

## 217. Richard Kuhn, Paul György und Theodor Wagner-Jauregg: Über Lactoflavin, den Farbstoff der Molke.

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

(Eingegangen am 20. Juni 1933.)

Die Verbreitung des Vitamins  $B_2$  im Tier- und Pflanzenreich zeigt, worauf wir hingewiesen haben<sup>1)</sup>, auffallende Übereinstimmung mit der Verbreitung gelber, grün fluoreszierender, wasser-löslicher Farbstoffe. Von diesen haben wir das Ovoflavin, den Farbstoff des Eiklars, kristallisiert erhalten und näher beschrieben<sup>2)</sup>. Um festzustellen, ob die von uns aufgefundene Empfindlichkeit des Vitamins  $B_2$  gegen sichtbares Licht auf der Farbstoff-Natur des Vitamins selbst beruht, mußte die Isolierung reiner Farbstoff-Präparate aus möglichst verschiedenem Ausgangsmaterial und deren vergleichende biologische Prüfung in Angriff genommen werden.

Von der Intravital-Mikroskopie tierischer Organe ausgehend, die vielfach gelbgrüne Spontan-Fluoreszenz erkennen lassen, sind Ph. Ellinger und W. Koschara<sup>3)</sup> auf dieselben Farbstoffe gestoßen, zu denen uns die fortschreitende Konzentrierung des Vitamins  $B_2$  geführt hat. Ph. Ellinger und W. Koschara haben als Ausgangsmaterial vor allem Molke verwendet, deren Farbstoff schon B. Bleyer und O. Kallmann<sup>4)</sup> zu isolieren versucht hatten. Nach ihrer vorläufigen Mitteilung, die gleichzeitig mit der unsrigen zum Druck gegeben wurde, haben nunmehr Ph. Ellinger und W. Koschara<sup>5)</sup> die genauere Beschreibung der Lyochrome aus Molke mitgeteilt, die sie nach einer mit uns getroffenen Vereinbarung über die Nomenklatur als Lactoflavine a, b und c unterscheiden. Diese Farbstoffe gehören nach der vorliegenden Beschreibung zweifellos mit dem Ovoflavin in dieselbe Gruppe. Sie sind charakterisiert durch Krystallform und Elementaranalyse, für Lactoflavin a liegt überdies eine Absorptionskurve vor. Lactoflavin a enthält 21.6%, b 31.9% und c 31.3% N, für Ovoflavin haben wir dagegen nur 15.5% N gefunden.

Unsere Versuche, das Vitamin  $B_2$  aus Molken zu konzentrieren, wurden in Anlehnung an die zur Verarbeitung von Eier-Albumin bereits mitgeteilten Vorschriften durchgeführt und haben zu einem Farbstoff-Präparat geführt, das in Krystallform, elementarer Zusammensetzung und Absorptionsspektrum dem aus Eier-Albumin isolierten Ovoflavin zum Verwechseln ähnlich ist. Die Analysen, die wir nicht als endgültig betrachten, stimmen am besten auf die Formel  $C_{17}H_{20}N_4O_6$ , während wir für Ovoflavin  $C_{17}H_{20}N_4O_6$ ,  $C_{16}H_{20}N_4O_6$  und ähnliche Formeln in Betracht gezogen hatten. Die Zersetzungspunkte beider Farbstoffe (265° bzw. 267°) stimmen ebenfalls auffallend überein, sind jedoch für eine endgültige Identifizierung nicht ausreichend.

Daß unser Farbstoff-Präparat mit keinem der von Ph. Ellinger und W. Koschara beschriebenen übereinstimmt und vor allem im Stickstoff-

<sup>1)</sup> R. Kuhn, P. György u. Th. Wagner-Jauregg, B. **66**, 317 [1933].

<sup>2)</sup> R. Kuhn, P. György u. Th. Wagner-Jauregg, B. **66**, 576 [1933].

<sup>3)</sup> B. **66**, 315 [1933].

<sup>4)</sup> Biochem. Ztschr. **155**, 54 [1925]; dort die frühere Literatur.

<sup>5)</sup> B. **66**, 808 [1933].

Gehalt von diesen stark abweicht, könnte darauf beruhen, daß wir die Adsorption des Farbstoffs an Fullererde in stark saurer Lösung (3% HCl) vornehmen und nicht bei neutraler Reaktion. Bei unserer Arbeitsweise ist mit der Abspaltung von Farbstoff aus komplizierteren Vorstufen zweifellos zu rechnen. Für die Anreicherung des Vitamins hat sich jedoch diese Maßnahme als unbedenklich erwiesen. Die Farbstoffe von Ph. Ellinger und W. Koschara könnten, vorausgesetzt, daß sie sich als einheitlich erweisen, den in der Milch ursprünglich vorhandenen entsprechen oder diesen jedenfalls noch nahestehen. Ein Präparat von Lactoflavin a, das uns die genannten Autoren zur Prüfung im Tierversuch übergeben hatten, zeigte nach dem Auflösen in Wasser allerdings nur 10% der Farbstärke unseres Lactoflavins<sup>6)</sup>. Danach müßte, vorausgesetzt, daß eine einheitliche Substanz vorliegt, die Bindungsart des Farbstoffs noch recht kompliziert sein.

Absorptions-Spektrum: Lactoflavin ist spektroskopisch dem Ovoflavin<sup>7)</sup> außerordentlich ähnlich. Die Absorptionskurve (Fig. 1), die wir der Freundlichkeit von Hrn. K. W. Hausser verdanken, zeigt im Sichtbaren ein Maximum bei 445 m $\mu$ , das von einer langwelligeren und einer kurzwelligeren Bande begleitet wird. Im nahen Ultraviolett folgt eine nur wenig niedrigere Doppelbande (380 und 365 m $\mu$ ), an die sich die stärkste Bande bei 265 m $\mu$  und eine etwas schwächere bei 220 m $\mu$  anschließen. Abgesehen von dem kurzwelligsten Maximum (220 m $\mu$ ), das beim Farbstoff aus Fiklar fehlte<sup>8)</sup>,

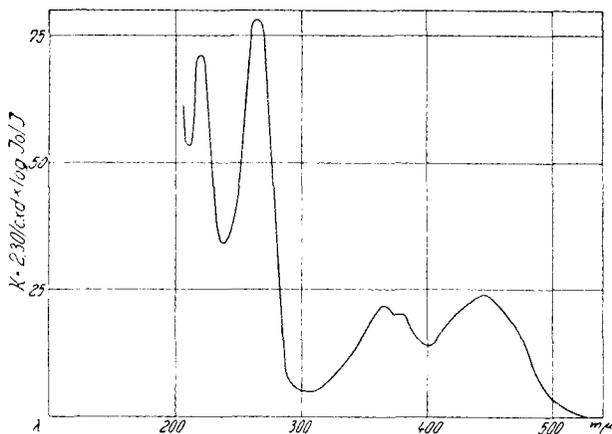


Fig. 1. Absorptionsspektrum des Lactoflavins in Wasser.

(Das Molekulargewicht ist zu 364 angenommen).

Abszissen: Wellenlängen in m $\mu$ , Ordinaten:  $x \cdot 10^{-3}$ .

sind die Absorptionskurven von Lactoflavin und Ovoflavin fast zur Deckung zu bringen. Die maximalen molaren Extinktionskoeffizienten  $x = 2.30/c \times d \cdot \log J_0/J$  ( $c$  in Molen/Liter,

<sup>6)</sup> vergl. auch die Absorptionskurve B. 66, 315 [1933].

<sup>7)</sup> vergl. die Absorptionskurven unserer Mitteilung B. 66, 577f. [1933].

<sup>8)</sup> Hier wurde früher nicht so weit gemessen. Nach neueren Messungen zeigen auch Ovoflavin und das chloroform-lösliche Flavin aus Hefe eine vierte Absorptionsbande bei 220 m $\mu$ .

d in cm) sind für Lactoflavin ein wenig höher und betragen unter Annahme des Molekulargewichts 364:

$\lambda = 445 \text{ m}\mu$	$\alpha = 2.40 \times 10^4$
$\lambda = 365 \text{ m}\mu$	$\alpha = 2.15 \times 10^4$
$\lambda = 265 \text{ m}\mu$	$\alpha = 7.8 \times 10^4$
$\lambda = 220 \text{ m}\mu$	$\alpha = 7.1 \times 10^4$

Wäßrige Lösungen von Lactoflavin fluorescieren intensiv grün. Auf Zusatz von sehr verd. Ammoniak oder von 2-n. Schwefelsäure verschwindet die Fluorescenz reversibel, auf Zusatz von 2-n. Essigsäure bleibt sie bestehen. In der Empfindlichkeit gegen Alkalien und der Beständigkeit gegen Mineralsäuren stimmt der Farbstoff aus Milch mit demjenigen aus Eiklar überein, ebenso in der Widerstandskraft gegen Oxydationsmittel ( $\text{Br}_2$ ,  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{HNO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und der reversiblen reduktiven Entfärbung durch Hydrosulfit oder Zinkstaub. In Chloroform ist auch Lactoflavin unlöslich.

### Biologische Prüfung.

Lactoflavin ist an  $\text{B}_2$ -arm ernährten Ratten, welche die Grundkost von A. Bourquin und H. C. Sherman<sup>9)</sup> erhalten, in täglichen Mengen von 50  $\gamma$  vollkommen unwirksam. Nach unseren Erfahrungen<sup>10)</sup> sind jedoch in dieser Diät mindestens 2 verschiedene Faktoren in ungenügender Menge enthalten, von denen der eine (farblose) sich in Hefe-Kochsäften findet, aus denen man die Flavine, z. B. durch Adsorption an Fullererde, entfernt hat. Die eingehende Prüfung im Tierversuch unter Zusatz dieses Faktors, über die gleichzeitig in den „Naturwissenschaften“<sup>11)</sup> berichtet wird, hat ergeben, daß 5  $\gamma$  Lactoflavin pro Tag und Ratte bei gewichtskonstanten Tieren für normales Wachstum genügen. Der krystallisierte Farbstoff stellt damit das wirksamste bisher erhaltene Vitamin- $\text{B}_2$ -Präparat dar.

### Lyochrome und Lipochrome.

Zu den lebenswichtigen Farbstoffen, die der Organismus der Säugetiere mit der Nahrung aufnimmt, sind nunmehr außer den Lipochromen (Carotinen) auch die Lyochrome (Flavine) zu zählen. Die Gegenüberstellung der wichtigsten Eigenschaften beider Farbstoff-Klassen führt zu folgendem Bild:

	Lyochrome	Lipochrome
Zusammensetzung	stickstoff-haltig	stickstoff-frei
Löslichkeit	wasserlöslich	unlöslich in Wasser <sup>12)</sup>
Farbe der Lösungen	gelb bis orange	gelb bis rot
Fluorescenz	stark grün <sup>13)</sup>	schwach gelb bis grün <sup>14)</sup>

<sup>9)</sup> Journ. Amer. chem. Soc. **53**, 3501 [1931].

<sup>10)</sup> B. **66**, 576 [1933], u. zw. S. 579.

<sup>11)</sup> P. György, R. Kuhn u. Th. Wagner-Jauregg, Naturwiss. **21** [1933], im Druck.

<sup>12)</sup> Ausnahme: Crocine des Safrans, in denen die wasser-unlöslichen Crocetine glucosidisch gepaart sind.

<sup>13)</sup>  $\text{pH}$  abhängig.

<sup>14)</sup> Carotin und Lycopin sind in der Literatur als nicht fluorescierend beschrieben. Nach einer Untersuchung von Hrn. K. W. Hausser zeigen sie jedoch einwandfreie, wenn auch schwache Fluorescenz. Das Fluorescenzspektrum steht zum Absorptionsspektrum jeweils im selben Verhältnis wie bei den synthetischen Farbstoffen der Diphenyl-polyen-Reihe.

	Lyo chrome	Lipo chrome
Prosthetisch gebunden an	Polysaccharid <sup>15)</sup> , Eiweiß	— <sup>16)</sup>
Säuren	sehr beständig	sehr empfindlich
Alkalien	empfindlich <sup>17)</sup>	beständig
Oxydationsmittel	sehr beständig <sup>18)</sup>	sehr empfindlich <sup>19)</sup>
Biolog. Beziehungen zu	Vitamin B <sub>2</sub> und Oxydations-fermenten	Vitamin A
Tagesdosis pro Ratte	5 γ Lactoflavin	5 γ α- oder γ-Carotin. 2.5 γ β-Carotin <sup>20)</sup>

Die Carotine sind Vorstufen des A-Vitamins (Pro-vitamine), die Flavine vermutlich Vorstufen von Oxydations-fermenten (Pro-fermente)<sup>21)</sup>.

### Darstellung.

300 l Labmolke aus frischer Kuhmilch werden mit 24.6 l konz. Salzsäure versetzt und mit 2.4 kg Fullererde 1½ Stdn. gerührt. Man läßt absitzen, hebert die überstehende Flüssigkeit ab und wäscht das Adsorbat so lange mit dest. Wasser, bis sich mit Silbernitrat kein Chlor-Ion mehr nachweisen läßt. Zur Elution wird 1½ Stdn. mit einer Mischung von 2.7 l Pyridin, 2.7 l Methanol und 10.8 l dest. Wasser gerührt. Man zentrifugiert, engt die Elutionsflüssigkeit im Vakuum auf ein kleines Volumen ein und bringt kolloidal gelöste Fullererde durch Zusatz des gleichen bis doppelten Volumens Methanol zum Ausflocken<sup>22)</sup>. Die abzentrifugierte Farbstoff-Lösung wird im Vakuum vom Methanol befreit und wiederholt mit Äther ausgeschüttelt, dann mit dem 10-fachen Volumen Aceton versetzt und über Nacht stehen gelassen. Nach dem Filtrieren engen wir im Vakuum auf 350 ccm ein und adsorbieren den Farbstoff erneut durch ¾-stdg. Schütteln mit 42 g Frankonit „KL“. Aus dem mehrmals gewaschenen Adsorbat eluieren wir das Lactoflavin mit 75 ccm Pyridin + 200 ccm Methanol + 100 ccm Wasser.

Die zweite Elution wird unter 15 mm auf 75 ccm eingengt, mit 2 ccm Eisessig und 1000 ccm Aceton versetzt und nach Abzentrifugieren des ausfallenden Niederschlags erneut im Vakuum, diesmal bis auf 8 ccm, eingengt. Während des Einengens treten immer wieder farblose Fällungen auf, von denen abzentrifugiert werden muß. Die klare, konzentrierte Lösung wird mit gesättigter Pikrinsäure-Lösung versetzt, wodurch Kreatinin und andere Begleitstoffe ausgefällt werden, während das Lactoflavin in Lösung bleibt. Die Entfernung überschüssiger Pikrinsäure erfolgt durch Extraktion

<sup>15)</sup> The Svedberg u. J. B. Erikson, Naturwiss. **21**, 330 [1933]. — Die zugrunde liegenden Stickstoff-Bestimmungen stammen von O. Warburg und W. Christian.

<sup>16)</sup> Nur in den Farbstoffen des Hummers, R. Kuhn u. E. Lederer, B. **66**, 488 [1933], und anderer Crustaceen treten Lipo chrome als prosthetische Gruppen, an Eiweiß gebunden, auf.

<sup>17)</sup> In der Hitze erfolgt hydrolytische Spaltung unter Entfärbung.

<sup>18)</sup> Gegen Wasserstoffsperoxyd, Brom, Salpetersäure auch in der Siedehitze. Durch Chromsäure und Permanganat ist Abbau zu erzielen; vergl. Ph. Ellinger u. W. Koschara, B. **66**, 808 [1933].

<sup>19)</sup> Vielfach tritt an der Luft schon bei gewöhnlicher Temperatur Autoxydation ein.

<sup>20)</sup> R. Kuhn u. H. Brockmann, Klin. Wochenschr. **12**, 972 [1933].

<sup>21)</sup> R. Kuhn, Nachr. Kaiser-Wilhelm-Ges. **2**, 13 [1933], Beilage zu d. Naturwiss. **21**.

<sup>22)</sup> Die Elution der Molken-Adsorbate hat Hr. H. Stocker ausgeführt.

mit Äther im Dunkeln. Engt man die ausgeätherte Lösung im Vakuum ein, so scheidet sich der Farbstoff krystallinisch ab. Zur Reinigung wird 3-mal aus kochender 2-n. Essigsäure unkrystallisiert. Die Ausbeute beträgt dann 6 mg.

Lactoflavin stellt braunorange gefärbte, feine Nadeln dar, die mitunter zu kugeligen Drusen vereinigt sind und zwischen gekreuzten Nicols etwa gerade Auslöschung zeigen. Beim Erhitzen im Berl-Block (zugeschmolzenes Röhrchen) tritt von etwa 240° an zunehmende Dunkelfärbung und bei 267° (korr. 271°) Zersetzung unter Sintern ein.

Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei 100° über Phosphorpentoxyd 5 Stdn. getrocknet.

2,329 mg Sbst.: 4,61 mg CO<sub>2</sub>, 1,14 mg H<sub>2</sub>O, 0,005 mg Asche. — 2,344 mg Sbst.: 4,575 mg CO<sub>2</sub>, 1,15 mg H<sub>2</sub>O, 0,025 mg Asche. — 2,242 mg Sbst.: 0,299 ccm N (22°, 752 mm).

C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> (376). Ber. C 54,4, H 5,33, N 14,9.  
Gef. „ 53,98, 53,81, „ 5,48, 5,54, „ 15,24.

Colorimetrische Bestimmung im Stufen-Photometer (C. Zeiss): Konzentrat. der Lösung (Wasser) = 0,005%, Schichtdicke = 0,25 cm, Wellenlänge = 470 mμ (Farbfilter S 47). Durchlässigkeit = 51%, ε = 1,17.

Der Deutschen Forschungs-Gemeinschaft sprechen wir für die Überlassung von Apparaten unseren aufrichtigen Dank aus.

## 218. G. Schroeter: Über die chemische Konstitution der Aldehyd- und Keton-Bisulfite (III. (vorläufig.) Mitteil.<sup>1)</sup>).

[Aus d. Chem. Institut d. Tierärztl. Hochschule Berlin.]

(Eingegangen am 23. Juni 1933.)

H. J. Backer und H. Mulder haben eine Arbeit „Dérivés acylés de l'acide amino-méthan-sulfonique“<sup>2)</sup> veröffentlicht, die sich mit unseren Arbeiten berührt. Die Autoren kommen zu dem Schluß, daß die von Reinking<sup>3)</sup> aus Formaldehyd-bisulfit und Ammoniak erhaltene Säure wahre Amino-methan-sulfonsäure ist, deren Beständigkeit durch Acylierung in der NH<sub>2</sub>-Gruppe (Ac.NH.CH<sub>2</sub>.SO<sub>3</sub>H) erhöht würde. — Wir haben ausgehend von einer neu aufgefundenen Sulfo-essighydrazidsäure, HO<sub>3</sub>S.CH<sub>2</sub>.CO.NH.NH<sub>2</sub>, eine Anzahl von Derivaten der wahren Amino-methan-sulfonsäure, wie R<sub>2</sub>N.SO<sub>2</sub>.CH<sub>2</sub>.N:CO, R<sub>2</sub>N.SO<sub>2</sub>.CH<sub>2</sub>NH.CO<sub>2</sub>C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>.O.SO<sub>2</sub>.CH<sub>2</sub>.N:CO, CO(NH.CH<sub>2</sub>.SO<sub>3</sub>H)<sub>2</sub> usw., hergestellt und werden über die umfangreichen einschlägigen Beobachtungen an anderer Stelle eingehend berichten, sowie dort auch die Theorie erörtern. — Nur zwei zu der Theorie in Beziehung stehende Beobachtungen möchten wir jetzt schon mitteilen: 1) Die „Reinking-Säure“, wie wir die jetzige Amino-methan-sulfonsäure vorläufig benennen wollen, titriert sich nach unserer Beobachtung mit Phenol-phthalein und *n*/<sub>10</sub>-Natronlauge scharf als einbasische Säure, was bei einer echten Amino-sulfonsäure ebensowenig der Fall sein sollte,

<sup>1)</sup> vergl. B. **59**, 2341 [1926], **61**, 1616 [1928].

<sup>2)</sup> Rec. Trav. chim. Pays-Bas **52**, 454 [1933].

<sup>3)</sup> B. **38**, 1077 [1905].