

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. Hr. 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].

Erkenntnis hat es sehr unwahrscheinlich gemacht, daß die Vorstellung von Ph. Ellinger und W. Koschara^{7a)}, welche die Lyochrome als „tierische Farbstoffe“ bezeichnen, zutrifft. Es war vielmehr zu erwarten, daß die Lyochrome gerade dadurch ausgezeichnet sind, daß sie von den auf Vitamin B₂ angewiesenen Tieren nicht synthetisch aufgebaut werden können.

Nachdem die Beziehungen zwischen Vitamin-B₂- und Flavin-Gehalt bisher im wesentlichen nur für tierische Organe erkannt waren⁸⁾, haben wir die Verbreitung der Flavine im Pflanzenreich näher untersucht. Das Ergebnis ist, daß auch in den Pflanzen Lyochrome außerordentlich weit verbreitet sind, und daß die flavin-reichsten Produkte des Pflanzenreiches (Früchte, grüne Blätter u. a.) mit den vitamin-B₂-reichsten übereinstimmen. Es ist anzunehmen, daß die in höheren Tieren angetroffenen Flavine direkt (bei Fleisch-Fressern indirekt) der Pflanzen-Nahrung entstammen. Mit Umformungen der Pflanzen-Flavine im Tierkörper wird man wie bei den Carotinoiden zu rechnen haben. Man erkennt, daß die Natur den Pflanzen ein besonderes Vorrecht zur Synthese nicht nur der Lipochrome, sondern auch der Lyochrome verliehen hat. Diese Übereinstimmung wird noch eindrucksvoller durch die Erfahrung, daß, ähnlich wie Carotinoide, auch Flavine nicht nur von grünen Pflanzen, sondern anscheinend auch von Hefen und Bakterien⁹⁾ synthetisiert werden. Die durch besonders hohen Carotinoid-Gehalt ausgezeichneten Früchte (Aprikosen, Hagebutten, Tomaten u. a.) und grünen Blätter (Spinat, Gras) zeichnen sich vielfach auch durch einen hohen Gehalt an Flavinen aus.

Im Zusammenhang mit der von uns angenommenen überwiegenden pflanzlichen Herkunft des Lacto-flavins (Vitamin B₂) in tierischen Produkten ist folgende Überschlags-Rechnung von Interesse: Werden einer Kuh 7 kg des von uns analysierten Heumehls verfüttert, so nimmt sie damit 50 mg Flavin auf. Nehmen wir an, daß diese Kuh 10 l Milch vom durchschnittlichen Flavin-Gehalt von 1.0 mg je Liter liefert, so würden nur etwa 20% des mit der Nahrung aufgenommenen Vitamins B₂ in die Milch gelangen^{9a)}.

Für Rinder-Leber folgt, daß der Farbstoff-Gehalt mit der Vitamin-B₂-Wirksamkeit sehr gut übereinstimmt. Nach P. György, R. Kuhn u. Th. Wagner-Jauregg¹⁰⁾ sind je Tag und Ratte 0.2–0.4 g Frisch-Leber erforderlich. Diese enthalten nach Tabelle 2 etwa 3–6 γ Flavin, was mit der Wirksamkeit von kristallisiertem Lacto-flavin vorzüglich übereinstimmt. Nach einer Mitteilung von P. Karrer, H. Salomon und K. Schöpp sollte bei der Leber eine außerordentliche Diskrepanz zwischen Flavin-Gehalt und Wachstums-Wirkung bestehen. Die genannten Autoren haben nämlich aus 300 kg Leber nur 28 mg Flavin isoliert und angenommen, daß bei der

^{7a)} B. 66, 315, 808, 1411 [1933].

⁸⁾ P. György, R. Kuhn u. Th. Wagner-Jauregg, *Klin. Wochschr.* **12**, 1241 [1933]; R. Kuhn, *Journ. Soc. chem. Ind.* **52**, 981 [1933]; P. György, R. Kuhn u. Th. Wagner-Jauregg, *Ztschr. physiol. Chem.* **223**, 21 [1934].

⁹⁾ O. Warburg u. W. Christian, *Biochem. Ztschr.* **266**, 377 [1933]; van Veen u. Mertens, *Rec. Trav. chim. Pays-Bas* **53**, 257, 398 [1934].

^{9a)} Der Nahrungs-Bedarf der Kuh ist nach O. Kestner u. R. Plaut im *Handb. vergl. Physiol.* [H. Winterstein] 2. Bd., 2. Hälfte, S. 1098, Jena 1924, angegeben.

¹⁰⁾ *Klin. Wchschr.* **12**, 1241 [1933].

Verarbeitung keine allzugroßen Verluste eingetreten seien¹¹⁾). Aus unseren Analysen (Tab. 2) geht hervor, daß die aus 300 kg Leber isolierte Flavin-Menge bereits in 2 kg Leber enthalten ist. In Form des Lumi-flavins sind diese Farbstoff-Mengen nicht nur colorimetrisch bestimmt, sondern auch kristallinisch erhalten worden.

Tabelle 1: Flavin-Gehalt pflanzlicher Nahrungsmittel.

	Ads.	mg Lumi-flavin	mg Lacto- flavin
1 l Apfelsinensaft (sterilisiert)	+	0.059	0.089
1 l Apfelsinensaft (sterilisiert)	—	0.046	0.069
1 kg Bananen (geschält)	—	0.050	0.075
1 kg Aprikosen (getrocknet)	+	0.38	0.57
1 kg Hagebutten (frisch)	+	0.046	0.069
1 kg Tomatenmark (Boschi u. Figli)	+	0.47	0.71
1 kg Karotten (frisch)	+	0.13	0.20
1 kg Spinat (getrocknet; ber.)	+	3.80	5.70
1 kg Spinat (frisch; gef.)	+	0.38	0.57
1 kg Heumehl (getrocknete Luzerne)	+	4.78	7.17
1 kg Gras (frisch)	+	0.95	1.42
1 kg Kartoffeln (Pfälzer „Industrie“)	—	0.050	0.075
1 kg Weizenkleie	—	0.22	0.33
1 kg Malzextrakt (E. Löflund)	+	1.35	2.10
1 kg Malzextrakt (E. Löflund)	—	1.07	1.60
1 l helles Bier (Spaten, München)	—	0.19	0.29
1 l Traubensaft (sterilisiert, Wachenheimer Letten, 1932)	+	0.040	0.060
1 l Weißwein (Pfalz, Deidesheimer Forsterstraße 1932, Johannitergut)	+	0.054	0.081
1 l Weißwein (Pfalz 1933, Oberhaardt)	+	0.083	0.125
1 kg Tannen-Honig (1933, Deutscher Imkerbund) .	—	0.706	1.060

Die Bananen wurden durch den Fleisch-Wolf getrieben, mit Methanol versetzt (Endkonzentration 40 %) und 48 Stdn. bei 35° geschüttelt. Der abzentrifugierte Rückstand wurde mit 600 ccm 40-proz. Methanol nachbehandelt. Die vereinigten Auszüge wurden auf 400 ccm im Vakuum eingeengt, schwach essigsauer gemacht und scharf zentrifugiert. Die Aprikosen wurden wiederholt mit insgesamt 12 Tln. Wasser je 1/2 Stde. gekocht und die vereinigten wäßrigen Auszüge mit Benzin ausgeschüttelt. Bei den Hagebutten wurde der methylalkohol. Auszug von der Darstellung des Rubixanthins¹²⁾ verwendet. Das Tomaten-Mark haben wir mit 3 Tln. Wasser verdünnt und nach Zusatz von etwas Salzsäure 2 Stdn. zum Kochen erhitzt. Nach dem Zentrifugieren wurde die Extraktion in der angegebenen Weise wiederholt. Karotten, Spinat und Kartoffeln wurden nach Küchen-Vorschrift gekocht, der Sud abgetrennt und das Gekochte 2-mal mit 40-proz. Methanol (Endkonzentration) bei 35° 12 Stdn. geschüttelt. Die im Vakuum eingeengten Methanol-Auszüge wurden mit dem Sud vereinigt, sodann mit Äther und Chloroform ausgeschüttelt. Die Weizenkleie wurde mit 4 Tln. 80-proz. Methanol 12 Stdn. bei 25—30° ausgezogen. Den Malzextrakt und Tannen-Honig

¹¹⁾ Helv. chim. Acta **17**, 419 [1934]. „Wir glauben nicht, daß dies (die geringe Ausbeute) auf besonders große Verluste an Farbstoff während des Aufarbeitungs-Prozesses zurückzuführen ist, sondern auf den relativ geringen Gehalt der Leber an diesem Pigment.“

¹²⁾ R. Kuhn u. Ch. Grundmann, B. **67**, 339 [1934].

haben wir mit 3—4 Tln. Wasser 4—5 Stdn. auf dem Dampf-bade erhitzt. Unter Ads. ist durch + oder — angegeben, ob an Fuller-Erde adsorbiert wurde oder nicht.

Tabelle 2.: Vergleichende Flavin-Bestimmungen.

	Ads.	mg	
		Lumi-flavin	Lacto-flavin
1 l Vollmilch (Kuh)	—	0.67	1.00
1 l Molke (Kuhmilch, sauer)	+	0.30	0.45
1 kg Hefe (Löwenbräu, trocken)	—	12.0	18.0
1 kg Vitox (Marmite)	—	22.0	33.0
1 kg Hefe-Extrakt (Cenovis)	—	28.8	43.2
1 kg Eier-Albumin (trocken)	—	9.4	14.1
1 kg Rinds-Leber ¹³⁾ (frisch)	+	10.6	15.9
1 kg Ratten-Leber (frisch)	—	10.4	15.6
1 kg Dorsch-Leber (frisch)	+	0.35	0.53
1 l Menschen-Harn ¹⁴⁾	+	0.050	0.075

Methodik.

Zur quantitativen Ermittlung der Flavine ist die direkte colorimetrische Bestimmung von Pflanzen-Auszügen, aus denen man mit Äther, Chloroform usw. andere Farbstoffe ausgeschüttelt hat, nicht allgemein anwendbar, da vielfach noch andere gelbe und braune Farbstoffe vorliegen. Zur Reinigung ist Adsorption an Fuller-Erde und anschließende Elution mit pyridin-haltigen Flüssigkeiten in vielen Fällen vorteilhaft, aber nicht immer ausreichend. Wir haben daher das Verfahren von O. Warburg und W. Christian¹⁵⁾ herangezogen, welches darauf beruht, daß die Flavine durch Belichten der alkalischen Lösung chloroform-lösliche Derivate (Lumi-flavine) bilden, die in der gelben Farbe und grünen Fluorescenz mit den Flavinen übereinstimmen.

Die mit Chloroform gründlich vorgereinigten Lösungen, die $n/2$ an Natron-lauge waren, wurden in Photographier-Schalen mit einer 600-Watt-Lampe aus 20—30 cm Abstand belichtet. Durch Wasser-Kühlung (Glas-Schlangen) und Luft-Kühlung (Ventilator) wurde dafür gesorgt, daß die Temperatur nicht über 20° stieg. Nach 2 Stdn.¹⁶⁾ wurde mit Essigsäure angesäuert, mindestens 3-mal mit Chloroform ausgeschüttelt, das Chloroform über Natrium-sulfat getrocknet, auf ein bestimmtes Volumen eingengt und die Farbstoff-Konzentration mit dem Pulfrichschen Stufen-Photometer (C. Zeiß) bestimmt (Farbfilter S 47). Der Berechnung liegt der für reines Lumi-lacto-flavin ermittelte Wert von $\epsilon = 4.30$ (0.100 mg Lumi-lactoflavin in 1 ccm Chloroform)¹⁷⁾ zugrunde. Will man von Lumi-flavin (Mol.-Gew. 256) auf Lacto-flavin (Mol.-Gew. 376) umrechnen, so hat man die erhaltenen Werte mit 1.5 zu multiplizieren.

¹³⁾ Diese Bestimmung, bei der das Lumi-flavin in krystallisiertem Zustand isoliert wurde, verdanken wir Hrn. Dr. H. Rudy.

¹⁴⁾ vergl. Th. Wagner-Jauregg u. H. Wollschitt, Naturwiss. **22**, 107 [1934]; W. Koschura, B. **67**, 761 [1934].

¹⁵⁾ Biochem. Ztschr. **266**, 377 [1933].

¹⁶⁾ Bei längerer Belichtung nahm die Menge an chloroform-löslichem Farbstoff nicht mehr zu. Auch konnte durch Nachbestrahlung der nach 2 Stdn. ausgeschüttelten Lösungen kein Lumi-flavin mehr erhalten werden.

¹⁷⁾ R. Kuhn, H. Rudy u. Th. Wagner-Jauregg, B. **66**, 1950 [1933].

Der Nachteil des angewandten Verfahrens besteht darin, daß unter den eingehaltenen Bedingungen ein Teil des Flavins zerstört wird. Der prozentische Verlust nimmt mit fallenden Farbstoff-Mengen zu.

Von reinem Lacto-flavin (Schmp. 278°) ausgehend, wurden unter den angegebenen Bedingungen folgende Ausbeuten an Lumi-lactoflavin erhalten:

Nr.	Lacto-flavin (angew.)	Lumi-lactoflavin (gef.)	Ausbeute (% d. Th.)
1	3.718 mg	2.192 mg	87%
2	0.582 mg	0.300 mg	76%
3	0.154 mg	0.089 mg	58%
4	0.116 mg	0.038 mg	42%

Durch Verbesserung der photochemischen Bedingungen werden sich die Ausbeuten wohl noch steigern lassen. Die Zahlen der mitgeteilten Tabellen stellen jedenfalls sehr zuverlässige Mindestwerte dar. Die wahren Werte dürften, wenn weniger als 0.10 mg Lumi-flavin zur colorimetrischen Bestimmung gelangten, um 200—300 %, bei den höchsten Farbstoff-Gehalten nur um etwa 20 % höher liegen. Neuerdings haben H. v. Euler und E. Adler¹⁸⁾ versucht, den Flavin-Gehalt tierischer Organe nach der Fluorescenz-Intensität von Extrakten, die mit organischen Lösungsmitteln gereinigt waren, zu schätzen. Obwohl die Fluorescenz der Flavine vom Neutralsalz-Gehalt der Lösungen und anderen Einflüssen recht abhängt, stehen die von H. v. Euler und E. Adler für Leber ermittelten Zahlen nicht nur mit dem in Tier-Ver suchen bestimmten Gehalt an Vitamin B₂, sondern auch mit der photo-metrischen Lumi-flavin-Bestimmung (Tabelle 2) befriedigend in Einklang.

Für die Analyse von Nahrungsmitteln, die wie Malz-Extrakte, Hefe-Extrakte u. a., große Mengen brauner Farbstoffe enthalten, ist das Fuller-erde-Verfahren mit gewissen Schwierigkeiten behaftet, weil die Hauptmenge der braunen Farbstoffe mit in die Elutionen geht. In solchen Fällen haben wir¹⁹⁾ die mit Schwefelsäure angesäuerten Kochsäfte mit $n_{1/1}$ -Kaliumper-manganat-Lösung bei 15—20° behandelt, bis keine wesentliche Aufhellung mehr eintrat. Nach dem Neutralisieren (2-n. NaOH) wurde durch Zentri-fugieren geklärt und direkt in alkalischer Lösung belichtet²⁰⁾.

Freies und gebundenes Flavin in grünen Blättern.

300 g frischer Spinat wurden in kleinen Anteilen in flüssige Luft ge-taucht und sofort in der Reibschale fein zerstoßen. Zur Extraktion wurde mit dem 3-fachen Volumen Eiswasser übergossen und über Nacht im Eisschrank stehen gelassen, zuletzt noch kurze Zeit auf 35° erwärmt. Die mög-lichst klar zentrifugierte, hellgrüne Lösung teilten wir in 2 Teile (je 600 ccm), von denen der eine (a) direkt, der andere (b) nach kurzem Aufkochen in Cellophan-Schläuchen je 17 Stdn. gegen dest. Wasser dialysiert wurde. a) Der nicht dialysierte Anteil des frischen Auszugs wurde aufgeköcht, mit

¹⁸⁾ Ztschr. physiol. Chem. **223**, 105 [1934].

¹⁹⁾ vergl. dazu W. Koschara, B. **67**, 761 [1934].

²⁰⁾ Nach Kontroll-Versuchen sind die Farbstoff-Verluste bei diesem Verfahren erheblich.

Salzsäure versetzt und an Fuller-Erde adsorbiert. Die eingeeengte Elution lieferte beim Belichten in alkalischer Lösung 30 γ Lumi-flavin, was 45 γ gebundenem Flavin entspricht. b) Die dialysierten Anteile des aufgekochten Auszugs wurden in salzsaurer Lösung an Fuller-Erde adsorbiert und die Elution wie oben belichtet. Wir fanden colorimetrisch 39.5 γ Lumi-flavin, was 59 γ insgesamt vorhandenem Flavin entspricht. Im wäßrigen Spinat-Auszug waren somit $45/59 = 76\%$ des Flavins hochmolekular gebunden.

300 g frische Spinat-Blätter (von den Stielen befreit) wurden in der angegebenen Weise mit flüssiger Luft behandelt und mit kaltem Wasser extrahiert. Diesmal wurden der frische Auszug (A) und der aufgekochte Auszug (B) — es waren je 525 ccm — 24 Stdn. bei 0° gegen dest. Wasser in Cellophan-Schläuchen der Dialyse unterworfen. Bei A und B wurde sowohl die Innen-Flüssigkeit als auch die Außen-Flüssigkeit analysiert (Adsorption an Fuller-Erde, Elution, Bestrahlung, Ausschütteln mit Chloroform). Aus dem colorimetrisch ermittelten Gehalt an Lumi-flavin ergaben sich durch Multiplizieren mit 1.5 folgende Flavin-Mengen:

A (frischer Auszug)		B (aufgekocht)	
nicht dialysiert	46.5 γ	nicht dialysiert	4.5 γ
dialysiert	40.5 γ	dialysiert	81.5 γ
insgesamt	87.0 γ	insgesamt	86.0 γ

Der frische Auszug enthielt somit $46.5/87 = 53.5\%$ des Farbstoffs in hochmolekular gebundener Form. Zur weiteren Kontrolle wurden 300 g desselben Spinats mit Wasser in der Hitze extrahiert. Nach Adsorption an Fuller-Erde usw. fanden wir colorimetrisch 59 γ Lumi-flavin = 89 γ Flavin, was mit dem Gesamtgehalt nach obigen Analysen sehr gut übereinstimmt.

In frischer, entrahmter Kuhmilch sind etwa 90% des Lacto-flavins glatt dialysierbar. Wir fanden z. B. bei Dialyse von 400 ccm Magermilch (0°) in der Außenlösung 0.353 mg Lacto-flavin. Wurde die Magermilch zunächst aufgekocht, so stieg die bei 0° dialysierende Lacto-flavin-Menge auf 0.390 mg. Diese Zahlen stehen mit den auf anderem Wege (Schätzung der Fluoreszenz) von H. v. Euler und E. Adler¹⁸⁾ gewonnenen in guter Übereinstimmung.

Der Justus-Liebig-Gesellschaft sind wir für die Gewährung eines Stipendiums zu aufrichtigem Dank verpflichtet.