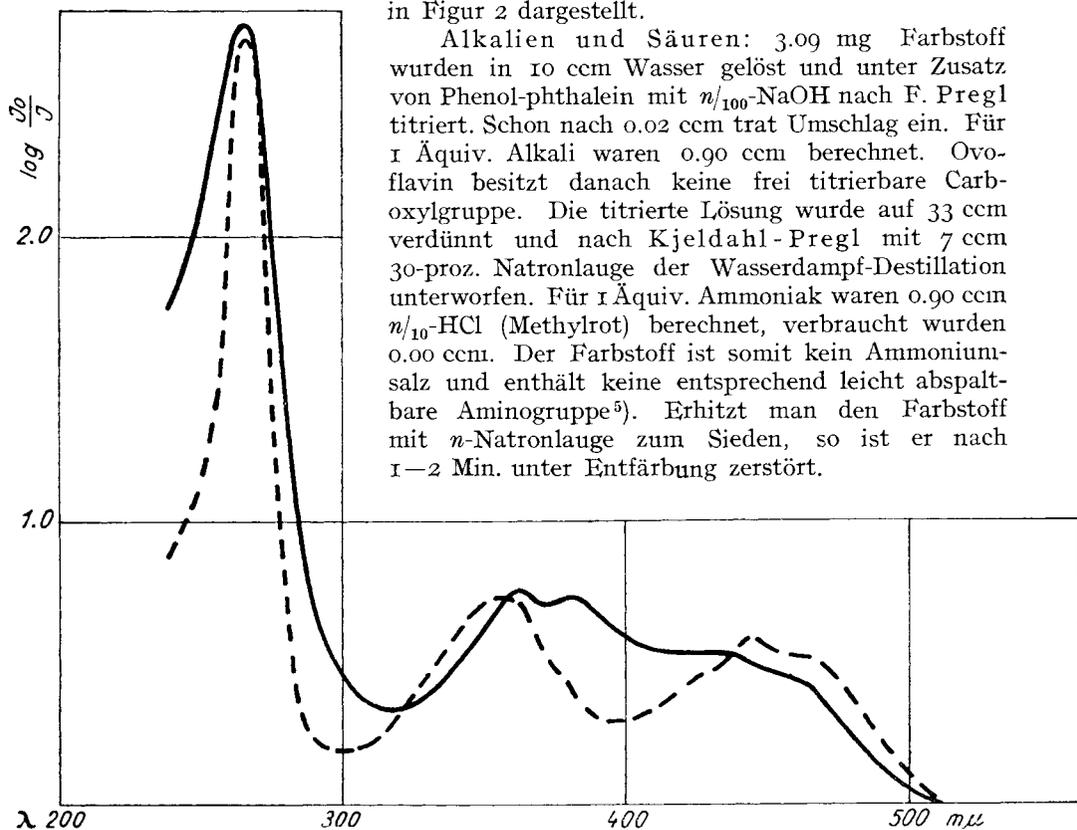


Fig. 2. Farbstoff aus Eiklar (Ovocflavin).  $d = 0.508 \text{ cm}$ .

— 0.005 % in 0.5-n. Salzsäure

----- 0.005 % in 0.5-n. Natronlauge.

Im Gegensatz zur Empfindlichkeit gegen Alkalien, die eine Aufspaltung des Moleküls bewirken, ist Ovocflavin gegen Mineralsäuren sehr beständig. Die Farbe bleibt bei 12-stdg. Kochen mit 10-proz. Schwefelsäure unverändert.

Oxydations- und Reduktionsmittel: Die Beständigkeit des Ovocflavins gegen siedendes Bromwasser ist bereits erwähnt. Auch durch Kochen

<sup>5)</sup> Auch die Prüfung auf  $\text{NH}_2$ -Gruppen nach van Slyke fiel negativ aus.

mit starker Salpetersäure oder Wasserstoffsuperoxyd, sowie durch salpetrige Säure (Natriumnitrit + Eisessig) wird der Farbstoff nicht zerstört. Zur Reduktion ist, außer Hydrosulfit in soda-alkalischer Lösung, auch Zinkstaub geeignet, der die wäßrige Lösung des Farbstoffs beim Schütteln entfärbt. Der Zinkschlamm löst sich in verd. Salzsäure farblos auf. Beim Schütteln mit Luft bildet sich der Farbstoff zurück. Auch die durch Hydrosulfit entfärbten Lösungen regenerieren den Farbstoff beim Schütteln mit Luft. Versetzt man die wäßrige Lösung mit einem nicht zu großen Überschuß von Natriumhydrosulfit, so tritt beim Schütteln mit Luft Gelbfärbung auf, die beim Stehen wieder verschwindet, um beim Schütteln mit Luft wieder zurückzukehren usw. Das Spiel erreicht erst mit dem Verbrauch des Hydrosulfits sein Ende. Dieser Versuch besagt, daß das System Flavin  $\rightleftharpoons$  Leukoflavin sauerstoff-übertragend wirkt.

Biologische Prüfung: In unserer vorläufigen Mitteilung<sup>1)</sup> wurde die Möglichkeit erörtert, daß das Vitamin B<sub>2</sub> zu Farbstoffen aus der Gruppe der Flavine in Beziehung steht, da es schon durch sichtbares Licht zerstört wird. An B<sub>2</sub>-arm ernährten Ratten, welche die Grundkost von A. Bourquin und H. C. Sherman<sup>6)</sup> erhalten, ist Ovoflavin in täglichen Mengen von 50  $\gamma$  vollkommen unwirksam. Verfüttert man gleichzeitig ebenfalls unwirksamen Hefe-Kochsaft, der mit Fullererde behandelt ist, so setzt Wachstum ein. In gereinigten Ovoflavin-Lösungen ist danach eine Komponente des Vitamins B<sub>2</sub>, das sich als uneinheitlich erweist, enthalten. Gewichtszunahmen in 21 Tagen: E = Über das Silbersalz gereinigte Farbstoff-Lösung aus Eiklar (pro die 50–60  $\gamma$  Ovoflavin enthaltend); H = Hefe-Kochsaft, mit Fullererde behandelt (pro die 1–1.5 ccm konz.).

E: bis 4 g,      H: bis 6 g,      E+H: bis 24 g.

Pfoten und schuppiger Schwanz heilten nur bei Fütterung von E+H, nicht mit E allein oder H allein.

#### Darstellung.

2 kg in der Kugelmühle feingepulvertes Eier-Albumin werden mit 8 l 80-vol.-proz. Methanol 24 Std. bei 30° geschüttelt. Nach dem Absaugen wird nochmals mit 6 l 80-proz. Methanol 12 Std. extrahiert. Die vereinigten Farbstoff-Auszüge befreit man weitgehend von Methanol durch Einengen im Vakuum auf 1½–3 l. Zur Adsorption wird mit dest. Wasser auf 4500 ccm verdünnt, mit 370 ccm konz. Salzsäure angesäuert und mit 100 g Fullererde 1 Stde. gerührt. Das Adsorbat wird in der Zentrifuge wiederholt mit viel Wasser gewaschen, bis es kein Chlor-Ion mehr abgibt. Die Elution erfolgt durch 1½-stdg. Rühren mit einem Gemisch von 2400 ccm dest. Wasser, 600 ccm Methanol und 600 ccm Pyridin. Zuletzt wird noch mit etwas 50-proz. Methanol gewaschen. Elution und Waschflüssigkeit werden vereinigt und im Vakuum auf etwa 150–200 ccm eingengt<sup>7)</sup>, die dabei ausfallende Fullererde abzentrifugiert und mit Methanol gewaschen. Durch weiteren Zusatz des gleichen bis doppelten Volumens Methanol flockt man die noch kolloidal gelöste Fullererde, wenn nötig, unter Zusatz von wenigen Tropfen Eisessig, aus.

<sup>6)</sup> Journ. Amer. chem. Soc. **53**, 3501 [1931].

<sup>7)</sup> Dadurch wird praktisch alles Pyridin entfernt.

Aus der im Vakuum eingegangenen Lösung werden durch Zusatz von Aceton farblose Begleitstoffe ausgefällt. Die vom Aceton im Vakuum befreite Lösung schüttelt man mit Äther aus, bis neuer Äther nicht mehr gelb gefärbt wird, wobei die braungelb gefärbte, grün fluoreszierende, wäßrige Lösung vollkommen klar wird. Man versetzt diese nochmals mit Aceton, bis nichts mehr ausgefällt wird, und läßt über Nacht stehen. Nach dem Filtrieren engt man im Vakuum auf 20 ccm ein.

Diese Lösung wird mit 6.5 g Fullererde 3 Stdn. geschüttelt. Die vom Adsorptionsmittel abzentrifugierte Lösung ist noch gelb gefärbt. Die Fullererde wird mit wenig dest. Wasser gewaschen und zwecks Elution des Farbstoffs mit einer Mischung von 40 ccm Wasser + 20 ccm Methanol + 15 ccm Pyridin 2 $\frac{1}{2}$  Stdn. geschüttelt. Zentrifugieren, auf 40 ccm einengen, mit Aceton versetzen und über Nacht stehen lassen.

Die filtrierte Lösung engt man im Vakuum auf etwa 10 ccm ein und setzt 5-proz. Silbernitrat-Lösung zu, bis nichts mehr ausfällt. Der von der überstehenden, braunrot gefärbten Lösung abzentrifugierte, rotbraun gefärbte Niederschlag wird mit kleinen Portionen 50-proz. Essigsäure so lange durchgerührt, bis nur mehr wenig Farbe in Lösung geht. Die vereinigten Lösungen befreit man durch Einleiten von Schwefelwasserstoff vom Silber, zentrifugiert und engt die Lösung im Vakuum fast zur Trockne ein. Die ausgeschiedenen Krystalle werden 3-mal aus wenig kochender 2-n. Essigsäure umkrystallisiert. Ausbeute: 2 mg.

Braunorange gefärbte, feine Nadeln, die zu kugeligen Drusen vereinigt sind und zwischen gekreuzten Nicols etwa gerade Auslöschung zeigen. Beim Erhitzen im zugeschmolzenen Röhrchen im Ber1-Block färben sich die Krystalle ab 240° dunkel und zersetzen sich bei 265°.

Zur Analyse wird im Hochvakuum über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> bei 100° getrocknet<sup>8)</sup>.

A<sup>9)</sup> 2.054 mg Stbst.: 3.965 mg CO<sub>2</sub>, 1.005 mg H<sub>2</sub>O, 0.016 mg Asche. — 1.008 mg Stbst.: 0.133 ccm N (15°, 760 mm). — B<sup>9)</sup> 2.743 mg Stbst.: 5.365 mg CO<sub>2</sub>, 1.30 mg H<sub>2</sub>O, 0.010 mg Asche. — 1.174 mg Stbst.: 0.152 ccm N (17°, 757 mm). — C<sup>9)</sup> 2.081 mg Stbst.: 4.08 mg CO<sub>2</sub>, 1.00 mg H<sub>2</sub>O, 0.032 mg Asche. — 1.402 mg Stbst.: 0.187 ccm N (20°, 747 mm).

C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>. Ber. C 52.7, H 5.50, N 15.4.

C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>. „ „ 54.4, „ 5.33, „ 14.9.

Gef. „ 53.06, 53.54, 54.30, „ 5.52, 5.32, 5.46, „ 15.64, 15.24, 15.50.

Colorimetrische Bestimmung des Ovoclavins im Stufen-Photometer (C. Zeiss): Konzentration der Lösung = 0.005 %. Schichtdicke 0.255 cm. Wellenlänge = 470 m $\mu$  (Farbfilter S 47).

B<sup>9)</sup>: Durchlässigkeit = 50.8%;  $\epsilon$  = 1.18.

C<sup>9)</sup>: „ „ = 53.5%;  $\epsilon$  = 1.07.

Bei der Darstellung der Präparate hatten wir uns der eifrigen Unterstützung durch Hrn. H. Stocker zu erfreuen. Der Deutschen Forschungs-Gemeinschaft danken wir für überlassene Apparate.

<sup>8)</sup> Bei weiterem Erhitzen auf 180° (5 Stdn.) war keine Gewichtsabnahme mehr festzustellen.

<sup>9)</sup> A, B und C sind Präparate, die in verschiedenen Ansätzen dargestellt wurden.