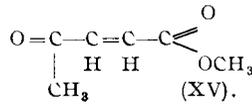
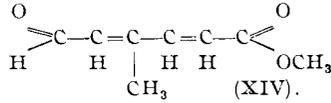


aus Bixin-methylester
(I. J. Rinkes)

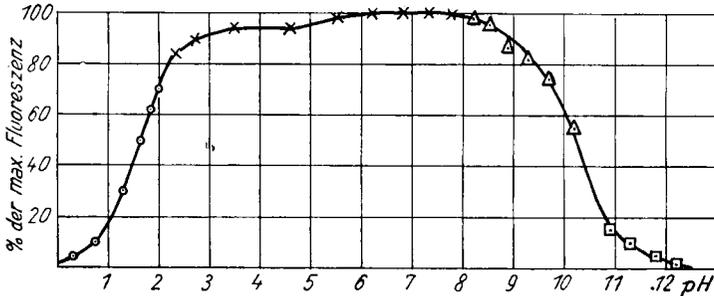


Bei dieser Untersuchung hat uns Hr. H. Trischmann in ausgezeichneter Weise unterstützt, wofür wir ihm herzlich danken.

170. Richard Kuhn und Giovanni Moruzzi: Über die Dissoziationskonstanten der Flavine; p_{H} -Abhängigkeit der Fluoreszenz.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für medizin. Forschung, Institut für Chemie, Heidelberg.]
(Eingegangen am 4. April 1934.)

Die grüne Fluoreszenz von Vitamin-B₂-Lösungen verschwindet auf Zusatz von Alkalien und von Mineralsäuren. Wir haben an reinen, kristallisierten Präparaten die p_{H} -Abhängigkeit der Fluoreszenz mit dem Stufen-Photometer quantitativ gemessen und die in Abbild. 1 dargestellte Kurve erhalten, welche die Dissoziationsrestkurve eines amphoteren Elektrolyten darstellt.



Abbild. 1. Lacto-flavin.

Man erkennt, daß nur die elektrisch neutralen Moleküle bzw. die Zwitter-Ionen fluorescieren. Die farblosen Kationen und die gelben Anionen fluorescieren nicht. Im breiten p_{H} -Optimum ist die Fluoreszenz-Helligkeit den angewandten Farbstoff-Konzentrationen recht genau proportional. Man kann daher im Gebiete des Abfalls auf der sauren und auf der alkalischen Seite die Fluoreszenz als Maßstab für die jeweils vorhandene Menge der elektrisch neutralen Moleküle (Zwitter-Ionen) benutzen und so die Dissoziationskonstanten des Vitamins ermitteln. Dieses Verfahren ist durch die sehr geringen Substanz-Mengen, die es erfordert, ausgezeichnet. Für alle Messungen, die in Abbild. 1 wiedergegeben sind, genügte 1.0 mg Lacto-flavin: Das Ergebnis der Versuche ist, daß im sauren Gebiet bei $p_{\text{H}} = 1.7$, im alkalischen Gebiet bei $p_{\text{H}} = 10.2$ die Fluoreszenz auf die Hälfte des

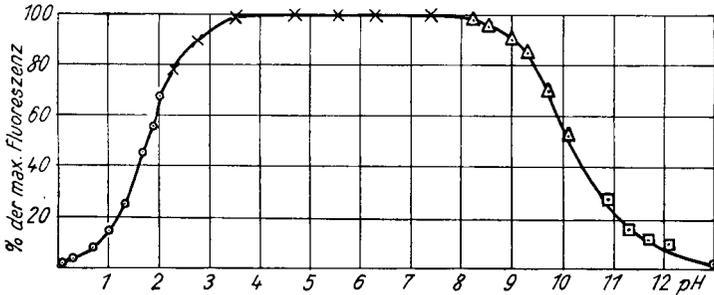
maximalen Wertes zurückgeht. Die Dissoziationskonstanten des Vitamins B₂ betragen daher unter den gemachten Voraussetzungen:

$$k_a = 63 \times 10^{-12}, \quad k_b = 0.5 \times 10^{-12}$$

und für den iso-elektrischen Punkt $J = \sqrt{k_w \cdot k_a / k_b}$ ergibt sich:

$$J = 1 \times 10^{-6} \quad (p_J = 6.0).$$

In entsprechender Weise haben wir die p_H-Abhängigkeit der Fluoreszenz für Lumi-lactoflavin ermittelt. Aus Abbild. 2 ist zu ersehen, daß die elektrolytischen Dissoziationskonstanten in Übereinstimmung mit denjenigen des Lacto-flavins $k_a = 63 \times 10^{-12}$ und $k_b = 0.5 \times 10^{-12}$ betragen.



Abbild. 2. Lumi-lactoflavin.

Die Abspaltung der zucker-ähnlichen Seitenkette, die für die Vitamin-Natur des Lacto-flavins wesentlich ist, verändert danach die Elektrolyt-Eigenschaften nicht merklich. Es war bereits bekannt, daß diese Seitenkette auch ohne nennenswerten Einfluß auf das Absorptionsspektrum ist.

An den Porphyrinen haben H. Fink und W. Hoerburger¹⁾ eingehende Untersuchungen über die p_H-Abhängigkeit der Fluoreszenz angestellt. Im Gegensatz zu den Flavinen findet man bei den Porphyrinen, soweit sie Carboxylgruppen tragen, also amphotere Eigenschaften besitzen, verhältnismäßig schmale iso-elektrische Gebiete. Mit steigender Zahl der Carboxylgruppen (Mono-, Di-, Tetra-, Okta-carbonsäuren) prägt sich der iso-elektrische Punkt immer schärfer aus. Da die sauren Gruppen der Flavine nicht durch Carboxylgruppen, sondern durch schwächer saure (CO.NH)-Gruppen gegeben sind, ist dieser Unterschied im Lichte unserer Kenntnis von der Dissoziation amphoterer Elektrolyte²⁾ ohne weiteres verständlich. Sehr auffallend ist jedoch die Tatsache, daß die Flavine im iso-elektrischen Gebiet ein Maximum, die Porphyrine dagegen ein Minimum der Fluoreszenz aufweisen. Wie H. Fink und W. Hoerburger hervorheben, sind allerdings bei den untersuchten kolloidalen Porphyrin-Lösungen in der Nähe des iso-elektrischen Punktes Flockungs-Erscheinungen mit im Spiel. Die Flavine bilden dagegen im ganzen geprüften p_H-Bereich zweifellos echte Lösungen.

Wir haben versucht, ob die so schön fluoreszierenden Flavine unter geeigneten Bedingungen auch zu phosphoreszieren vermögen. Die kristallisierten Farbstoffe leuchten, wenn man sie mit sichtbarem oder ultraviolettem Licht anregt, nicht nach. Wir haben daher nach dem Vor-

¹⁾ Ztschr. physiol. Chem. **218**, 181 [1933], **220**, 123 [1933].

²⁾ L. Michaelis, Die Wasserstoff-Ionen-Konzentration, 2. Aufl., Berlin 1922.

schlag von H. Kautsky und A. Hirsch³⁾ Streifen von Filtrierpapier mit Lösungen von Lacto-flavin und von Lumi-lactoflavin getränkt und scharf getrocknet. Aber auch diese Farbstoff-Adsorbate ließen mit freiem Auge bei 15—20° in Luft kein Nachleuchten erkennen, das in Vergleichs-Versuchen mit Trypflavin sehr schön zu erkennen war.

Beschreibung der Versuche.

Versuchs-Anordnung. Als Lichtquelle diente eine Analysen-Quarzlampe (Heraeus), die sich in einem Abstand von etwa 30 cm (Schwarzglas bis Cüvetten) vor dem Stufen-Photometer nach Pulfrich (C. Zeiss) befand. Beobachtet wurde in der Richtung des einfallenden Lichtes ohne Anwendung von Farbfiltern.

Abhängigkeit der Fluorescenz von der Konzentration.

1.058 mg Lumi-lactoflavin wurden in 50 ccm Wasser gelöst. Von dieser Stammlösung verdünnten wir je 1 ccm auf die folgenden Volumina und fanden bei Anwendung von 3-cm-Cüvetten:

0.0212 mg in	Fluorescenz
10 ccm	100 %
20 ccm	53.5 %
30 ccm	35.5 %
40 ccm	26.5 %
50 ccm	22.5 %

In dem untersuchten Gebiet ist somit die Helligkeit der Fluorescenz dem Farbstoff-Gehalt der Lösungen mit guter Annäherung proportional. Etwaige p_H -Unterschiede kommen bei der Breite des p_H -Optimums der Fluorescenz zur Erklärung der geringen Abweichungen wohl nicht in Betracht.

1.165 mg *N, N'*-Dimethyl-alloxazin wurden in 50 ccm Alkohol gelöst und je 1 ccm der Lösung auf folgende Volumina verdünnt:

0.0233 mg in	Fluorescenz
10 ccm	100 %
20 ccm	71 %
30 ccm	60 %
40 ccm	52 %
50 ccm	48 %

Bei dieser Verbindung besteht somit keine Proportionalität zwischen Fluorescenz und Konzentration. Unter den eingehaltenen Bedingungen bewirkt die Zunahme der Farbstoff-Konzentration 1:2 eine Zunahme der Fluorescenz von nicht ganz 1:1.5.

Einfluß der Neutralsalze (Puffer-Konzentration): Bei gleichem p_H hängt die Fluorescenz von der Natur und Konzentration der angewandten Puffer-Lösungen ab. Im allgemeinen nimmt die Fluorescenz mit steigendem Salzgehalt der Lösungen ab. Die Größenordnung des Effekts ergibt sich aus folgenden Beispielen:

a) Lacto-flavin in Wasser ($p_H \sim 6$)	100 %
in $n/_{100}$ -Essigsäure: Natriumacetat ($p_H = 4.7$)	88.5 %
in $n/_{100}$ -Essigsäure: Natriumacetat ($p_H = 6.2$)	88.5 %
b) Lumi-lactoflavin in Wasser ($p_H \sim 6$)	100 %
in $n/_{100}$ -Essigsäure: Natriumacetat ($p_H = 6.2$)	102 %
in $n/_{10}$ -Essigsäure: Natriumacetat ($p_H = 6.2$)	96 %
in $m/_{100}$ -Phosphat: Citronensäure ($p_H = 6.2$)	96 %
in $m/_{10}$ -Phosphat: Citronensäure ($p_H = 6.2$)	90 %
c) Dimethyl-alloxazin in Wasser ($p_H \sim 6$)	100 %
in $n/_{100}$ -Essigsäure: Natriumacetat ($p_H = 6.2$)	93.5 %
in $n/_{100}$ -Essigsäure: Natriumacetat ($p_H = 4.7$)	90 %

³⁾ B. 65, 401 [1932].

Diese Einflüsse bedingen die Hauptschwierigkeit bei der Ermittlung der Dissoziations-Konstanten aus der p_H -Abhängigkeit der Fluoreszenz.

p_H -Abhängigkeit der Fluoreszenz: Um genügend scharf definierte p_H -Werte zu haben, wurden im allgemeinen $m/10$ -Puffer angewandt und der Neutralsalz-Effekt beim p_H -Optimum ermittelt, wo geringe p_H -Verschiedenheiten zu vernachlässigen sind. Im Gebiet des alkalischen Abfalls wurde dann eine prozentisch gleiche Abnahme der Fluoreszenz für jeden einzelnen Puffer angenommen⁴⁾. Die in den Abbild. 1 und 2 angegebenen Werte sind in dieser Weise bereits korrigiert. Im Gebiet des sauren Abfalls, wo sehr verdünnte HCl-Lösungen angewandt wurden, ist keine entsprechende Korrektur vorgenommen.

Als Puffer⁵⁾ dienten: Von $p_H = 0.1$ bis $p_H = 2$ Salzsäure; von $p_H = 2.35$ bis $p_H = 7.8$ Phosphat-Citronensäure nach Mc Ilvaine; von $p_H = 3.2$ bis $p_H = 6.2$ Essigsäure-Natriumacetat; von $p_H = 8.2$ bis $p_H = 10.1$ Glykokoll-Natronlauge; von $p_H = 10.9$ bis $p_H = 12.1$ Phosphat-Natronlauge, $p_H = 13$ $n/10$ -Natronlauge.

Für Abbild. 1 und 2 ist die Fluoreszenz in $n/100$ -Essigsäure: Natriumacetat = 100% gesetzt. Als Korrekturen für den Neutralsalz-Effekt sind berücksichtigt: Bei Lactoflavin: für $n/10$ Mc Ilvaine 7%, für Glykokoll-Natronlauge 8%, für Phosphat-Natronlauge 10%. — Bei Lumi-lactoflavin: für $n/10$ Mc Ilvaine 7%, für Glykokoll-Natronlauge 9%, für Phosphat-Natronlauge 10%.

Zeitliche Einflüsse: Im sauren und neutralen Gebiet ist die Fluoreszenz der untersuchten Verbindungen von der Zeit praktisch unabhängig. Im alkalischen Gebiet ist dies nur für Lumi-lactoflavin der Fall. Beim Lactoflavin wird die Fluoreszenz in den alkalischen Glykokoll-Puffern allmählich schwächer und ändert sich vom reinen Grün nach Blau. Nach 5-stdg. Stehen ging z. B. die Fluoreszenz bei $p_H = 8.5$ von 90% auf 20%, bei $p_H = 9.5$ von 70% auf 35%, bei $p_H = 10.2$ von 55% auf 30% zurück. Ein genauer Vergleich war aber mit Rücksicht auf die Änderung der Farbnuance nicht möglich. In den Phosphat-Natronlauge-Puffern ($p_H = 10.8$ bis 12) nahm umgekehrt die Fluoreszenz des Lacto-flavins mit der Zeit deutlich zu. In reiner Natronlauge ($p_H = 12$ bis 13) war kein Umschlag der Fluoreszenz nach Blau zu beobachten.

Das himmelblau fluoreszierende N, N' -Dimethyl-alloxazin besitzt keine sauren Eigenschaften. Trotzdem wird die Fluoreszenz durch Alkalien zum Verschwinden gebracht. Diese Erscheinung ist jedoch eine zeitliche und wird vermutlich durch hydrolytische Öffnung des Pyrimidin-Ringes bedingt. Läßt man eine Lösung in $n/10$ -NaOH 24 Stdn. bei 15–20° stehen, so ist die Fluoreszenz vollkommen verschwunden, und sie kehrt beim Ansäuern nicht mehr zurück. Zwischen $p_H = 3$ und $p_H = 8$ zeigt das Dimethyl-alloxazin ein breites p_H -Optimum der Fluoreszenz. Bei $p_H = 1.1$ wurde nur noch die Hälfte der maximalen Fluoreszenz gefunden. Berücksichtigt man, daß in diesem Falle die Fluoreszenz der Konzentration nicht proportional ist, so dürfte die basische Dissoziations-Konstante k_b etwa 0.5×10^{-12} ($pK_b = 1.7$) betragen.

Der Rockefeller-Foundation haben wir für die Gewährung eines Stipendiums aufrichtig zu danken.

⁴⁾ Ganz einwandfrei ist diese Art, den Neutralsalz-Fehler zu berücksichtigen, nicht, da sich auch die Zusammensetzung der Puffer (der Glykokoll-Gehalt bei den Glykokoll-Natronlauge-Gemischen und der Phosphat-Gehalt der Phosphat-Natronlauge-Puffer) mit dem p_H ändert.

⁵⁾ Dargestellt nach G. A. Bravo, La concentrazione degli ioni idrogeno, Torino 1929.