

388. Richard Kuhn, Hermann Rudy und Theodor Wagner-Jauregg: Über Lacto-flavin (Vitamin B₂).

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für medizin. Forschung, Institut für Chemie, Heidelberg.]
(Eingegangen am 23. November 1933.)

Von den Schwermetall-Verbindungen des Lacto-flavins, dessen Isolierung vor kurzem beschrieben wurde¹⁾, zeichnet sich, neben dem roten Silbersalz, eine Thallium(I)-Verbindung durch geringe Löslichkeit und hohes Krystallisationsvermögen aus. Durch Fällung mit Thallium(I)-sulfat unter Zusatz von etwas Ammoniak gelingt es, den Farbstoff der Molke aus den mit Pikrinsäure gereinigten Lösungen sofort krystallisiert zu erhalten und die Ausbeute auf ein Vielfaches der ursprünglichen zu steigern. Aus 5400 l Molke läßt sich nunmehr fast 1 g krystallisiertes Lacto-flavin gewinnen.

Wir haben Lactoflavin-Präparate, die früher bereits nach Ausfällung von Begleitstoffen mit Pikrinsäure und wiederholten Krystallisationen aus 2-n. Essigsäure zur Analyse kamen, einer weiteren gründlichen Reinigung unterzogen. Zu diesem Zwecke wurde der Farbstoff zunächst in das Silbersalz, dann in die Thallium(I)-Verbindung und schließlich nochmals in das Silbersalz übergeführt und zuletzt in der beschriebenen Weise öfters umkrystallisiert. Das auf diesem Wege gewonnene Lacto-flavin krystallisiert in sternförmig angeordneten, feinen Nadeln (Abbild. 1), die zwischen gekreuzten Nicols gerade Auslöschung zeigen und bei 274⁰ (korr.) unt. Zers. schmelzen²⁾. Die elementare Zusammensetzung hat sich bei der Fraktionierung über die Schwermetallverbindungen nicht mehr verändert. Die Analysen der reinsten Präparate sprechen in Übereinstimmung mit den früheren für die Formel C₁₇H₂₀N₄O₆. Ebenso unverändert ist die biologische Wirksamkeit³⁾ geblieben. Nach den mit Frl. U. Ehrenberg ausgeführten Bestimmungen, entsprechen 7 γ reinstes Lacto-flavin in der Wachstums-Wirkung an B₂-arm ernährten Ratten einer Sherman-Einheit⁴⁾. Dabei ist die Ergänzung der Grundkost von A. Bourquin und H. C. Sherman durch Vitamin B₄ unerlässlich⁵⁾. Die Identität von Lacto-flavin mit Vitamin B₂ scheint nunmehr festzustehen.

Zur Konstitution.

In den ersten Mitteilungen, in denen auf den Zusammenhang zwischen Flavinen und Vitamin B₂ aufmerksam gemacht wurde⁶⁾, sind schon 2 Eigenschaften des Vitamins besonders hervorgehoben, deren nähere Untersuchung Einblicke in die Konstitution eröffnet: Die Empfindlichkeit gegen sichtbares Licht und die Unbeständigkeit gegen Alkalien. Innerhalb des Moleküls der Flavine sind 3 gut abgrenzbare Bezirke erkannt worden⁶⁾:
1) Ein Bezirk mit 2 N-Atomen, der durch Alkali zerstört wird und die Grup-

¹⁾ R. Kuhn, P. György u. Th. Wagner-Jauregg, B. **66**, 1034 [1933].

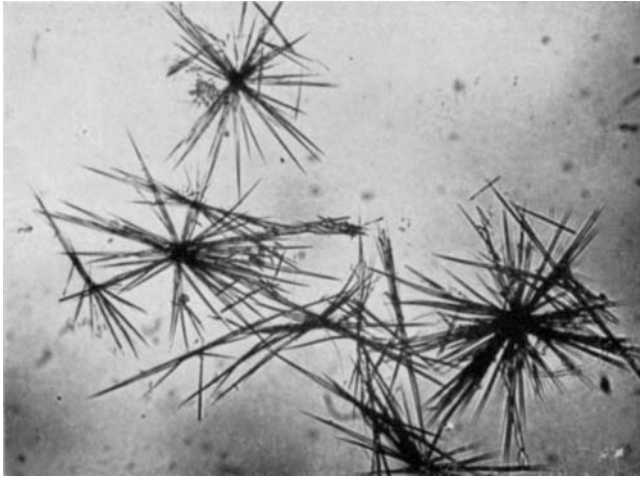
²⁾ Der zuerst angegebene Schmp. 271⁰ (korr.) unt. Zers. ist somit im Verlaufe der Reinigungs-Operationen nur noch um 3⁰ gestiegen.

³⁾ P. György, R. Kuhn u. Th. Wagner-Jauregg, Naturwiss. **21**, 560 [1933]

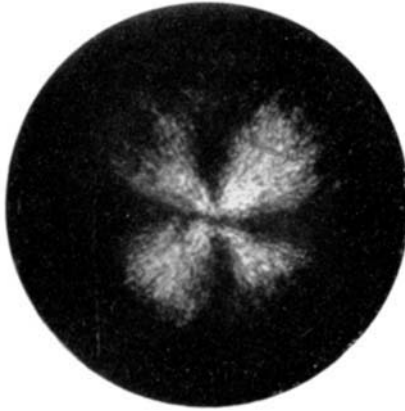
⁴⁾ 40 g Gewichts-Zunahme in 30 Tagen. Die ausführliche Beschreibung mit Hrn. P. György erfolgt in der Ztschr. physiol. Chem.

⁵⁾ R. Kuhn, P. György u. Th. Wagner-Jauregg, B. **66**, 317, 576, 1034 [1933].

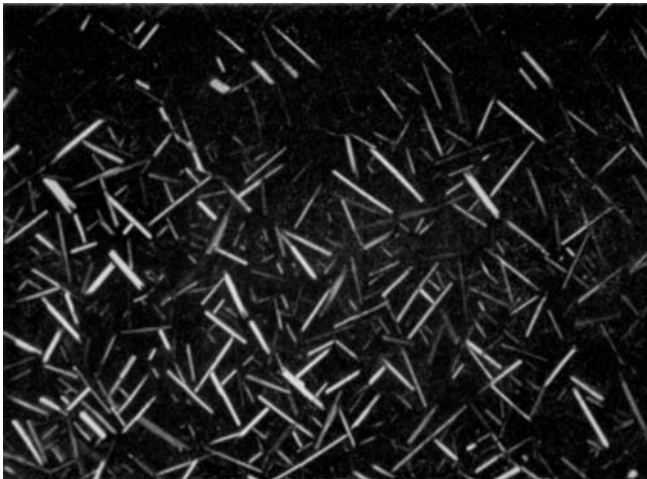
⁶⁾ R. Kuhn u. Th. Wagner-Jauregg, B. **66**, 1577 [1933].



Abbild. 1. Lacto-flavin (Vitamin B₂) aus absol. Alkohol.



Abbild. 2. Thallo-Verbindung des Vitamins B₂, zwischen gekreuzten Nicols.



Abbild. 3. Abbauprodukt C₁₁H₁₂N₂O (sublimiert).

pierung —NH.CO.NH— enthält. 2) Ein sauerstoff-reicher (hydroxylhaltiger) Bezirk, der unter dem Einfluß der Belichtung unter Bildung des Lumi-flavins abgespalten wird. 3) Ein verhältnismäßig beständiger Bezirk mit 2 schwach basischen N-Atomen, die vermutlich tertiär und an den farbgebenden Doppelbindungen beteiligt sind.

Die vorliegenden Beobachtungen gestatten genauere Angaben über die Anordnung der 3 Bezirke, die in der Reihenfolge ②—③—① verknüpft erscheinen: Der hydroxyl-reiche Bezirk ② bewirkt die Unlöslichkeit des Vitamins in Chloroform. Durch Acetylieren der Hydroxylgruppen gelangt man, ebenso wie durch Abspaltung von ② (Photolyse), zu chloroformlöslichen Derivaten. Erhitzt man das Vitamin mit verd. Alkalien, so wird 1 zerstört unter Harnstoff-Bildung⁶⁾, der übrigbleibende hellgelbe Farbstoff ist in Chloroform unlöslich. Daraus schließen wir, daß 2 nicht mit 1 verbunden ist, sondern an 3 haftet.

Die hydroxyl-haltige Seitenkette.

Die bereits beschriebene Acetylverbindung des Lacto-flavins, die durch Einwirkung von Essigsäure-anhydrid in Pyridin erhalten wird⁶⁾, stellt nach neuen Versuchen, wie schon angenommen war, eine Tetraacetylverbindung dar. Das Lumi-lactoflavin nimmt unter denselben Bedingungen keine Acetylgruppen auf, sondern wird unverändert zurückgewonnen⁷⁾. Aus dem Vergleich der Bruttoformeln C₁₇H₂₀N₄O₆ und C₁₃H₁₂N₄O₂ ist zu schließen, daß im Bezirk ②, der bei der Photolyse abgespalten wird, 4 acetylierbare Hydroxylgruppen auf 4 Kohlenstoffatome verteilt sind. Bei der Oxydation des Vitamins mit Bleitetraacetat nach R. Criegee⁸⁾ wird Formaldehyd gebildet, während Lumi-flavin keinen flüchtigen Aldehyd liefert. Bei der quantitativen Bestimmung erhielt Hr. H. Rauen aus 1 Mol Lacto-flavin 0.775 Mole Formaldehyd. Es folgt, daß 1 primäre Hydroxylgruppe in Nachbarschaft zu einem weiteren Hydroxyl vorliegt und der sauerstoff-haltige Bezirk die Konstitution —CH(OH).CH(OH).CH(OH).CH₂.OH besitzt⁹⁾. Bei der alkalischen Photolyse wird die hydroxyl-haltige Seitenkette C₄H₉O₄ durch 1 H-Atom ersetzt: C₁₇H₂₀N₄O₆ — C₄H₈O₄ = C₁₃H₁₂N₄O₂.

Verhalten des Vitamins gegen Licht; Leukoverbindungen.

Zu den auffallendsten Eigenschaften des Lacto-flavins gehört seine Fähigkeit, zwei verschiedene Leukoverbindungen zu liefern. Durch Natriumhydrosulfit, durch Platin und Wasserstoff oder durch Zinkstaub in saurer Lösung erfolgt Entfärbung unter Bildung von Leuko-lacto-flavin, das sich beim Schütteln mit Luft in den ursprünglichen Farbstoff zurückverwandelt. Dieselbe Leukoverbindung wird auch erhalten, wenn

⁷⁾ Tetraacetyl-lactoflavin besitzt noch 1 aktives H-Atom und gibt ein rotes Silbersalz. In diesen beiden Eigenschaften stimmt es mit Lumi-lactoflavin überein.

⁸⁾ A. 495, 211 [1932].

⁹⁾ Bei verzweigter Kohlenstoffkette etwa $\begin{array}{l} \diagup \text{CH}_2 \cdot \text{OH} \\ \text{---CH(OH) \cdot C \cdot OH} \\ \diagdown \text{CH}_2 \cdot \text{OH} \end{array}$ wären 2 Mole

Formaldehyd zu erwarten, nachdem Glycerin nach R. Criegee a. a. O. 2 Mole Formaldehyd liefert.

man nach dem Vorgange von Ph. Ellinger und W. Koschara¹⁰⁾ mit Schwefelwasserstoff in soda-alkalischer Lösung reduziert.

Die zweite Leukoverbindung bildet sich, wenn man reines Lacto-flavin in Wasser löst und unter Ausschluß von Luft (Hochvakuum) belichtet. Unter diesen Bedingungen verschwindet die gelbe Farbe der grün-fluoreszierenden Lösung fast vollständig. Schüttelt man mit Luft, so tritt die ursprüngliche Farbe wieder auf, aber es wird nicht Lacto-flavin zurückgebildet, sondern ein neuer Farbstoff, den wir Deutero-lactoflavin benennen. Der Deutero-Farbstoff ist von dem ursprünglichen dadurch scharf unterscheidbar, daß er durch Einwirkung von verd. Natronlauge im Dunkeln chloroform-löslich wird. Die von O. Warburg und W. Christian an einem Flavin aus Hefe beschriebene Licht-Reaktion läßt sich somit in 3 verschiedene Stufen zerlegen: 1) Bildung von Deutero-leuko-lactoflavin durch Belichten von Lacto-flavin unter Ausschluß von Sauerstoff, 2) Dehydrierung von Deutero-leuko-lactoflavin durch Sauerstoff zum Deutero-lactoflavin, 3) Umwandlung des Deutero-lactoflavins in Lumi-flavin durch verd. Alkali in der Kälte unter Ausschluß von Licht.

In umgekehrter Reihenfolge, nämlich durch Einwirkung von Alkali im Dunkeln und anschließende Belichtung in neutraler oder essigsaurer Lösung, ist es nicht gelungen, zu einem chloroform-löslichen gelben Derivat zu gelangen. Die nähere Beschreibung der Deutero-Verbindung bleibt einer späteren Mitteilung vorbehalten.

Belichtet man reines Lacto-flavin in wäßriger, neutraler Lösung lange Zeit unter Zutritt von Luft, so tritt schließlich fast vollständige Entfärbung ein. Von den dabei auftretenden farblosen Spaltstücken wurde eine Verbindung mit 26% N kristallisiert erhalten, die bis 360° noch nicht schmilzt.

Der alkali-labile, stickstoff-haltige Ring.

Lumi-flavin, das durch Einwirkung von Licht und Alkali aus Lacto-flavin entsteht¹¹⁾, kristallisiert aus 2-n. Essigsäure in schönen, schmalen Prismen, die unt. Zers. bei 328° (korr.) schmelzen. Es besitzt die Zusammensetzung $C_{13}H_{12}N_4O_2$ und ist optisch inaktiv. Mit Methyl-magnesiumjodid in Pyridin wird 1 Mol Methan entwickelt, bei der Oxydation mit Chromsäure wurden 0.90 Mole Essigsäure erhalten. Das aktive Wasserstoff-Atom ist durch Metall vertretbar: Lumi-flavin liefert wie Lacto-flavin ein rotes Silbersalz. Mit Essigsäure-anhydrid in Pyridin reagiert der chloroform-lösliche Farbstoff nicht. In seinen amphoteren Eigenschaften entspricht er noch durchaus dem Vitamin. Er löst sich in Wasser und verd. Essigsäure mit gelber Farbe und intensiv grüner Fluoreszenz; in verd. Alkalien bleibt die gelbe Farbe unter Verlust der Fluoreszenz bestehen, durch verd. Mineralsäuren hellt sich die Farbe auf, wobei gleichfalls die Fluoreszenz verloren geht.

Beim Erwärmen mit Barytwasser wird Harnstoff abgespalten¹²⁾. Kocht man mit 2-n. Natronlauge, so erhält man schwach gelbe, saure

¹⁰⁾ B. 66, 1411 [1933]; vergl. auch P. Karrer und H. v. Euler, Arkiv Kemi, Mineral. Geol. 11 B, Nr. 16, S. 3 [1933].

¹¹⁾ vergl. Ph. Ellinger u. W. Koschara, B. 66, 1411 [1933]; die dort erörterte Formel $C_{14}H_{14}N_4O_2$ halten wir nicht für zutreffend.

¹²⁾ O. Warburg u. W. Christian, Biochem. Ztschr. 258, 496, 263, 228 [1933].

Beschreibung der Versuche.

Reindarstellung des Lacto-flavins.

Die ersten Stufen der Darstellung erfolgten nach der früher mitgeteilten Vorschrift¹⁶⁾. Das Filtrat der Pikrinsäure-Fällung versetzten wir mit 5-proz. Silbernitrat-Lösung und verd. Ammoniak bis zur ganz schwach lackmusalkalischen Reaktion. Der abzentrifugierte, gelbrot gefärbte Niederschlag wurde mehrmals mit warmer 50-proz. Essigsäure behandelt. Nach dem Einengen der intensiv gefärbten, essigsäuren Lösung im Vakuum auf ein kleines Volumen gaben wir, unter guter Kühlung, Ammoniak zu, bis die Lösung schwach danach roch. Nach Hinzufügen von gesättigter Thallosulfat-Lösung fielen beim Stehen im Eisschrank feine, zu flockigen Büscheln vereinigte Krystallnadelchen aus (Abbild. 2). Diese wurden in der eben hinreichenden Menge kochenden Wassers gelöst und noch warm mit 5-proz. Silbernitrat-Lösung versetzt. Nach dem Erkalten wurde die Fällung durch Zusatz einiger Tropfen verd. Ammoniaks vervollständigt. Das abzentrifugierte, intensiv rot gefärbte Silbersalz zerlegten wir in essigsaurer Lösung mit Schwefelwasserstoff. Nach dem Einengen der Lösung im Vakuum krystallisierte das Lacto-flavin in schönen Nadelchen aus, die noch 2-mal aus 2-n. Essigsäure umkrystallisiert und im Hochvakuum bei 100° über P₂O₅ getrocknet wurden. Schmp. 269° (korr. 274°) unt. Zers. Unlöslich in Aceton, nur wenig löslich in siedendem Alkohol.

3.975 mg Subst.: 7.85 mg CO₂, 1.835 mg H₂O. — 3.758 mg Subst.: 7.425 mg CO₂, 1.695 mg H₂O. — 2.318 mg Subst.: 0.295 ccm N (18°, 752 mm). — 2.266 mg Subst.: 0.292 ccm N (20°, 754 mm).

C₁₇H₂₀N₄O₆ (376.2). Ber. C 54.23, H 5.36, N 14.88.

Gef. „ 53.86, 53.88, „ 5.17, 5.05, „ 14.77, 14.89.

Colorimetrische Bestimmung im Stufen-Photometer (C. Zeiss): Konzentrat. d. Lösg. (Wasser) = 0.005 %, Schichtdicke = 0.25 cm, Wellenlänge = 470 mμ (Farbfilter S 47). Durchlässigkeit = 44.7 %. Extinktionskoeffizient $\epsilon = 1.40$.

Polarimetrische Bestimmung: An einer 0.034-proz., wäßrigen Lösung von Lacto-flavin wurde im 3-dm-Rohr für Na-Licht eine Drehung von -0.01° (Mittel aus 5 Ablesungen) beobachtet. Daraus ergibt sich, daß Lacto-flavin optisch inaktiv ist oder höchstens ein $[\alpha]_D = -0.80^\circ$ besitzt.

Bestimmung der an Kohlenstoff gebundenen Methylgruppen durch Oxydation mit Chromsäure¹⁷⁾: 9.961 mg Lacto-flavin gaben 4.47 ccm n_{100} -Essigsäure.

C₁₇H₂₀N₄O₆. Ber. für 1 C.CH₃-Gruppe 2.65 ccm n_{100} -Essigsäure.

„ „ 2 C.CH₃-Gruppen 5.30 ccm n_{100} -Essigsäure.

Oxydation mit Bleitetraacetat nach R. Criegee¹⁸⁾: 22.995 mg Lacto-flavin wurden mit 8 ccm n_{10} -(CH₃CO₂)₄Pb in Eisessig bei 60° 1 Stde. erhitzt, wobei die Farbe größtenteils verschwand. Es wurden 7.2 ccm n_{10} -Pb-Tetraacetat verbraucht, entspr. 5.8 Molen Oxydationsmittel pro 1 Mol Substanz. Im Destillat fanden wir 1.42 mg Formaldehyd, das sind 77.5 % d. Th., ber. für eine —CH(OH).CH₂.OH-Gruppe. Aus dem Destillations-Rückstand fielen beim Stehen feine, schwach gelblich gefärbte Nadelchen aus, die aus verd. Essigsäure umkrystallisiert wurden.

Deutero-Lactoflavin: 15 ccm einer wäßrigen 0.005-proz. Lösung von reinstem Lacto-flavin wurden in einer Ampulle unter Evakuieren mit der Ölpumpe eingeschmolzen. Nach 6-stdg. Belichtung mit einer 500-Watt-Lampe in einem Abstand von 20 cm (Kühlung mit dem Föhn)

¹⁶⁾ l. c., S. 1037.

¹⁷⁾ R. Kuhn u. H. Roth, B. 66, 1274 [1933].

¹⁸⁾ A. 495, 211 [1932].

war die Lösung nur noch schwach strohgelb gefärbt. Beim Schütteln mit Luft kehrte die ursprüngliche Farbe sogleich wieder. Setzte man der Lösung $\frac{1}{3}$ des Volumens 2-n. NaOH zu und säuerte dann mit Essigsäure an, so ging beim Ausschütteln mit Chloroform der Farbstoff größtenteils in dieses über. Kochende, nicht aber kalte 2-n. Sodalösung vermochte die Wirkung der Natronlauge ebenfalls hervorzurufen; dabei wurde aber ein Teil des Flavins unter Entfärbung zerstört.

Lactoflavin-acetat: Darstellung nach R. Kuhn und Th. Wagner-Jauregg¹⁹⁾; 2-mal aus Alkohol umkrystallisiert: eigelbe Nadeln vom Schmp. (unt. Zers.) 242—243° (unkorr.).

3.344 mg Sbst.: 6.79 mg CO₂, 1.58 mg H₂O. — 2.864 mg Sbst.: 0.264 ccm N (21°, 749 mm). — 0.282 mg Sbst. in 4.989 mg Campher: $\Delta = 4.5^\circ$ (geringe Zersetzung). — 0.476 mg Sbst. in 6.558 mg Campher: $\Delta = 5.8^\circ$ (geringe Zersetzung).

C₂₅H₂₈N₄O₁₀. Ber. C 55.12, H 5.19, N 10.30, Mol.-Gew. 544.3.
Gef. „ 55.37, „ 5.29, „ 10.59, „ 527, 505.

Bestimmung der Acetylgruppen¹⁷⁾: a) alkalische Verseifung: 5.072 mg Sbst. geben 4.04 ccm *n*/₁₀₀-Essigsäure; ber. für 4 Acetylgruppen 3.74 ccm Essigsäure. — b) saure Verseifung: 8.967 mg Sbst. geben 6.64 ccm *n*/₁₀₀-Essigsäure; ber. für 4 Acetylgruppen 6.59 ccm *n*/₁₀₀-Essigsäure. — Bestimmung des aktiven Wasserstoffs nach Th. Zerewitinoff - H. Roth: 11.662 mg Sbst. in Pyridin: $v_0 = 0.37$ ccm CH₄ (28°); $v_0 = 0.495$ ccm CH₄ (95°). Gef. 0.78, 1.04 aktive H-Atome.

Lumi-lactoflavin.

Aus 1000 l Molke sind 170 mg reines Lumi-flavin erhältlich. Zur Belichtung dienten die durch Adsorption gereinigten Vitamin-Lösungen vor der Fällung mit Pikrinsäure. Zur Analyse wurde 2-mal aus 2-n. Essigsäure umkrystallisiert und 2 Stdn. bei 100° im Hochvakuum getrocknet. Schmp. 328° (korr.) unt. Zers.

3.827 mg Sbst.: 8.59 mg CO₂, 1.555 mg H₂O. — 3.780 mg Sbst.: 8.39 mg CO₂, 1.52 mg H₂O. — 3.432 mg Sbst.: 7.625 mg CO₂, 1.39 mg H₂O. — 1.560 mg Sbst.: 0.295 ccm N (19°, 751 mm). — 1.954 mg Sbst.: 0.377 ccm N (20°, 759 mm).

C₁₃H₁₂N₄O₂ (256.1). Ber. C 60.91, H 4.72, N 21.86.
Gef. „ 61.21, 60.54, 60.59, „ 4.55, 4.55, 4.53, „ 21.84, 22.16.

C-Methylgruppen¹⁷⁾. 5.234 mg Sbst.: 1.83 ccm *n*/₁₀₀-NaOH = 0.90 Mole Säure.

Aktive H-Atome. 4.587 mg Sbst.: = 0.43 ccm (17°) = 1.07 Mole CH₄; = 0.44 ccm (45°) = 1.096 Mole CH₄; = 0.46 ccm (95°) = 1.14 Mole CH₄.

Isopropylidengruppen und Aminogruppen (nach D. D. van Slyke) sind nicht nachweisbar.

Drehungsvermögen: ($\pm 0.02^\circ \times 100$):(0.05 \times 4) = $\pm 10^\circ$ (2-n. Essigsäure). Die Mutterlaugen des chloroform-löslichen Farbstoffs, den man durch Bestrahlung von rohen Konzentrat aus Milch erhält, sind stark linksdrehend.

Verhalten gegen Bleitetraacetat: 13.24 mg Sbst. verbrauchten in Eisessig bei 60° nichts von dem Oxydationsmittel. Die Farbe blieb unverändert.

Absorptionsspektrum in Chloroform: Nach licht-elektrischer Photometrie sind bis 240 μ 7 Absorptionsbanden vorhanden, die folgende Lagen und Höhen besitzen:

¹⁹⁾ B. 66, 1580 [1933].

1. $\lambda = 470 \text{ m}\mu$	$\kappa = 20.10^3$
2. $\lambda = 445 \text{ m}\mu$	$\kappa = 26.10^3$
3. $\lambda = 420 \text{ m}\mu$	$\kappa = 20.10^3$
4. $\lambda = 360 \text{ m}\mu$	$\kappa = 17.10^3$
5. $\lambda = 341 \text{ m}\mu$	$\kappa = 16.10^3$
6. $\lambda = 312 \text{ m}\mu$	$\kappa = 6.5.10^3$
7. $\lambda = 270 \text{ m}\mu$	$\kappa = 75.10^3$

Die Absorptionskurve stimmt mit der von O. Warburg und W. Christian angegebenen sehr nahe überein, nur erscheinen dort die Banden 4, 5 und 6 als homogene Bande. In wäßriger Lösung haben auch wir die Aufspaltung dieser Bande nicht beobachtet.

Farbwert (Stufen-Photometer von C. Zeiss): Für 0.100 mg Lumi-flavin in 1 ccm Chloroform ist $\epsilon = 4.298$ (Farbfilter S. 47).

Mit diazotierter Sulfanilsäure erfolgt keine Kupplung, auch mit 2.4-Dinitrophenyl-hydrazin in Eisessig fand keine Kondensation statt.

Alkalischer Abbau: 145 mg Lumi-flavin werden mit 75 ccm 2-n. Natronlauge übergossen, wobei sich die Substanz tiefrot anfärbt (Natriumsalz) und dann mit gelbroter Farbe in Lösung geht. Man kocht $\frac{1}{2}$ Std., wobei die Lösung hellgelb wird, und läßt erkalten. Dann schüttelt man 2-mal mit Chloroform aus, das keinen Farbstoff aufnimmt, und säuert mit Eisessig schwach an. Dabei wird die Lösung fast farblos (grünstichig). Durch 5–10-maliges Ausschütteln mit je 40 ccm Chloroform läßt sich das Gemisch der Spaltungsprodukte isolieren, das zur Reinigung dem Chloroform mit verd. Natronlauge entzogen und nach dem Ansäuern erneut mit Chloroform ausgeschüttelt wird. Das grünstichig gelbe Rohprodukt liefert bei der Krystallisation aus absol. Alkohol oder Eisessig derbe Täfelchen neben Aggregaten feiner Nadeln (72 mg). Beim wiederholten Umkrystallisieren geht der Stickstoff-Gehalt zurück, während sich C und H nur wenig ändern. Nach 4-maliger Krystallisation aus Alkohol und aus Eisessig wurden folgende Werte erhalten:

3.251 mg Sbst.: 7.375 mg CO_2 , 1.535 mg H_2O . — 3.239 mg Sbst.: 7.25 mg CO_2 , 1.605 mg H_2O . — 2.622 mg Sbst.: 0.305 ccm N (20° , 754 mm).

$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$. Ber. C 62.04, H 5.21, N 12.06.
Gef. „ 61.87, 61.22, „ 5.28, 5.56, „ 13.44.

In einem weiteren Versuch wurde die Chloroform-Lösung fraktioniert 4-mal mit Natriumbicarbonat- und dann mit Soda-Lösung ausgeschüttelt. Die in Bicarbonat lösliche Säure wurde 2-mal aus Eisessig umkrystallisiert.

3.811 mg Sbst.: 8.665 mg CO_2 , 1.84 mg H_2O . — 2.160 mg Sbst.: 0.259 ccm N (20° , 752 mm). — 7.972 mg Sbst. verbraucht 3.50 ccm $n/100\text{-NaOH}$ (in absol. Alkohol, Phenol-phthalein).

$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$. Ber. C 62.04, H 5.21, N 12.06 Äquiv.-Gew. 232.1.
Gef. „ 62.01, „ 5.40, „ 13.82 „ 228.

Thermischer Abbau: 72 mg einmal umkrystallisiertes alkalisches Abbauprodukt aus Lumi-flavin wurden unter 0.7 mm im Luftbade erhitzt. Zwischen 170° und 180° sublimierten etwa 20 mg gelbstichige, feine Prismen (Abbild. 3), Schmp. 174° (korr.).

3.584 mg Sbst.: 9.22 mg CO_2 , 2.05 mg H_2O . — 2.371 mg Sbst.: 0.300 ccm N (19° , 744 mm), — 0.381 mg Sbst. in 5.926 mg Campher: $\Delta = 15.0^\circ$. — 0.702 mg Sbst. in 7.613 mg Campher: $\Delta = 20.2^\circ$.

$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$. Ber. C 70.17, H 6.42, N 14.89, Mol.-Gew. 188.1
Gef. „ 70.16, „ 6.40, „ 14.48, „ 172, 183.

In konz. Schwefelsäure löst sich die Substanz mit intensiver, rein gelber Farbe, in 2-n. Natronlauge ist sie unlöslich. Sie enthält kein aktives H-Atom.