

## 25. Richard Kuhn und Hans Kaltschmitt: Isolierung von Lacto-flavin (Vitamin B<sub>2</sub>) aus Heu.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für medizin. Forschung, Heidelberg, Institut für Chemie.]

(Eingegangen am 30. November 1934.)

Der Nachweis von Flavin in grünen Blättern<sup>1)</sup> hat die Reihe der von R. Willstätter und A. Stoll<sup>2)</sup> genauer gekennzeichneten Blattfarbstoffe (Chlorophyll a, Chlorophyll b, Carotin ( $\beta$ ), Xanthophylle) um einen bemerkenswerten Vertreter bereichert, der dem Pflanzen-Physiologen die Bearbeitung neuer Fragen erschließt. Unsere bisherigen Beobachtungen zeigen, daß das Flavin einen regelmäßig anzutreffenden Farbstoff aller grünen Blätter darstellt, und daß das Flavin im grünen Blatt zum größten Teil an einen hochmolekularen Träger gebunden ist<sup>1)</sup>, der ihm vermutlich Ferment-Eigenschaften<sup>3)</sup> verleiht. Unbekannt ist noch, ob das Flavoprotein einen Bestandteil der Chloroplasten bildet, wie die Chlorophylle, oder ob es etwa im Zellsaft gelöst ist; ob es an der Assimilation der Kohlensäure oder an der Atmung der Blätter beteiligt ist; ob das Mengen-Verhältnis zu den assimilatorischen Farbstoffen so konstant ist, wie es R. Willstätter und A. Stoll<sup>2)</sup> für die anderen Pigmente untereinander festgestellt haben; ob und unter welchen Bedingungen sich dieses Verhältnis verschiebt, und welche Bedeutung diesem Quotienten für die grünen Blätter zukommt.

Um die Bearbeitung dieser und anderer Fragen auf einen sicheren Boden zu stellen, hielten wir es vor allem für erforderlich, die Reindarstellung von Flavin aus grünen Blättern durchzuführen. Die Isolierung war noch aus einem anderen Grunde von Wichtigkeit. Das zunächst aus Milch<sup>4)</sup>, später aus Leber<sup>5)</sup> rein dargestellte Lacto-flavin, C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>, ist ein Vitamin (B<sub>2</sub>)<sup>6)</sup>, das vom Säugetier (Ratte) nicht synthetisiert werden kann, sondern mit der Nahrung aufgenommen werden muß. Es ergab sich somit die Aufgabe festzustellen, ob das von den grünen Pflanzen synthetisierte Vitamin B<sub>2</sub> unverändert in die Leber und Milch der Säugetiere gelangt<sup>7)</sup>, oder ob es etwa im Tierkörper zunächst noch eine Umwandlung erleidet, wie die pflanzlichen Carotine bei ihrem Übergang in das Vitamin A.

Als Ausgangs-Material wählten wir Heumehl (getrocknete Luzerne), weil dieses Futter der Kühe unmittelbar als Quelle für das aus Kuh-Milch isolierte Lacto-flavin in Betracht kam. Aus 103 kg Heumehl, die mit 1480 l Wasser ausgekocht wurden, konnten wir 10—15% der colorimetrisch erfaßbaren Flavin-Menge, nämlich 50—70 mg, als Tetraacetylverbindung isolieren.

1) R. Kuhn, Th. Wagner-Jauregg u. H. Kaltschmitt, B. **67**, 1452c [1934]; vorgetragen von R. Kuhn auf dem IX. Congreso internacional de química pura y aplicada, Madrid, 7. April 1934; Th. Wagner-Jauregg, Ztschr. angew. Chem. **47**, 318 [1934]; H. v. Euler u. E. Adler, Ztschr. physiol. Chem. **226**, 87 [1934].

2) Untersuchungen über Chlorophyll, Berlin 1913; R. Willstätter u. A. Stoll, Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure, Berlin 1918.

3) O. Warburg u. W. Christian, Biochem. Ztschr. **254**, 438 [1932].

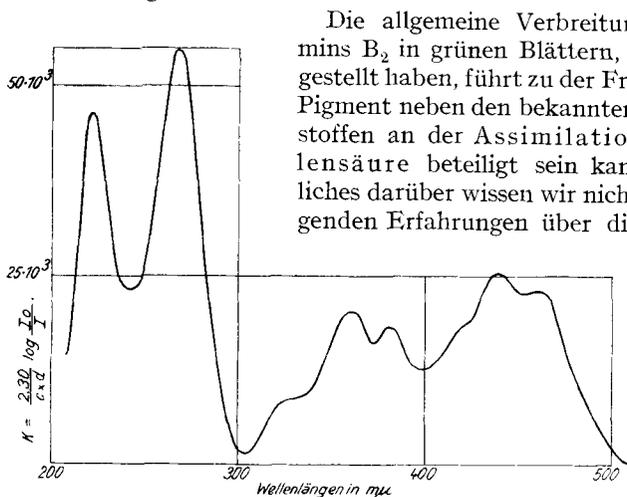
4) R. Kuhn, P. György u. Th. Wagner-Jauregg, B. **66**, 1034 [1933].

5) R. Kuhn u. Th. Wagner-Jauregg, B. **67**, 1770 [1934].

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

7) Es besteht die Möglichkeit, daß gewisse Säugetiere nicht auf Vitamin B<sub>2</sub> in der Nahrung angewiesen sind; denn die Milch mancher Tiere (Beispiel: Löwin) zeigt keine grüne Fluorescenz. O. Gerngroß u. M. Schulz, Milchwirtsch. Forsch. **6**, 567 [1928].

Die schön krystallisierende Verbindung zeigte in der elementaren Zusammensetzung, im optischen Drehungsvermögen, im Absorptionsspektrum und in der Wachstums-Wirkung Übereinstimmung mit Tetraacetyl-lactoflavin aus Milch. Damit ist bewiesen, daß das Lacto-flavin (Vitamin B<sub>2</sub>) — von seinem farblosen kolloiden Träger abgesehen — ein pflanzlicher Farbstoff ist, der ohne chemische Veränderung vom Säugetier in der Leber gespeichert und in der Milch ausgeschieden wird.



Die allgemeine Verbreitung des Vitamins B<sub>2</sub> in grünen Blättern, die wir festgestellt haben, führt zu der Frage, ob dieses Pigment neben den bekannten Blatt-Farbstoffen an der Assimilation der Kohlensäure beteiligt sein kann. Tatsächliches darüber wissen wir nicht. Die vorliegenden Erfahrungen über die Bedeutung

Abbild. 1: Absorptionsspektrum des Tetraacetyl-lactoflavins aus Heu in wässriger Lösung.

Abzissen: Wellenlängen in  $m\mu$ . Ordinaten:  $x = \frac{2.30}{c \times d} \log \frac{I_0}{I}$ .

des Vitamins B<sub>2</sub> für chlorophyll-freie Bakterien und für Säugetiere scheinen die angeführte Möglichkeit nicht zu stützen und eher auf eine Beteiligung an der Pflanzen-Atmung hinzuweisen. Man kann aber rein rechnerisch prüfen, ob die gewaltigen assimilatorischen Leistungen grüner Blätter über eine Zwischenstufe zustandekommen könnten, die, wie das Vitamin B<sub>2</sub>, nur in ganz außerordentlich geringer Konzentration zur Verfügung steht.

1 kg frischer, grüner Blätter enthält etwa 0.0005 g Vitamin B<sub>2</sub> und etwa 2.0 g Chlorophyll (a + b). Das molekulare Verhältnis der Farbstoffe ist annähernd Flavin: Chlorophyll = 1:2000<sup>8)</sup>. Da 1 Mol. Chlorophyll nach R. Willstätter und A. Stoll<sup>9)</sup> unter günstigsten Bedingungen bis zu 3000 Mol. Kohlendioxyd je Stunde umzusetzen vermag, müßten über 1 Mol. Flavin 3000 × 2000 = 6000000 Mol. CO<sub>2</sub>/Stde. reagieren können oder 10<sup>3</sup> (bis 10<sup>4</sup>) Mol. CO<sub>2</sub> in 1 Sek. Diese große Zahl ist auch in Anbetracht eines komplizierten Mechanismus nicht unbegreiflich, wenn man bedenkt, daß hämin-artige Zellfermente, wie Katalase und Peroxydase, nach R. Kuhn, D. B. Hand und M. Florin<sup>10)</sup> 10<sup>5</sup> Mol. Substrat in 1 Sek. umzusetzen ver-

<sup>8)</sup> In etoilerten Blättern (Salat) fanden wir das Verhältnis Flavin: Chlorophyll zugunsten des Flavins verschoben.

<sup>9)</sup> Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure, Berlin 1918, II. Abhandl., S. 43.

<sup>10)</sup> Naturwiss. 19, 771 [1931].

mögen. Wir kommen somit zu dem Ergebnis, daß aus kinetischen Gründen eine Beteiligung des Vitamins B<sub>2</sub> an der Assimilation der Kohlensäure nicht abgelehnt werden kann.

### Beschreibung der Versuche.

103 kg Heumehl (kalifornische Luzerne; G. Moser, Mannheim) wurden in Anteilen von je 5 kg zunächst mit der 9-fachen, dann mit der 5-fachen Menge Wasser (insgesamt 1480 l)  $\frac{1}{4}$  Stde. zum Sieden erhitzt. Durch Absaugen auf einer Steinzeug-Nutsche erhielten wir 1270 l braunen Kochsaft; der Rückstand war grün gefärbt. Der Kochsaft wurde mit 104 l konz. Salzsäure angesäuert und unter Rühren mit 11,3 kg Fullererde versetzt. Das Adsorbat wurde mit Wasser bis zur neutralen Reaktion (Lackmus) gewaschen (Abdekantieren und Zentrifugieren) und zuerst mit der 3-fachen, dann mit der  $2\frac{1}{2}$ -fachen Menge Pyridin-Gemisch (1 Tl. Pyridin + 4 Tle. Methanol + 5 Tle. Wasser) eluiert; bei der zweiten Elution wurden noch 0,3 Tle. Aceton hinzugefügt. Wir erhielten 62 l Eluat, das wir zur Ausflockung von Fullererde u. a. mit 84 l Aceton verdünnten. Das pyridinhaltige Filtrat versetzten wir mit 7,3 l ( $\frac{1}{20}$  Vol.) 10-proz. Bleiacetat-Lösung, wobei eine dunkle Fällung schwerlöslicher Bleisalze (quercitrin-haltig) auftrat. Die überstehende Lösung, die den größten Teil des Flavins enthielt, war nur noch hellbraun gefärbt. Sie wurde, nach Abzentrifugieren der Fällung, im Vakuum auf 10 l ( $\frac{1}{15}$ ) eingengt. Die neuerdings klar zentrifugierte Lösung behandelten wir in Anteilen von je 1 l mit Schwefelwasserstoff. Ein gelber Farbstoff wurde vom Bleisulfid nicht niedergeschlagen. Die Zerlegung der mit kaltem Wasser gewaschenen, flavin-haltigen Bleisulfid-Niederschläge<sup>11)</sup> erfolgte durch 4—5-maliges Auskochen mit Wasser, zuletzt unter Zugabe von 1% Essigsäure. Die so erhaltene, gelbe, grün-fluoreszierende, wäßrige Lösung (21 l) enthält nach colorimetrischer Bestimmung 170 mg Farbstoff (als Lacto-flavin ber.). Zur weiteren Reinigung wurde nun an 400 g Frankonit KL adsorbiert, das Adsorbat mit Wasser gewaschen und 2-mal mit Pyridin-Gemisch eluiert (zuerst 5 Vol. Pyridin + 4,5 Vol. Wasser + 2,5 Vol. Aceton + 8 Vol. Methanol; dann: 3 Vol. Pyridin + 5,5 Vol. Wasser + 2 Vol. Aceton + 5 Vol. Methanol). Die vereinigten Eluate engten wir im Vakuum bis zur beginnenden Trübung (Frankonit) ein und fällten mit dem doppelten Volumen Aceton. Der gelbe, flavin-haltige Niederschlag wurde abgetrennt und im Vakuum getrocknet, die Aceton-Lösung im Vakuum zur Trockne verdampft. Wir vereinigten den wasser-freien Rückstand mit dem getrockneten (frankonit-haltigen) Niederschlag und erhitzen kurze Zeit mit 300 ccm trockenem Pyridin. Nach dem Erkalten setzten wir 30 ccm ( $\frac{1}{10}$ ) Essigsäure-anhydrid zu, ließen 2—3 Stdn. stehen und erhitzen noch 1 Min. zum Sieden. Das erkaltete Acetylierungs-Gemisch ließen wir in eisgekühlte 2-n. Salzsäure eintropfen und gaben noch soviel Salzsäure nach, daß die Lösung eben kongo-sauer blieb. Ausgeschiedener Frankonit wurde abzentrifugiert und das entstandene Acetyl-flavin mehrmals mit Chloroform ausgeschüttelt<sup>12)</sup>. Die vereinigten Chloroform-Auszüge (2,5 l) wurden gründlich mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Sie enthielten nach colorimetrischer Bestimmung 100 mg Farbstoff.

<sup>11)</sup> Ph. Ellinger u. W. Koschara, B. 66, 1411 [1933].

<sup>12)</sup> In der wäßrigen Phase blieb ein brauner Farbstoff zurück.

Der braune Rückstand der Chloroform-Auszüge wurde zur chromatographischen Reinigung in alkohol-freiem Essigester gelöst und durch eine Säule von aktiviertem Aluminiumoxyd (nach H. Brockmann) filtriert. Entwickelt wurde mit Essigester. Zur Elution der intensiv gelben Hauptzone, die das Flavin-acetat enthielt, diente ein Gemisch von 80 Vol. Essigester + 20 Vol. Methanol. Das Eluat wurde zur Trockne gebracht, in Essigester aufgenommen und einer neuerlichen Adsorption an aktiviertem Aluminiumoxyd im Rohr unterworfen. Zur Entwicklung des zweiten Chromatogramms diente wieder Essigester, der nunmehr eine Aufteilung des Farbstoffes in 2 Zonen ermöglichte. Die obere, fester haftende Zone wurde mit Wasser eluiert und das Eluat mehrmals mit Essigester durchgeschüttelt. Dabei blieb in der wäßrigen Phase viel Farbstoff (verseiftes Flavin-acetat) zurück. Die Essigester-Auszüge vereinigten wir mit dem aus der unteren Zone erhaltenen Acetyl-flavin. Die untere, leichter entwickelbare Zone des Chromatogramms wurde mit Essigester + Methanol 4 : 1 eluiert, das Eluat im Vakuum zur Trockne gebracht und der hellgelbe Rückstand (30 mg) 2-mal aus absol. Alkohol, dann 2-mal aus siedendem Wasser umkrystallisiert. Wir erhielten lange, gelbe Prismen, die zwischen gekreuzten Nicols gerade Auslöschung zeigten und bei 235<sup>0</sup> unt. Zers. schmolzen. Der Misch-Schmp. mit Tetraacetyl-lactoflavin aus Milch zeigte keine Depression. Beide Präparate stimmten auch in der elementaren Zusammensetzung und im optischen Drehungsvermögen überein.

2.552 mg Sbst.: 5.18 mg CO<sub>2</sub>, 1.24 mg H<sub>2</sub>O. — 3.638 mg Sbst.: 0.328 ccm N (21<sup>0</sup>, 757 mm).

C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>. Ber. C 55.15, H 5.20, N 10.30.

Gef. „ 55.36, „ 5.44, „ 10.43.

$$[\alpha]_D^{20} = (-0.21^0 \times 100) : (0.25 \times 1) = -84^0 \text{ (} n_{10}\text{-Natronlauge),}$$

$$[\alpha]_D^{20} = (-0.21^0 \times 100) : (0.172 \times 1) = -122^0 \text{ (auf freies Flavin ber.).}$$

Für Tetraacetyl-lactoflavin aus Milch fanden wir unter denselben Bedingungen:

$$[\alpha]_D^{20} = (-0.20^0 \times 100) : (0.25 \times 1) = -80^0 \text{ (} n_{10}\text{-Natronlauge),}$$

$$[\alpha]_D^{20} = (-0.20^0 \times 100) : (0.172 \times 1) = -116^0 \text{ (auf freies Flavin ber.).}$$

Im Stufen-Photometer zeigte das Flavin-acetat aus Heu (0.573 mg in 10 ccm Wasser) in einer Schichtdicke  $d = 0.25$  cm bei 470 m $\mu$  (Farbfilter S 47) eine Durchlässigkeit von 49.4%. Daraus folgt  $\epsilon = 1.224$ . Für eine 0.005-proz. Lösung würde  $\epsilon = 1.07$  betragen.

Die mit Essigester-Methanol eluierte untere Zone des zweiten Chromatogramms enthielt noch viel Farbstoff. Dieser ließ sich mit Wasser eluieren. Durch Ausschütteln mit Essigester, wobei wieder freies Flavin in der wäßrigen Phase zurückblieb, konnten noch 17 mg Acetyl-lactoflavin gewonnen werden.

Das aus Heu isolierte Lacto-flavin zeigt, wie das aus Milch dargestellte, an B<sub>2</sub>-arm ernährten Ratten starke Wachstums-Wirkung. Über den quantitativen biologischen Vergleich soll an anderer Stelle näher berichtet werden.

Hrn. H. Stocker danken wir für seine eifrige und geschickte Mitarbeit. Der Justus-Liebig-Gesellschaft sprechen wir für die Gewährung eines Stipendiums unseren besten Dank aus.