

Zusammensetzung von Lignin I:

C 60.0, H 6.2, OCH₃ 16.7.

Das schwach gelblich gefärbte Filtrat vom Rückstand I wurde unter Kühlung mit Wasser verdünnt, wobei sich weißliche Flocken abschieden, die abzentrifugiert und ausgewaschen wurden. Nach dem Trocknen wurde ein rötliches Pulver erhalten, das dem Lignin äußerlich sehr ähnlich ist. Ausbeuten 49—50%.

Elementar-zusammensetzung aus 2 Versuchs-Reihen:

C 47.23, 47.72, H 5.93, 6.25, OCH₃ 5.12, 5.19.

ber. für: C₁₂H₁₈O₉ C 47.06, H 5.88.

C₂₅H₃₈O₁₈ „ 47.90, „ 6.12, OCH₃ 4.95.

= 2[C₆H₁₀O₅ - H₂O] + CH₃.

Die Verbindung wurde in konz. Salzsäure gelöst und bei gewöhnlicher Temperatur entsprechend den Vorschriften der Lignin-Bestimmung behandelt. Nach kurzer Zeit schied sich ein dunkler, flockiger Niederschlag ab: 7.2%, bezogen auf das Ausgangsmaterial. Es lag auch hier nach der Zusammensetzung ein normales Lignin vor (Zahlen aus 2 Versuchs-Reihen):

C 61.14, 60.26, H 6.3, 5.93, OCH₃ 17.7, 20.9.

Das schwach gelbliche Filtrat von dem Cellulose-anhydrid wird noch näher untersucht. Es besteht zweifellos auch zum größten Teil aus Kohlehydraten, die den Rest des noch fehlenden Lignins liefern, der bei der Behandlung des Ausgangs-Holzes hinterbleibt.

Zur partiellen Hydrolyse ohne Lignin-Bildung wurden 0.93 g Buchenspäne mit Salzsäure von $d = 1.19$ 1¹/₂ Stdn. in der Kältemischung behandelt. Rückstand 0.5665 g = 60.9% des Ausgangs-Holzes. 2. Versuch 70% Rückstand. Zusammensetzung (2 Versuchs-Reihen):

C 49.44, 49.50, H 6.05, 6.03, OCH₃ 6.7, 6.87.

Die gleiche Zusammensetzung besitzt das Rotbuchen-Holz.

C 49.05, 49.3, H 6.11, 5.8, OCH₃ 6.2, 6.4.

78. Richard Kuhn und Hermann Rudy: Synthetische Vitamin-B₂-Phosphorsäure.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizin. Forschung, Heidelberg, Institut für Chemie.]
(Eingegangen am 22. Januar 1935.)

Der Feststellung von H. Theorell¹⁾, daß im „gelben Ferment“ von O. Warburg und W. Christian die Farbstoff-Komponente (Flavin) an Phosphorsäure gebunden ist, kommt nicht nur für die Enzym-Forschung größte Bedeutung zu. Sie ist mit Rücksicht auf die Vorstellung von R. Kuhn, P. György und Th. Wagner-Jauregg²⁾, wonach die Farbstoff-Komponente des Ferments ein Vitamin (B₂) ist, auch für die Lehre von der Ernährung bedeutungsvoll. Es bedarf jetzt der Überprüfung, ob das Vitamin B₂, dort wo es in frei dialysierbarer Form angetroffen wird, als Phosphorsäure-ester vorliegt oder nicht, und ob quantitative Unterschiede in der Wachstums-Wirkung zwischen Flavin und Flavin-phosphorsäure bestehen. Die Unter-

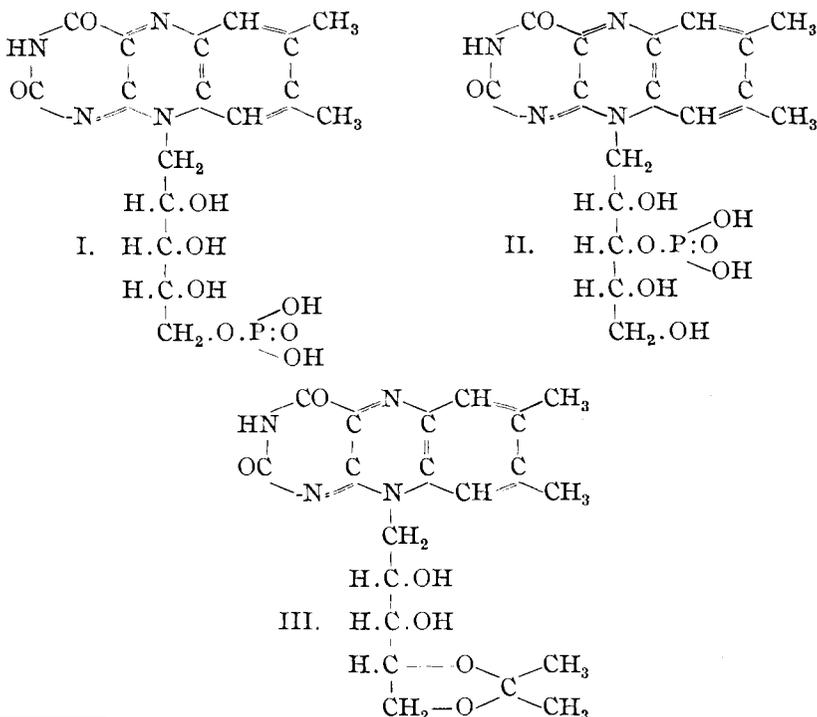
1) Biochem. Ztschr. **275**, 37, 466 [1934].

2) B. **66**, 1034 [1933].

schiede in der Wachstums-Wirkung synthetischer Flavine³⁾ könnten unter anderem auch damit zusammenhängen, daß sie im Organismus verschieden leicht mit Phosphorsäure verestert werden, ehe die Bindung an Eiweiß erfolgt.

Zur Prüfung dieser und ähnlicher Fragen, soweit sie für die Theorie der Vitamin-B₂-Wirkung wichtig erscheinen, haben wir die Darstellung von Lactoflavin-phosphorsäuren in Angriff genommen. Von Estern des Lacto-flavins ist bisher nur eine schön krystallisierende Tetraacetyl-Verbindung⁴⁾ bekannt. Die Gewinnung eines Phosphorsäure-esters gelang mit Hilfe von Phosphoroxychlorid in Pyridin. Nach Reinigung über das Silbersalz konnte als Natriumsalz eine Lactoflavin-phosphorsäure, C₁₇H₂₁N₄PO₉, in orangefarbenen, kugelförmigen Aggregaten radiär angeordneter Nadelchen erhalten werden. Die Stellung und die Einheitlichkeit der Stellung der Phosphorsäure ist nicht bewiesen. Nimmt man an, daß die durch Bleitetraacetat nachgewiesene primäre Hydroxylgruppe⁴⁾ bevorzugt reagiert, so ist das Formelbild I wahrscheinlich, das an die Konstitution der Muskel-Adenylsäure erinnert.

Die Möglichkeit zu einer der Hefe-Adenylsäure vergleichbaren Lactoflavin-phosphorsäure (etwa II) zu gelangen, bietet vielleicht eine Monoaceton-Verbindung des Lacto-flavins⁵⁾, für die vor allem die Konstitution III in Betracht kommt.



³⁾ Nach dem derzeitigen Stande der Tier-Versuche hat das von R. Kuhn u. F. Weygand, B. **67**, 1939, 2084 [1934], aus *l*-Arabinose synthetisierte Flavin etwa $\frac{1}{3}$ der Wachstums-Wirkung des natürlichen Lacto-flavins, während der entsprechende aus *d*-Xylose synthetisierte Farbstoff mit 20 γ je Tag wirkungslos ist.

⁴⁾ R. Kuhn, H. Rudy u. Th. Wagner-Jauregg, B. **66**, 1950 [1933].

⁵⁾ R. Kuhn, Angew. Chem. **48**, 29 [1935].

Der aus Lacto-flavin selbst erhaltene Phosphorsäure-ester (Na-Salz) ist in der Farbe des festen Präparates, in der Farbe, sowie Fluorescenz der Lösungen mit Lacto-flavin übereinstimmend. Im elektrischen Feld (10 Milliampere, 220 Volt, $p_H = 7.17$) wandert die synthetische Vitamin-B₂-Phosphorsäure rasch anodisch in Übereinstimmung mit der Wirkungs-Gruppe des gelben Ferments¹⁾ und im Gegensatz zu Lacto-flavin, dessen iso-elektrische Zone⁶⁾ sich von etwa $p_H = 3$ bis $p_H = 9$ erstreckt. Für die folgenden Fällungs-Reaktionen dienten je 0.036-proz. Lösungen (auf C₁₇H₂₀N₄O₆ ber.), die mit dem gleichen Volumen der Metallsalz-Lösungen versetzt wurden.

Nach Stehen über Nacht bei 15—20°	AgNO ₃ (Alkohol)	Tl ₂ SO ₄ NH ₃	HgCl ₂ (ges.)	HgAc ₂ ges.	CaAc ₂ (40 % A)	bas. PbAc ₂ (ges.)
Lacto-flavin	+	+	—	+	—	—
Lactoflavin-phosphorsäure	+	—	—	+	—	+

Beschreibung der Versuche.

Vitamin-B₂-Phosphorsäure.

65 mg Lacto-flavin werden in 35 ccm Pyridin durch Erhitzen gelöst. In die eis-gekühlte Lösung werden 26.8 mg Phosphoroxychlorid (mit Pyridin verdünnt) zugefügt. Nach 1-stdg. Aufbewahren bei 0° läßt man weitere 8 Stdn. bei 15—20° im Dunkeln stehen, wirft einige Stückchen Eis hinein, fügt wenig Natriumacetat zu und verdampft das Pyridin im Vakuum, wobei die Temperatur nicht über 50° steigen soll. Das pyridin-freie Rohprodukt wird in 30 ccm Wasser mit wäßrigem Silbernitrat versetzt. Über Nacht (Eis-Schrank) scheidet sich ein rotes Silbersalz flockig ab. Es wird an der Zentrifuge mit wäßrig-alkoholischer Silbernitrat-Lösung gewaschen, in 20-proz. Essigsäure unter Zusatz von Natriumacetat warm gelöst und mit H₂S zerlegt. Das Filtrat des Silbersulfids wird im Vakuum vorsichtig zur Trockne verdampft, der Rückstand in 5 ccm warmem Wasser unter Zusatz eines Tropfens 2-n. Essigsäure aufgenommen, filtriert und mit dem 8—10-fachen Vol. Alkohol versetzt. Beim Stehen im Eis-Schrank kristallisiert in guter Ausbeute (50 mg) die Vitamin-B₂-Phosphorsäure als Natriumsalz aus.

Synthetische Flavine, die in 9-Stellung hydroxyl-haltige Seitenketten tragen, lassen sich in entsprechender Weise in Phosphorsäure-ester verwandeln.

4.899 mg Sbst.: 7.42 mg CO₂, 1.757 mg H₂O, 1.17 mg Asche. — 3.406 mg Sbst.: 0.326 ccm N (763 mm, 21°). — 1.583 mg Sbst.: 0.209 mg P₂O₅? (nach Veraschen). — 0.658 mg Sbst.: 0.101 mg P₂O₅ (nach Veraschen).

C₁₇H₂₀N₄PO₃Na. Ber. C 42.66, H 4.22, N 11.72, P 6.52.

C₁₇H₁₈N₄PO₃Na₂. Ber. C 40.78, H 3.84, N 11.20, P 6.34.

Gef. „ 41.31, „ 4.01, „ 11.14, „ 6.00, 6.72.

Die Farbstärke ($\alpha = 26.10^4$ für $\lambda = 445 \mu$) entspricht derjenigen des Lacto-flavins.

⁶⁾ R. Kuhn u. G. Moruzzi, B. **67**, 888 [1934].

⁷⁾ K. Lohmann u. L. Jendrassik, Biochem. Ztschr. **178**, 419 [1926].

Zusatz am 26. Januar 1935: Prüfung auf katalytische Wirkungen (Th. Wagner-Jauregg und E. F. Möller).

In dem von O. Warburg und W. Christian⁸⁾, sowie von H. Theorell⁹⁾ angewandten Ferment-System wurde die synthetische Vitamin-B₂-Phosphorsäure nach der Methylenblau-Methode geprüft.

0.5 ccm $m/_{10}$ -Neuberg-Ester (Kaliumsalz) + 0.5 ccm Zwischenferment in $m/_{100}$ -Natriumbicarbonat + 0.2 ccm Coferment I + 0.4 ccm Protein (aus gelbem Ferment durch Abspaltung der Wirkungs-Gruppe; 10-proz. Lösung eines mit Chloroform gereinigten Präparates). Dazu kam 0.1 ccm 0.036-proz. Lösung von Lacto-flavin bzw. Lactoflavin-phosphorsäure (Na-Salz) von gleichem Farbstoff-Gehalt. Die Entfärbungs-Zeiten (37°) des Methylenblaus (1:5000; 0.5 ccm) waren:

ohne Flavin-Zusatz.....	37 Min.	62 Min.
Lacto-flavin	37 Min.	60 Min.
Lactoflavin-phosphorsäure	20 Min.	32 Min.

Im Gegensatz zum Lacto-flavin bewirkte somit der synthetische Phosphorsäure-ester eine Verkürzung der Entfärbungs-Zeiten auf etwa die Hälfte. Der Effekt ist jedoch, verglichen mit demjenigen, den eine Lösung des „gelben Fermentes“ von etwa gleichem Farbstoff-Gehalt gab (Entfärbungs-Zeit 1 Min.), gering.

79. Richard Kuhn und Hans Kaltschmitt: Über den Zustand des Vitamins B₂ in der Kuhmilch.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizin. Forschung, Heidelberg, Institut für Chemie.]
(Eingegangen am 22. Januar 1935.)

Das in frischer Kuhmilch enthaltene Lacto-flavin (Vitamin B₂) ist zu etwa 90% leicht dialysierbar¹⁾. Der Dialyse-Versuch besagt nur, daß der Farbstoff nicht an Eiweiß gebunden ist. Er vermag nicht zu entscheiden, ob das Vitamin in freier Form vorliegt, oder ob es mit Phosphorsäure verestert ist, wie in der von H. Theorell²⁾ isolierten Wirkungs-Gruppe des gelben Fermentes von O. Warburg und W. Christian³⁾.

Das Verhalten im elektrischen Feld (H. Theorell) gestattet leicht, zwischen Lacto-flavin und Lactoflavin-phosphorsäure zu unterscheiden. Bei Anwendung von frisch entrahmter Kuhmilch beobachteten wir, daß im elektrischen Feld (220 Volt, 10 Milli-amp., $p_H = 7.2$, $m/_{15}$ -Phosphat) die milchigweiße Suspension anodisch wandert, der gelbgrün fluoreszierende Farbstoff aber keine Wanderung erkennen läßt. Zum Vergleich wurde auch frisch entrahmte Kuhmilch bei 0° der Dialyse unterworfen und das Dialysat im Vakuum sehr sorgfältig eingengt. Das schön gelbgrün fluoreszierende Konzentrat ließ unter den oben angegebenen Bedingungen im elektrischen Feld ebenfalls keine Wanderung des Farbstoffs erkennen.

⁸⁾ Biochem. Ztschr. **254**, 438 [1932], **266**, 377 [1933].

⁹⁾ Biochem. Ztschr. **272**, 155, **275**, 37 [1934].

¹⁾ P. György, R. Kuhn u. Th. Wagner-Jauregg, Ztschr. physiol. Chem. **223**, 21, u. zw. S. 26 [1934]; H. v. Euler u. E. Adler, Ztschr. physiol. Chem. **223**, 105 [1934]; R. Kuhn, Th. Wagner-Jauregg u. H. Kaltschmitt, B. **67**, 1452, u. zw. S. 1457 [1934].

²⁾ Biochem. Ztschr. **275**, 27, 466 [1934].

³⁾ Biochem. Ztschr. **254**, 438 [1932], **257**, 492 [1933], **258**, 496 [1933], **263**, 228 [1933].