

Nach diesen Ergebnissen ergibt sich folgende Stellungnahme zu den oben erwähnten Veröffentlichungen: a) Es ist ein Irrtum, daß der eine von uns „in Wiesbaden u. a. über ein noch nicht rein dargestelltes Krystallinat des Corpus-luteum-Hormons von Keton-Natur“¹⁰⁾ vorgetragen hat oder nur „ein Krystallinat erwähnte, das die Wirkung „des“ Corpus-luteum-Hormons hat“¹¹⁾; in Wiesbaden erfolgte die ausführliche Publikation der oben angegebenen Ergebnisse, d. h. es wurde über die Darstellung und chemische Charakterisierung des ersten einheitlichen Krystallinates mit quantitativ definierter Corpus-luteum-Wirkung berichtet. b) Die Mitteilung von Hartmann und Wettstein beschäftigt sich mit der Kennzeichnung eines wirksamen Stoffgemisches (Schmp. 175—177⁰), das offenbar dem seit 3 Jahren an anderen Arbeitsstätten¹²⁾ vorliegenden Krystallinat vergleichbar ist, und dessen Fraktionierung oben geschildert wurde. c) Abgesehen von den eingehenden (von A. Neuhaus durchgeführten) kristallographischen Messungen, erblicken wir in den von K. H. Slotta und Mitarbeitern veröffentlichten Ergebnissen über Schmelzpunkte und Analysen der „Luteosterone A, C und D“, die noch nicht durch Derivate gekennzeichnet wurden, Bestätigungen von einem Teil unserer bereits im April bekanntgegebenen Ergebnisse.

Eine ausführliche Mitteilung unserer Versuche befindet sich im Druck¹³⁾.

285. Kurt G. Stern und Ensor R. Holiday: Die Photo-flavine, eine Gruppe von Alloxazin-Derivaten¹⁾.

[Aus d. Courtauld Institute of Biochemistry, Middlesex Hosp. Med. School und aus d. Med. Unit., London Hospital, London.]

Eingegangen am 21. Juli 1934.)

Durch Einwirkung von Kalium-methyl- bzw. -äthyl-sulfat auf Alloxazin, sowie auf einige Homologe im Schmelzfluß gelingt es, Verbindungen zu erhalten, die wesentliche Merkmale des Farbstoffes aufweisen, welcher von O. Warburg und W. Christian²⁾ bei Belichtung ihres gelben Oxydations-Fermentes aus Hefe erhalten worden ist. Hierüber ist an diesem Orte bereits kurz berichtet worden¹⁾. Die neuen Verbindungen wurden aufgefaßt als am 9- bzw. 10-ständigen Stickstoffatom alkylierte Alloxazine. Einer analogen Formulierung des Licht-Spaltlings der Flavine schien zu jenem Zeitpunkt das Fehlen einer N-Alkyl-Gruppe im Lactoflavin³⁾, sowie ganz besonders der Befund von R. Kuhn und H. Rudy⁴⁾ entgegenzustehen, wonach der von ihnen bearbeitete Licht-Spaltling des Molken-Farbstoffs, Lumi-lactoflavin, im alkali-labilen Pyrimidin-Ring 2-fach methylierbar sei. Wir betrachten es als eine Bestätigung unserer synthetischen Versuche und der aus ihnen gezogenen Schlüsse, daß nunmehr

¹⁰⁾ Helv. chim. Acta **17**, 878, Zeile 9 v. u.

¹¹⁾ B. **67**, 1272, Anmerk. 6 [1934].

¹²⁾ vergl. Anmerk. 4.

¹³⁾ Ztschr. physiol. Chem.

¹⁾ Vorläuf. Mitteil.: K. G. Stern u. E. R. Holiday, B. **67**, 1104 [1934].

²⁾ Naturwiss. **20**, 980 [1932].

³⁾ R. Kuhn u. Th. Wagner-Jauregg, B. **66**, 1577 [1933].

⁴⁾ B. **67**, 892, 1125 [1934].

R. Kuhn und H. Rudy⁵⁾ auch im Lumi-lactoflavin eine Alkyl-imid-Gruppe nachgewiesen und die von ihnen aus den vorangehenden Methylierungs-Versuchen gezogenen Schlüsse revidiert haben⁶⁾. Die Autoren ziehen nunmehr ebenfalls eine Formulierung des Licht-Spaltlings als ein in 9-Stellung alkyliertes Alloxazin in Betracht, wobei sie es allerdings unterlassen, auf unsere synthetischen Versuche Bezug zu nehmen, welche zuvor kurz mitgeteilt worden waren.

Unseren Versuchen lag der Wunsch zugrunde, das Benz-alloxazin, welches einige Eigenschaften mit dem Photo-Derivat teilt, ihm aber in anderer Beziehung so wenig ähnlich ist, daß R. Kuhn eine analoge Struktur der beiden Körper zunächst ablehnen zu müssen glaubte⁷⁾, in Derivate zu überführen, die, wenn möglich, dem Photo-Derivat in ihren Eigenschaften näher kommen. Nun unterscheidet sich die Summenformel des Alloxazins ($C_{10}H_6N_4O_2$) von derjenigen des Photo-Derivates ($C_{13}H_{12}N_4O_2$) um das Äquivalent von drei Methylgruppen. Dem Entdecker des Alloxazins, O. Kühling, verdanken wir auch die Beschreibung einiger Methyl-Derivate⁸⁾: Das Tolu-alloxazin ist ein im Benzol-Ring, und zwar in 7-Stellung, methyliertes Produkt; im *N, N'*-Dimethyl-alloxazin sind die beiden Imino-Gruppen des Alloxan-Ringes substituiert. Mit dem 1.3.7-Trimethyl-alloxazin und dem Naphth-alloxazin (entstanden durch Kondensation von Naphthylendiamin mit Alloxan) ist die Reihe der bis zur Aufnahme unserer Versuche bekanntgewordenen Alloxazin-Derivate abgeschlossen. Das 1.3.7-Trimethyl-alloxazin, $C_{13}H_{12}N_4O_2$, Kühlings stellt bereits ein Isomeres des Photo-Produktes der Flavine dar. Seine Eigenschaften sind von denen des Benz-alloxazins so wenig abweichend, daß diese Konstitution für das Photo-Derivat nicht in Frage kommt. Das heißt, mittels Alkylierung des Alloxazins sowohl im Benzol- als auch im Alloxazin-Ring war keine Annäherung an das Photo-Derivat zu erwarten. Es verblieb als letzte Möglichkeit die Alkylierung eines der zentralen Stickstoffatome (9 bzw. 10). Für die holo-chinoide Verbindung käme eine derartige Substitution ohne Bildung eines Radikals oder eines Alloxazoniumsalzes mit 5-wertigem Stickstoff nur in Betracht, wenn das Alloxazin außer in der normalen Modifikation (I) auch in der tautomeren Form II reagieren könnte.

Bei Einwirkung von Jodmethyl auf das rote Silbersalz des Alloxazins, sowie von Diazo-methan auf eine ätherische Alloxazin-Suspension erhielten R. Kuhn und F. Baer⁹⁾ das bereits von O. Kühling⁸⁾ aus Dimethyl-alloxan und *o*-Phenylendiamin dargestellte 1.3-Dimethyl-alloxazin. Um in 9-(bzw. 10-)Stellung zu alkylieren, mußte demnach die Reaktionsfähigkeit der H-Atome der beiden Imido-Gruppen in 1- und 3-Stellung aufgehoben bzw. die Reaktionsweise in der tauto-

⁵⁾ B. 67, 1298 [1934].

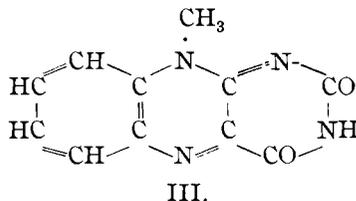
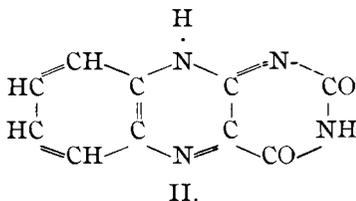
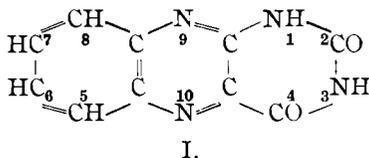
⁶⁾ Hiermit bleiben die analytischen Befunde der Autoren (l. c. 4) allerdings noch unerklärt, insbesondere die Analyse des sogen. „*N, N'*-Dimethyl-lumilactoflavins“, welche auf $C_{15}H_{16}N_4O_2$ stimmt, und die zufolge der neuen Angabe von Kuhn und Rudy, wonach eine Methylgruppe bereits zu Beginn vorhanden war, um CH_2 zu hoch ausfällt.

⁷⁾ B. 66, 1577 [1933], u. zw. S. 1579, nach Versuchen mit F. Baer.

⁸⁾ B. 24, 2363 [1891].

⁹⁾ B. 67, 898 [1934].

meren Modifikation II begünstigt werden. Dies gelingt beim Arbeiten im schwach sauren Medium: Wird Alloxazin mit Kalium-



alkyl-sulfaten bis zum Schmelzfluß erwärmt, der bei 220° beginnt, so fällt der Beginn der Alkylierung zusammen mit dem thermischen Zerfall des Alkylsulfats. Durch Entnahme von Proben in engen Temperatur-Intervallen haben wir uns davon überzeugt, daß das Reaktions-Optimum auf einen relativ schmalen Temperatur-Bereich beschränkt ist, der je nach dem angewandten Salz ein wenig variiert: Für das methyl- und das äthyl-schwefelsaure Salz liegt die optimale Temperatur zwischen 240 und 250°, für das propyl-schwefelsaure Salz etwas tiefer, etwa zwischen 230 und 240°. In diesen Temperatur-Bereichen tritt bereits der Zerfall der Alkylsulfate unter Gasentwicklung und Bildung freier Schwefelsäure in ziemlich erheblichem Umfang ein. In Übereinstimmung damit ist zur Erzielung nennenswerter Ausbeuten an alkyliertem Alloxazin ein großer Überschuß an Kalium-alkyl-sulfat notwendig. Ein Verhältnis von 10–20 Mol. der Salze zu 1 Mol. Alloxazin ist zur Erzielung von etwa 10% Rohprodukt ausreichend. Eine weitere Verbesserung der Ausbeute ist uns bisher nicht gelungen.

Das 9-Methyl-alloxazin haben wir auch in ähnlicher Ausbeute beim Erhitzen von Alloxazin mit Dimethylsulfat im Einschlußrohr auf 150–160° erhalten. Das entsprechende Äthyl-oder Propylderivat konnte bisher auf diese Weise nicht erhalten werden.

Die neuen Alkylierungsprodukte des Alloxazins und seiner Homologen sind ohne Rücksicht auf die Anzahl der in ihnen enthaltenen Kohlenstoffatome bzw. auf die Art der eingeführten Alkylradikale untereinander äußerst ähnlich und bilden eine in ihrem gesamten Verhalten von den bekannten Alloxazinen abgrenzbare Gruppe. Dies zeigt ein Vergleich ihrer wichtigeren Eigenschaften:

Tabelle 1.

	Alloxazine	9-Alkyl-alloxazine
Löslichkeit in Wasser	kaum löslich	merklich löslich
Löslichkeit in verd. Säuren	kaum löslich	merklich löslich
Löslichkeit in Chloroform	kaum löslich	leicht löslich
Farbe in festem Zustand	hell-gelblich	orange-gelb

Tabelle 1.

	Alloxazine	9-Alkyl-alloxazine
Farbe in verd. Säuren	blaßgelb	dunkelgelb
Fluoreszenz	kaum merklich*)	leuchtend grün
Spektrum	langwelligste Bande noch im UV.	langwelligste Bande im Blauviolett
Verhalten beim Schmelzen	kein deutlicher Schmp. bis 350 ⁰ **)	Schmp. variiert zwi- schen 290 und 330 ⁰ (unt. Zers.)

*) 1.3-Dimethyl-alloxazin fluoresciert himmelblau (Kuhn).

***) 1.3-Dimethyl-alloxazin schmilzt bei 236⁰, 1.3.7-Trimethyl-alloxazin bei 205⁰ bis 210⁰ (Kühling).

Es muß allerdings vermerkt werden, daß die oben angegebenen Verschiedenheiten in so ausgesprochenem Maße nur für den Vergleich des einfachen Alloxazins und seiner im Benzol-Ring substituierten Homologen (Tolu- und Xylo-alloxazine) mit den neuen Verbindungen zutreffen. Die im Alloxan-Ring substituierten Alloxazine nehmen in mancher Hinsicht eine Mittelstellung ein.

Gemeinsame Merkmale der beiden Verbindungsgruppen sind: Reversible Reduzierbarkeit, Auftreten roter Zwischenstufen bei Reduktion in mineral-saurer Lösung, Bildung schwerlöslicher Silbersalze, die in der Färbung (gelb-bis braunrot) etwas zu variieren scheinen.

Der Beweis dafür, daß unter unseren Versuchs-Bedingungen eine Alkylierung eines Pyrazin-Stickstoffs des Alloxazins stattfindet, genauer gesagt, daß eine Alkylgruppe an das 9-ständige N-Atom tritt, ist ein indirekter: Die Analyse des aus dem einfachsten Alloxazin mittels Dimethylsulfats (in saurem Medium, unter Druck, bei 140–150⁰) erhaltenen Reaktionsproduktes beweist den Eintritt einer Methylgruppe in das Molekül. Die Methylimid-Bestimmung ergibt das Vorhandensein einer N.CH₃-Gruppierung. Da die neue Verbindung verschieden ist von den bekannten und hinsichtlich ihrer Konstitution durch die Art der Synthese festgelegten Mono-methyl-Derivaten des Alloxazins, bei denen die Methylgruppe entweder am Benzol- oder am Alloxan-Ring haftet, kommt für die neue Verbindung nur die Konstitution eines in 9- oder 10-Stellung alkylierten Alloxazins in Betracht. Von diesen beiden Möglichkeiten ist allein das 9-Alkyl-Derivat zwangslos zu formulieren (III).

Körper von sehr ähnlichen Eigenschaften wurden erhalten aus Alloxazin und Kalium-propyl-sulfat, aus 7-Methyl-alloxazin („Tolu-alloxazin“) und Kalium-methyl- und -äthyl-sulfat, aus drei erstmalig von uns dargestellten „Xylo-alloxazinen“, nämlich 6.7-, 7.8- und 6.8-Dimethyl-alloxazin, und Kalium-methyl-sulfat, sowie endlich aus 6.7- und aus 6.8-Dimethyl-alloxazin und Kalium-äthyl-sulfat. Bemerkenswerterweise war es nicht möglich, analoge Verbindungen aus dem 1- oder aus dem 1.3-Dimethyl-alloxazin in der Alkali-alkyl-sulfat-Schmelze zu gewinnen. In diesen beiden Alloxazinen ist das H-Atom der 1-ständigen Imido-Gruppe substituiert und damit die Bildung der für eine Alkylierung in 9-Stellung geforderten tautomeren Form nach Formel II verhindert. Wir betrachten dies als Stütze für die Formulierung der neuen Derivate nach III.

In Analogie zum einfachsten Vertreter dieser Gruppe fassen wir die obigen Reaktionsprodukte auf als 9-Propyl-alloxazin bzw. 7-Methyl-9-äthyl-alloxazin,

6.7.9-, 7.8.9- und 6.8.9-Trimethyl-alloxazin und 6.7- bzw. 6.8-Dimethyl-9-äthyl-alloxazin. Bisher konnten noch nicht alle diese Derivate in einer zur völligen Reindarstellung und eingehenden Untersuchung ausreichenden Menge dargestellt werden. Rein liegen bisher vor (vergl. Versuchs-Teil): Das 9-Methyl-alloxazin, das 9-Propyl-alloxazin, das 7-Methyl-9-äthyl-alloxazin.

Spektre: Gegenüber den Ausgangsverbindungen zeigen die 9-Alkyl-alloxazine meist eine Verschiebung der Absorptionsbanden-Maxima nach dem langwelligen Ende. Die Banden-Schwerpunkte kommen in einigen Fällen denjenigen des Photo-Derivates der Flavine um wenige $m\mu$ nahe, in einigen Fällen wird eine Übereinstimmung innerhalb der Fehlergrenzen der Methode gefunden. Da noch nicht alle Verbindungen völlig rein vorliegen, kann über die absoluten Beträge der Extinktion zurzeit noch nichts Endgültiges ausgesagt werden. Bisher zeigten die vermessenen Verbindungen, mit Ausnahme des reinen 7-Methyl-9-äthyl-alloxazins, durchweg eine geringere molare Extinktion, verglichen mit dem Naturprodukt. Dies kann aber unter Umständen auf schwach absorbierende Begleitstoffe zurückführbar sein. Die folgende Zusammenstellung soll vorwiegend dem Zweck eines qualitativen Vergleichs dienen (Tabelle 2). Wie in der gesonderten Abhandlung¹⁰⁾ über das spektrale Verhalten des Photo-Derivates, des Alloxazins und der neuen Gruppe 9-alkylierter Alloxazine am Beispiel der 7-Methyl-9-äthyl-Verbindung dargelegt wird, wird das Spektrum aller dieser Körper durch die Variierung der Wasserstoff-Ionen-Konzentration, sowie bei der Reduktion in gleichem Sinne beeinflusst.

Tabelle II: Banden-Schwerpunkte der Alloxazine und ihrer 9-Alkyl-Derivate.

Verbindung	Lösungsmittel	Absorptions-Maxima		
Alloxazin	verd. Na_2CO_3	257	340	↔ 380 $m\mu$
7-Methyl-alloxazin	verd. Na_2CO_3	255	340	390
6.7-Dimethyl-alloxazin	0.5-n. Na_2CO_3	255	349	398 (Inflektion)
7.8-Dimethyl-alloxazin	0.5-n. Na_2CO_3	0	357	402 (Inflektion)
6.8-Dimethyl-alloxazin	0.5-n. Na_2CO_3	0	360	400 (Inflektion)
9-Methyl-alloxazin	0.2-n. Natronlauge	256	328	380
9-Propyl-alloxazin	0.2-n. Natronlauge	255	328	392
6.7.9-Trimethyl-alloxazin	0.2-n. Natronlauge	267	342	420
7.8.9-Trimethyl-alloxazin	0.2-n. Natronlauge	0	356	444 (Inflektion)
6.8.9-Trimethyl-alloxazin	0.2-n. Natronlauge	264	352	434
7-Methyl-9-äthyl-alloxazin	0.2-n. Natronlauge	266	340	430
6.7-Dimethyl-9-äthyl-alloxazin	0.2-n. Natronlauge	0	338	412
6.8-Dimethyl-9-äthyl-alloxazin	0.2-n. Natronlauge	0	345	416
Photo-Derivat der Flavine	0.2-n. Natronlauge	267	352	440

0 = nicht gemessen, ↔ nicht getrennt.

Potentiale: Die 9-Alkyl-alloxazine stellen elektro-aktive, reversible Oxydations-Reduktions-Systeme dar. Das Normal-potential der bisher ge-

¹⁰⁾ B. 67, 1352 [1934].

prüften Derivate ist relativ negativ und liegt in der Nachbarschaft des Potentials des Photo-Derivates der Flavine. In saurer Lösung erfolgt bei schrittweiser Reduktion die Bildung eines radikal-artigen, rotgefärbten Semi-chinons. Die spektralen Änderungen sind in der erwähnten, getrennten Abhandlung¹⁰⁾ beschrieben, über die Ergebnisse der potentiometrischen Analyse soll an anderem Orte berichtet werden.

Alkali-Abbau: Im Gegensatz zum einfachen Alloxazin und seinen im Benzol-Ring substituierten Homologen und in Übereinstimmung mit dem natürlichen Photo-Derivat der Flavine werden die 9-Alkyl-alloxazine durch verd. Alkalien in der Wärme rasch angegriffen. Wir haben den Abbau des nicht fraktionierten 7-Methyl-9-äthyl-alloxazins durch 0.2-n. Barytwasser studiert. Neben Harnstoff, der in einer Ausbeute von 21–23 % d. Th. erfaßt wurde, tritt ein Gemisch chloroform-löslicher Farbstoffe auf, die nach dem Vorgange von R. Kuhn und H. Rudy⁴⁾ durch Extraktion mit nach ihrer Basizität abgestuften Lösungsmitteln fraktioniert wurden. Vorweg sei bemerkt, daß das 7-Methyl-9-äthyl-alloxazin seiner Chloroform-Lösung bereits durch Bicarbonat entzogen werden kann, während das natürliche Photo-Derivat erst durch verd. Natronlauge extrahiert wird. Beim aufeinanderfolgenden Ausziehen der Chloroform-Lösung der alkalischen Abbauprodukte mit Bicarbonat-, Natriumcarbonat- und mit Natriumhydroxyd-Lösung ging in die Bicarbonat-Lösung der Hauptteil über, in Sodalösung nur Spuren und der Rest in die verd. Lauge. In Tabelle 3 wird das Verhalten der Fraktionen demjenigen der Muttersubstanz gegenübergestellt:

Tabelle 3.				
	7-Methyl-9-äthyl- alloxazin	Bicarbonat- Fraktion	Soda- Fraktion	Natronlauge- Fraktion
Schmelzprobe..	Dunkelfärbung > 240°, Schmp. 326° unt. Zers.	Schmp. 316° unt. Zers.	Schmilzt < 137° unt. Zers.	Sintert bei 240°, gelbes Subli- mat
In konz. HCl ..	Alle Verbindungen lösen sich mit dunkelgelber Farbe.			
+ granuliert.				
Zink.....	beständ. rote Zwischenstufe	beständ. rote Zwischenstufe	unbeständ. rote Zwischenstufe	beständ. rote Zwischenstufe
In Wasser	löslich	schwer löslich	löslich	schwer löslich
+ AgNO ₃	roter N.	Farbvertiefung nach dkl. gelb	orange-rote Färbung	keine Ände- rung
zentrifugiert ..	roter N.	orange-gelber N.	orange-roter N.	—

Wir haben die Natronlauge-Fraktion, die nach ihrem Verhalten bei der Schmelzprobe der Kuhnschen Carbonsäure aus seinem Lumi-lactoflavin nahestehen schien, nach dem Umkrystallisieren analysieren lassen. Dr. Weiler/Oxford fand 61.47 % C, 6.10 % H und 19.61 % N, während Kuhn⁴⁾ für die Carbonsäure 62.09 % C, 5.30 % H und 12.68 % N findet. Es handelt sich danach um verschiedene Körper.

Zur Nomenklatur: Im Hinblick darauf, daß die am 9-ständigen Stickstoffatom alkylierten Alloxazin-Derivate eine gut definierte Verbindungsgruppe darstellen mit Eigenschaften, die dem Photo-Derivat der natürlichen Flavine einen Platz in dieser Gruppe zuweisen, schlagen wir vor, diesen Verbindungen die Gruppen-Bezeichnung Photo-flavine zu geben.

Dem könnte entgegen gehalten werden, daß allein das Photo-Derivat der natürlichen Flavine bisher mit Hilfe einer Licht-Reaktion erhalten wurde, wohingegen unsere synthetischen Verbindungen auf anderem Wege gewonnen worden sind. Nachdem jedoch einmal für das Zustandekommen der besonderen Eigenschaften des Photo-Derivates der Flavine die Struktur eines 9-Alkyl-alloxazins als wesentlich erkannt worden ist, ist es wohl denkbar, daß es späterhin möglich sein wird, sowohl mit Hilfe der synthetischen 9-Alkyl-alloxazine auch in der Natur nicht vorkommende Flavine aufzubauen, als auch umgekehrt aus derartigen naturfremden Flavinen durch alkalische Photolyse die zugrunde liegenden 9-Alkyl-alloxazin-Derivate zurückzugewinnen. Wir möchten hier auf den gleich gelagerten Fall der Hämine hinweisen. Auch dort sind die Abkömmlinge des charakteristischen Tetra-pyrrol-Komplexes ohne Rücksicht, ob sie natürliche oder naturfremde Produkte darstellen, unter einer Gruppen-Bezeichnung zusammengefaßt. Durch Vereinigung von naturfremden Häminen mit Globin wurden Hämoglobine erhalten¹¹⁾, die in ihrem physikochemischen Verhalten (reversible Gasbindung) dem natürlichen Blutfarbstoff entsprechen.

Solange die Identität der aus natürlichen Flavinen erhaltenen Photo-Derivate und die genaue Anordnung der am Benzol-Ring haftenden Alkyle unsicher ist, sollten die ursprünglichen Bezeichnungen, wie Photo-Derivat des gelben Oxydations-Fermentes, Lumi-lactoflavin, Photo-hepatoflavin beibehalten werden. Die hypothetische Stammsubstanz der Gruppe, das Tautomere des Alloxazins mit der Formel II, wird in Analogie zum Vorgehen von F. Wrede und E. Strack¹²⁾ im Falle des Pyocyanins als Nor-photoflavin bezeichnet. Ein weiteres Einteilungs-Prinzip ist durch die Natur der am 9-ständigen N-Atom haftenden Alkylgruppe gegeben. Man hätte dann also zwischen Methyl-[nor-photoflavinen], Äthyl-[nor-photoflavinen] usf. zu unterscheiden, die gemeinsam mit ihren im Benzol-Ring substituierten Homologen Untergruppen bilden.

Zur Konstitution der Photo-Derivate aus natürlichen Flavinen.

Aus der Zusammenstellung in Tabelle 4 geht hervor, daß, abgesehen von den Isomerie-Möglichkeiten bei gleicher Molekülgröße, die vorliegenden Analysen natürlicher Photo-flavine nicht einmal die Identität ihrer empirischen Formeln beweisen:

Tabelle 4.					
Quelle	Gef. im Mittel	Empir. Formel	Ber.	Literatur	
Hefe	60.98 % C	$C_{13}H_{12}N_4O_2$	60.9 % C	O. Warburg u. W. Christian ¹³⁾	
	5.035 % H		4.7 % H		
	21.40 % N		21.9 % N		
Milch	60.78 % C	$C_{13}H_{12}N_4O_2$	60.9 % C	R. Kuhn u. a. ¹⁴⁾	
	4.54 % H		4.7 % H		
	22.0 % N		21.9 % N		
Milch	61.83 % C	$C_{14}H_{14}N_4O_2$	62.2 % C	Ph. Ellinger u. W. Koschara ¹⁵⁾	
	5.22 % H		5.2 % H		
	20.41 % N		20.7 % N		

Selbst wenn die aus natürlichen Flavinen erhaltenen Photo-Derivate nur im Verhältnis von Isomeren oder Homologen zueinander stehen sollten, kann

¹¹⁾ O. Warburg u. E. Negelein, *Biochem. Ztschr.* **244**, 9 [1932].

¹²⁾ B. **62**, 2051 [1929].

¹³⁾ *Biochem. Ztschr.* **257**, 492 [1933].

¹⁴⁾ B. **66**, 1955 [1933].

¹⁵⁾ B. **66**, 1414 [1933].

bereits jetzt angenommen werden, daß ihnen die Konstitution von am 9-ständigen N-Atom alkylierten Alloxazinen zugrunde liegt. Die von R. Kuhn und H. Rudy⁵⁾ auf ihren Befund, wonach nur 0.5 Mole Alkylimid analytisch erfaßt werden konnten, gegründete Hypothese, daß das Lumi-lactoflavin aus zwei Komponenten, nämlich einer alkylimid-haltigen und einer alkylimid-freien, besteht, ist uns unwahrscheinlich. Auch die N-Methyl-Gruppe des 9-Methyl-alloxazins ist analytisch nicht quantitativ erfaßbar (s. Versuchs-Teil). Wir haben oben gezeigt, wie die 9-Alkyl-alloxazine in ihrem gesamten Verhalten von den N-alkyl-freien Alloxazinen abweichen. Ein Gemisch aus zwei derartigen Körpern würde sich sogleich als heterogen zu erkennen geben. Wie im Versuchs-Teil am Beispiel des 7-Methyl-9-äthyl-alloxazins gezeigt wird, lassen sich derartige Gemische sowohl durch fraktionierte Krystallisation als auch durch Hochvakuum-Sublimation trennen, während die natürlichen Photo-Derivate bei derartigen Operationen keine Aufteilung erleiden. Die von Kuhn und Rudy angeführte Tatsache, daß beim Alkali-Abbau des Lumi-lactoflavins zwei Reihen von Abbauprodukten auftreten, ist wohl zwangloser wie folgt zu interpretieren: Der Angriff von Alkalien auf ein 9-Alkyl-alloxazin kann beginnen a) mit der Abspaltung der 9-ständigen Alkylgruppe unter Bildung des zugrunde liegenden Alloxazins und b) mit der hydrolytischen Öffnung des Pyrimidin-Ringes. [Für a) führen wir als Analogie den Alkali-Abbau des Pyocyans an, der in erster Stufe zum α -Oxy-phenazin führt¹²⁾.] Das hierbei entstehende Alloxazin wäre gegen weiteren Alkali-Angriff relativ beständig. b) führt über das Oxo-chinoxalin-carbonsäure-ureid zur entsprechenden Carbonsäure. Während nun die „Bicarbonat-Fraktion“ Kuhns vorwiegend diese Carbonsäure, $C_{12}H_{12}N_2O_3$, enthält, stellt seine „Soda-Fraktion“, allen ihren Eigenschaften zufolge, wohl das auf Weg a) entstehende Alloxazin dar. Seine Analysen-Zahlen weisen auf eine empirische Formel zwischen einem Tolu- und einem Xylo-alloxazin, das durch Titration ermittelte Äquivalentgewicht 240 auf ein Xylo-alloxazin (Mol.-Gew. 242) hin. Eigene, am Benz-alloxazin ausgeführte alkalimetrische Titrations in wäßriger und alkohol-haltiger Lösung führten allerdings zu zu niedrigen Äquivalenz-Werten bei Annahme einer Mono-natrium-salz-Bildung und zu zu hohen Werten für eine Di-salz-Bildung. Im Spektraltyp herrscht Übereinstimmung zwischen den von uns dargestellten drei Xylo-alloxazinen (vergl. Tabelle 2) und dem von Kuhn gemessenen Spektrum des soda-löslichen Abbauproduktes des Lumi-flavins.

Zusammenfassend halten wir es für wahrscheinlich, daß das Lumi-lactoflavin ein Xylo-9-methyl-alloxazin darstellt.

Beschreibung der Versuche.

(Mitarbeitet von E. Stern).

Alloxazine: Das einfache Benz-alloxazin und das Tolu-alloxazin (7-Methyl-alloxazin) wurden nach O. Kühling⁸⁾ dargestellt.

Xylo-alloxazine: a) 6.7-Dimethyl-alloxazin: Technisches o-Xyloidin, in dem überwiegend die asymmetrische Komponente (1.2-Dimethyl-4-amino-benzol) enthalten war, wurde fraktioniert und die zwischen 215 bis 220⁰ übergehende hellgelbe Fraktion nach der von E. Noelting u. a.¹⁶⁾ für

¹⁶⁾ B. 34, 2242 [1901].

reines *asymm-o*-Xylidin gegebenen Vorschrift nitriert. Hierbei wurde in kleiner Ausbeute eine braunrote Verbindung isoliert, die nach 2-maligem Umkrystallisieren aus Alkohol bei 139–140° schmolz und das 5-Nitro-4-amino-1.2-xylol darstellte. 1 g der Verbindung wurden mit Zinkstaub nach E. Noelting u. a.¹⁷⁾ reduziert und das gebildete 4,5-Diamino-1.2-xylol in das Hydrochlorid übergeführt. 0.9 g Alloxan wurden in 30 ccm Wasser gelöst und mit der Lösung des Xylylendiamin-Hydrochlorids erwärmt. Das sich abscheidende hellgelbe Alloxazin wurde durch Auskochen mit Alkohol gereinigt, in einem anderen Versuche geschah die weitere Reinigung durch Umfällen aus Sodalösung mit Salzsäure. Ausbeute: 0.7 g 6.7-Dimethylalloxazin, das sich im geschlossenen Röhrchen oberhalb 300° dunkel färbt, ohne bis 340° zu schmelzen.

b) 6.8-Dimethyl-alloxazin: Aus reinem *asymm. m*-Xylidin (1.3-Dimethyl-4-amino-benzol) wurde nach C. Willgerodt und F. Schmierer¹⁸⁾ das *asymm. m*-Acetxylid vom Schmp. 130° hergestellt. Dieses wurde nach S. Gabriel und R. Stelzner¹⁹⁾ zum Nitro-*m*-acetxylid vom Schmp. 171 bis 172° nitriert. Nach dem Verseifen mit Schwefelsäure wurde das rote 5-Nitro-4-amino-1.3-xylol erhalten, das nach Umkrystallisieren aus Alkohol bei 70° schmolz²⁰⁾. Die weitere Verarbeitung und Herstellung des 6.8-Dimethyl-alloxazins wurde wie unter a) beschrieben ausgeführt. Aus 1 g 4,5-Diamino-1.3-xylol und 0.9 g Alloxan wurden nach 3-maligem Auskochen mit Alkohol und 1-maligem Auskochen mit Wasser 0.22 g des Alloxazins erhalten, das sich im geschlossenen Röhrchen oberhalb 300° langsam unter Dunkelfärbung zersetzt.

c) 7.8-Dimethyl-alloxazin: Hierfür stand ein Originalpräparat E. Noeltings des 3.4-Diamino-1.2-dimethyl-benzols¹⁷⁾ zur Verfügung, das wir der Freundlichkeit von Hrn. Prof. Battagay, Mühlhausen i. E. verdanken. Seinem Aussehen und Schmelzpunkt nach zu urteilen (88–89°), hatte sich das Präparat unverändert seit 1902 erhalten. 0.6 g der Verbindung wurden in das Hydrochlorid übergeführt und das 7.8-Dimethyl-alloxazin durch Kondensation mit 0.4 g Alloxan dargestellt. Nach Auskochen mit Wasser und Trocknen bei 100° wurden 0.55 g eines gelben Präparates erhalten, das zwischen 305 und 310° unt. Zers. schmolz.

9-Alkyl-alloxazine (Photo-flavine). d) 9-Methyl-alloxazin: 6 g Alloxazin wurden nach Trocknen bei 120° mit 70 ccm Dimethylsulfat vermischt und auf 2 Einschlußrohre verteilt. Innerhalb von 2 Stdn. wurde im Schießofen auf 150° erwärmt und eine weitere Stunde zwischen 150° und 160° erhalten. Beim Öffnen der erkalteten Bomben war kaum ein Überdruck vorhanden. Die bräunliche Reaktionsmischung wurde mit insgesamt 1 l warmem Wasser extrahiert. Nach Zusatz von Eisessig wurde mit insgesamt etwa 4 l Chloroform in kleinen Anteilen ausgeschüttelt. Die gelben, lebhaft grün fluoreszierenden Chloroform-Auszüge wurden auf 1 l eingengt und der Farbstoff zum größeren Teil mit einigen hundert ccm 0.1-n. NaOH extrahiert. Die wäßrige Lösung wurde mit Eisessig angesäuert und der größte Teil des Farbstoffs wieder mit Chloroform ausgeschüttelt. Das Verfahren wurde wiederholt und der letzte Chloroform-Auszug in vacuo zur Trockne verdampft.

¹⁷⁾ B. 35, 628 [1902].

¹⁸⁾ B. 38, 1472 [1905].

¹⁹⁾ B. 29, 305 [1896].

²⁰⁾ Für spätere Versuche stand auch ein Präparat zur Verfügung, das wir der Freundlichkeit der Direktions-Abteilung Höchst der I.-G. Farbenindustrie A.-G. verdanken.

Die sich zuletzt abscheidenden festen Anteile sind merklich dunkler gelb als die zuerst ausfallenden gefärbt. Beim Ausziehen des Rückstandes mit 100 ccm verd. Essigsäure auf dem Wasserbade bleiben die helleren Anteile ungelöst. Die filtrierte essigsäure Lösung wird im Vakuum bis zur Abscheidung reichlicher Krystallmengen eingengt; die stark gelben Krystalle werden nochmals aus verd. Essigsäure umkrystallisiert. 50 mg Ausbeute an reinem Endprodukt. Im geschlossenen Schmelzröhrchen tritt oberhalb 300° Dunkelfärbung und oberhalb 320° Zersetzung ein.

3.524 mg Sbst.: 7.405 mg CO₂, 1.120 mg H₂O, 0.020 mg Rückstand. — 2.256 mg Sbst.: 0.469 ccm N (21.5°, 756 mm).

C₁₁H₈N₄O₂ (228). Ber. C 57.9, H 3.5, N 24.6, CH₃ 6.58.

Gef. „ 57.31, „ 3.55, „ 23.97, „ 4.84.

Methylimid-Bestimmung: 4.873 mg Sbst.: 1. Destill. 3.260 mg AgJ; 2. Destill. 0.430 mg AgJ; 3. Destill. — mg AgJ (je 30 Min. bis 360° erhitzt).

Eine Verbindung von den gleichen Eigenschaften wurde aus Alloxazin und Kalium-methyl-sulfat im Schmelzfluß erhalten.

e) 9-*n*-Propyl-alloxazin: Aus *n*-Dipropylsulfat wurde durch Erwärmen mit alkohol. KOH Kalium-*n*-propyl-sulfat²¹⁾ hergestellt. Schmilzt nach Umkrystallisieren aus Alkohol unter Gasentwicklung bei 220°. 1 g Alloxazin wurde mit 5 g des Alkylsulfats im Paraffinbade auf 243° erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die dunkle Schmelze in der gleichen Weise wie unter d) beschrieben auf das 9-Alkyl-alloxazin verarbeitet. Schmp. der braunen Krystalle nach 1-maligem Umkrystallisieren aus verd. Essigsäure 273°, in einem anderen Versuch 280°, nach 2-maligem Umkrystallisieren um 290° ohne merkliche Zersetzung.

3.556 mg Sbst.: 7.885 mg CO₂, 1.580 mg H₂O, 0.035 mg Rückstand. — 2.185 mg Sbst.: 0.397 ccm N (21.5°, 755 mm).

C₁₃H₁₂N₄O₂ (256). Ber. C 60.9, H 4.73, N 21.86.

Gef. „ 60.47, „ 4.97, „ 20.92.

f) 7-Methyl-9-äthyl-alloxazin: 2 g Tolu-alloxazin (7-Methyl-alloxazin) wurden mit 20 g Kalium-äthyl-sulfat vermischt, in 4 Portionen auf 250° erwärmt und die Schmelzen wie oben beschrieben auf das 9-Alkyl-alloxazin verarbeitet; erhalten 310 mg Rohprodukt. Dieses ließ sich durch Behandlung mit verd. Essigsäure in 5 Fraktionen zerlegen, die mit zunehmender Löslichkeit tiefer gelb gefärbt waren.

I: Schmp. um 350° (Dunkelfärbung oberhalb 340°). Gewicht 65 mg. 3.996 mg Sbst.: 8.410 mg CO₂, 1.480 mg H₂O; 2.568 mg Sbst.: 0.514 ccm N (20.5°, 755 mm). — II: Schmp. 324.5° (Dunkelfärbung oberhalb 300°). Gewicht 24 mg. — 3.515 mg Sbst.: 7.500 mg CO₂, 1.490 mg H₂O, 0.045 mg Rückstand; 3.005 mg Sbst.: 0.567 ccm N (20.5°, 758 mm). — III: Schmp. 301° unt. Zers. (Dunkelfärbung oberhalb 290°). Gewicht 34 mg. — 4.023 mg Sbst.: 8.630 mg CO₂, 1.690 mg H₂O, 0.040 mg Rückstand. — 2.211 mg Sbst.: 0.406 ccm N (20.5°, 758 mm). — IV: Schmp. um 320° unt. Zers. (Dunkelfärbung oberhalb 260°, sintert um 275°.) Gewicht 34 mg. 3.829 mg Sbst.: 8.355 mg CO₂, 1.630 mg H₂O, 0.082 mg Rückstand. — 2.625 mg Sbst.: 0.490 ccm N (24°, 762 mm). — V: Schmp.

²¹⁾ N. Nef, A. 318, 41.

325—330^o unt. Zers. Gewicht 7.6 mg. — 3.666 mg Subst.: 8.170 mg CO₂, 1.620 mg H₂O, 0.058 mg Rückstand; 2.048 mg Subst.: 0.381 ccm N (22.5^o, 762 mm).

Ber. für Tolu-alloxazin C ₁₁ H ₈ N ₄ O ₂ (228):	Gefunden					Ber. für 7-Methyl-9-äthyl-allox- azin, C ₁₃ H ₁₂ N ₄ O ₂ (256).
	Fraktion I	II	III	IV	V	
C 57.9	57.4	58.19	58.5	59.51	60.78	60.9
H 3.5	4.14	4.74	4.7	4.76	4.94	4.7
N 24.6	23.12	21.89	21.3	21.48	21.54	21.9

Fraktion III ergab nach Sublimation im Hochvakuum bei max. 240^o: Der Schmelzpunkt war von 301^o auf 307^o (unt. Zers.) gestiegen. — 3.632 mg Subst.: 7.910 mg CO₂, 1.420 mg H₂O, 0.048 mg Rückstand. — 2.353 mg Subst.: 0.452 ccm N (23^o, 753 mm): C 59.40, H 4.37, N 21.95.

Die Analysen hat Dr. G. Weiler-Oxford ausgeführt.

Hrn. Prof. Dr. E. C. Dodds sei auch an dieser Stelle für sein Interesse an der Untersuchung, dem Vorstand der Middlesex Hospital Medical School für die dem einen von uns (K. G. Stern) gewährte Gastfreundschaft aufs beste gedankt. Hrn. Dr. A. Burawoy verdanken wir wertvolle Hinweise.

286. Richard Kuhn, Theodor Wagner-Jauregg und Hans Kaltschmitt: Über die Verbreitung der Flavine im Pflanzenreich¹⁾.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für medizin. Forschung, Institut für Chemie, Heidelberg.]
(Eingegangen am 5. Juli 1934.)

Die Lipochrome (Carotinoide), die sich in höheren Tieren finden, entstammen vorzugsweise dem Pflanzenreich und werden mit der Nahrung aufgenommen. Dies ist in Untersuchungen dieses Instituts besonders für die Lipochrome des Eidotters²⁾ und der Vogelfedern³⁾ nachgewiesen worden. Im Tierkörper finden zwar vielfach Umformungen der pflanzlichen Carotinoide statt, wie sie zur Bildung des A-Vitamins führen. Die höheren Tiere sind aber nicht befähigt, solche Verbindungen synthetisch aufzubauen, sondern auf die pflanzlichen Carotinoide der Nahrung als Vorstufen angewiesen. Daß α -Carotin, β -Carotin, γ -Carotin und Krypto-xanthin A-Vitamin-Wirkung besitzen, ist für diese allgemeinere Erkenntnis das beste und wichtigste Beispiel. Zur Synthese der Lipochrome sind nicht nur die grünen Pflanzen, sondern auch Hefen⁴⁾ und Bakterien⁵⁾ befähigt.

In den Lyochromen (Flavinen) ist nun eine weitere Klasse natürlicher Farbstoffe aufgefunden worden, die zu Vitaminen in Beziehung steht. Im kristallisierten Lacto-flavin⁶⁾ liegt das reine Vitamin B₂ vor⁷⁾. Diese

¹⁾ Vorläufig mitgeteilt auf dem IX. Internationalen Chemiker-Kongreß in Madrid, am 7. April 1934.

²⁾ R. Kuhn, A. Winterstein u. E. Lederer, Ztschr. physiol. Chem. **197**, 141 [1931]. ³⁾ H. Brockmann u. O. Völker, Ztschr. physiol. Chem. **224** 193 [1934].

⁴⁾ E. Lederer, Compt. rend. Acad. Sciences **197**, 1649 [1933].

⁵⁾ E. Chargaff u. J. Dieryck, Naturwiss. **20**, 872 [1932]; E. Chargaff, Compt. rend. Acad. Sciences **197**, 946 [1933].

⁶⁾ R. Kuhn, P. György u. Th. Wagner-Jauregg, B. **66**, 1034 [1933].

⁷⁾ P. György, R. Kuhn u. Th. Wagner-Jauregg, Naturwiss. **21**, 560 [1933]; R. Kuhn, H. Rudy u. Th. Wagner-Jauregg, B. **66**, 1950 [1933].