

**280. Richard Kuhn, Hermann Rudy und Friedrich Weygand:
Synthese der Lactoflavin-5'-phosphorsäure.**

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

(Eingegangen am 22. Mai 1936.)

Für den aus Lactoflavin (Vitamin B₂) im Tierkörper entstehenden Lactoflavin-phosphorsäure-ester, der mit dem von J. Banga und A. von Szent-Györgyi¹⁾ entdeckten Cytoflav identisch ist, wurde die Konstitution einer 6.7-Dimethyl-9-*d*-ribo-flavin-5'-phosphorsäure (VI) erörtert²⁾. Durch Einwirkung von Phosphoroxychlorid in Pyridin auf natürliches Lactoflavin gelang es bereits, eine Lactoflavin-phosphorsäure synthetisch darzustellen²⁾, die in der Löslichkeit ihrer Salze, im Reduktions-Oxydations-Potential, in der Hydrolysegeschwindigkeit mit 15-proz. Salzsäure und in der Wachstumswirkung an B₂-frei ernährten Ratten mit Cytoflav aus Herzmuskel übereinstimmt³⁾. Die Stelle, an der die Veresterung mit Phosphorsäure eingetreten war, blieb aber unbekannt.

Ausgehend von synthetischem Lactoflavin⁴⁾ konnten wir nun über eine Reihe von schön krystallisierenden Zwischenprodukten die Lactoflavin-5'-phosphorsäure auf folgendem Wege gewinnen. Lactoflavin (I) reagiert mit Triphenyl-chlormethan in Pyridin unter Bildung der Trityl-Verbindung II, die mit Essigsäure-anhydrid in Pyridin zum 2'.3'.4'-Triacetyl-5'-trityl-lactoflavin vom Schmp. 223—224° (III) acetyliert werden kann. Aus dieser Verbindung läßt sich durch warme wäßrige Essigsäure die Trityl-Gruppe unter Schonung der Acetyle abspalten. In dem von F. Weygand so erhaltenen 2'.3'.4'-Triacetyl-lactoflavin vom Schmp. 202—203° (IV) ist nur noch die 5'-Stellung für die Veresterung mit Phosphorsäure frei. Die Phosphorylierung wurde von H. Rudy unter den am freien Lactoflavin bewährten Bedingungen^{2) 3)} ausgeführt und lieferte zunächst die 2'.3'.4'-Triacetyl-lactoflavin-5'-phosphorsäure (V), aus der sich durch verd. Natronlauge in der Kälte 3 Mol. Essigsäure abspalten ließen.

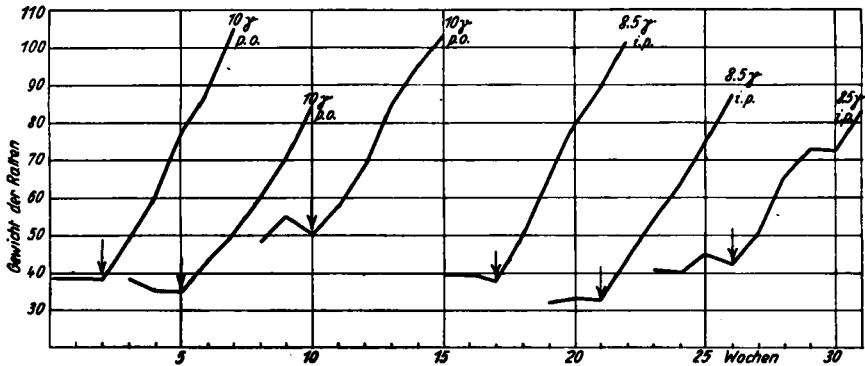
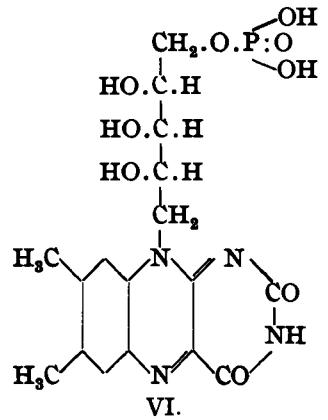
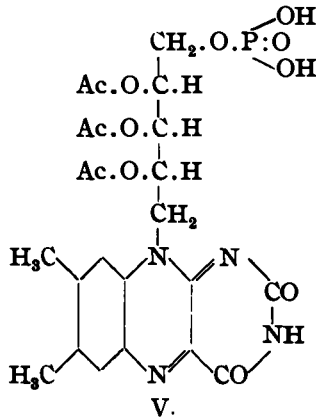
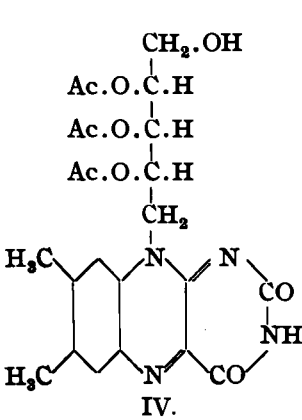
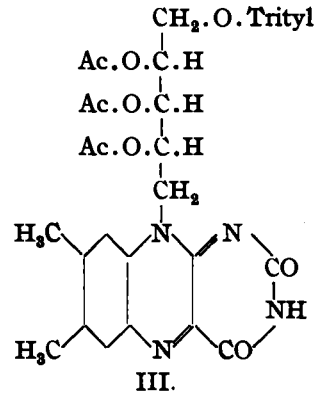
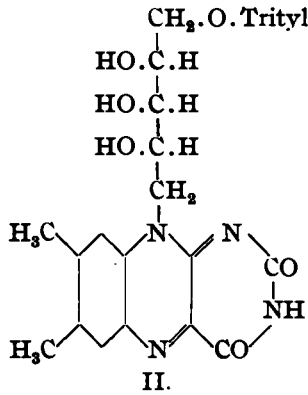
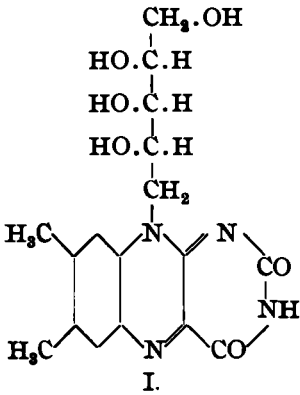
Die erhaltene Lactoflavin-5'-phosphorsäure (VI), die als Natrium- und Calciumsalz isoliert wurde, konnte vorläufig, ebenso wie Cytoflav, noch nicht in ein zur Identifizierung geeignetes Derivat von scharfem Schmelzpunkt verwandelt werden. In der Löslichkeit der Salze (Natrium-, Calcium-, Barium-, Silber-), im Adsorptionsverhalten (Frankonit u. a.), in der p_H-Abhängigkeit der Fluoreszenz, im Reduktions-Oxydations-Potential⁶⁾ und in der Wachstumswirkung an B₂-frei ernährten Ratten stimmt die synthetische Lactoflavin-5'-phosphorsäure mit dem Naturprodukt überein. Je Tag und Ratte sind bei der in unserem Institut angewandten Grundkost 7—8 γ Lactoflavin in Form von lactoflavin-5'-phosphorsäurem Natrium für eine Gewichtszunahme von 40 g in 30 Tagen erforderlich, also genau soviel wie an freiem

¹⁾ Biochem. Ztschr. **246**, 203 [1932].

²⁾ R. Kuhn u. H. Rudy, B. **68**, 383 [1935]; R. Kuhn, Bull. Soc. Chim. biol. **17**, 905 [1935]. ³⁾ R. Kuhn u. H. Rudy, Ztschr. physiol. Chem. **239**, 47 [1936].

⁴⁾ R. Kuhn, K. Reinemund, H. Kaltschmitt, R. Ströbele u. H. Trischmann, Naturwiss. **23**, 260 [1935]; R. Kuhn, K. Reinemund, F. Weygand u. R. Ströbele, B. **68**, 1765 [1935].

⁵⁾ R. Kuhn u. P. Boulanger, B. **69**, im Druck [1936].



Abbild. 1. Wachstumswirkung der Lactoflavin-5'-phosphorsäure.

Die Angaben in γ bedeuten Farbstoffmengen $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_8$, also die in Form von 5'-phosphorsaurem Natrium angewandten Mengen Lactoflavin.

p. o. = per os, i. p. = intraperitoneal.

Lactoflavin⁶⁾ oder an natürlicher Lactoflavin-phosphorsäure⁹⁾. Dies gilt nicht nur für die Verabreichung per os, bei der durch Phosphatasen des Magen-Darm-Kanals ein etwaiger Unterschied verwischt werden könnte, sondern auch für intraperitoneale Einspritzung (Natriumsalz in Ringer-Lösung). In Abb. 1 finden sich Beispiele für die Wachstumswirkung der synthetischen Lactoflavin-5'-phosphorsäure bei peroraler und intraperitonealer Verabreichung.

Daß durch Trityl-chlorid nach B. Helferich⁷⁾ bei Nucleosiden nur die primären Hydroxylgruppen veräthert werden, ist durch Untersuchungen von H. Bredereck⁸⁾ an zahlreichen Beispielen gezeigt worden.

Beschreibung der Versuche.

5'-Trityl-lactoflavin (II).

150 mg Lactoflavin (Schmp. 292⁰) wurden in 100 ccm trockenem Pyridin in der Hitze gelöst. Die Hälfte des Lösungsmittels wurde dann im Vakuum ohne Capillare wieder abgedampft. Nach Zugabe von 500 mg Tritylchlorid erhitzte man 2 Stdn. auf 70—80⁰ unter Chlorcalcium-Verschuß. Eine in Wasser gegossene Probe gab nach dieser Zeit allen Farbstoff beim Durchschütteln mit Essigester an diesen ab. Die Hauptmenge wurde nun im Scheidetrichter mit Wasser versetzt, gut durchgeschüttelt und der Farbstoff sowie das überschüssige Tritanol in mehreren Portionen mit Essigester der wäßrigen Phase entzogen. Eine geringe Menge Farbstoff blieb dabei in der wäßrigen Schicht. Nach dem Klären mit wenig Natriumsulfat wurde die Essigester-Lösung im Vakuum eingeeengt. Den krystallisierten Rückstand löste man in wenig heißem Alkohol und fällte durch Zusatz von Benzin (Sdp. 70—80⁰) den Farbstoff aus. Auf diese Weise konnte das überschüssige Tritanol bequem entfernt werden. Nach 5 Umfällungen aus Alkohol + Benzin wurde das Trityl-lactoflavin aus absol. Alkohol umkrystallisiert. Man erhielt es so in schönen, orangefarbigem Krystallen, die aber keinen definierten Schmelzpunkt zeigten. Wurde die Substanz im Berl-Block langsam erhitzt, so zersetzte sie sich erst oberhalb 250⁰, brachte man dagegen das Schmelzpunktsröhrchen bei 220⁰ ein, so schmolz sie sofort. In Wasser und Benzin ist die Substanz unlöslich, in Essigester löst sie sich gut und läßt sich aus absol. Alkohol umkrystallisieren.

Zur Analyse wurde 1 Stde. bei 100⁰ und 0.1 mm getrocknet.

3.793 mg Sbst.: 9.69 mg CO₂, 1.95 mg H₂O. — 4.241 mg Sbst.: 0.342 ccm N (747 mm, 23⁰).

C₃₈H₂₄O₄N₄ (618.3). Ber. C 69.87, H 5.54, N 9.06.
Gef. „ 69.67, „ 5.75, „ 9.14.

Das 5'-Trityl-lactoflavin wird schon durch verdünnte Essigsäure beim Erwärmen in Lactoflavin und Tritanol gespalten. Gegen verdünnte Natronlauge ist es in der Kälte beständig. Die Löslichkeit in Essigester (Phasenprobe) dient zur Unterscheidung von Lactoflavin.

⁶⁾ R. Kuhn, H. Rudy u. Th. Wagner-Jauregg, B. **66**, 1950 [1933].

⁷⁾ Ztschr. angew. Chem. **41**, 871 [1928], zusammenfassendes Referat.

⁸⁾ B. **65**, 1830 [1932]; **66**, 198 [1933]; Ztschr. physiol. Chem. **228**, 61 [1934].

2'.3'.4'-Triacetyl-5'-trityl-lactoflavin (III).

200 mg 5'-Trityl-lactoflavin wurden in 30 ccm trockenem Pyridin gelöst, mit 10 ccm Essigsäure-anhydrid versetzt und 24 Stdn. stehen gelassen. Danach wurde einige Min. zum Sieden erhitzt und nach dem Erkalten in Eiswasser gegossen. Der Farbstoff wurde mit Essigester ausgeschüttelt, dieser mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat geklärt, mit etwas Pyridin versetzt und im Vakuum eingeeengt. Der gelbe, krystallisierte Rückstand wurde zur Analyse 2-mal aus Essigester umkrystallisiert. Aus absol. Alkohol erhält man das 2'.3'.4'-Triacetyl-5'-trityl-lactoflavin in langen, gelben, an den Enden zugespitzten, schmalen Prismen, die zu Kugelbüscheln vereinigt sind. Schmp. 223—224° (k. Th.).

Zur Analyse wurde unter 0.1 mm bei 100° getrocknet.

4.210 mg Sbst.: 10.40 mg CO₂, 2.005 mg H₂O. — 4.011 mg Sbst.: 0.265 ccm N (761 mm, 20°).

C₄₂H₄₀O₉N₄ (744.34). Ber. C 67.71, H 5.41, N 7.52.

Gef. „ 67.37, „ 5.33, „ 7.71.

Die Triacetyl-trityl-Verbindung liefert einen in Essigester nicht mehr löslichen Farbstoff (Lactoflavin) erst, wenn man mit verd. Essigsäure erwärmt und mit verd. Natronlauge in der Kälte kurz stehen läßt. Die Abspaltung von Trityl und Acetyl kann auch in umgekehrter Reihenfolge vorgenommen werden.

2'.3'.4'-Triacetyl-lactoflavin (IV).

200 mg Triacetyl-trityl-lactoflavin wurden mit 20 ccm 80-proz. wäßriger Essigsäure 1/2 Stde. zum Sieden erhitzt. Eine nach dieser Zeit in der Kälte mit verd. Natronlauge alkalisch gemachte und nach einigen Sek. mit Essigsäure wieder lackmus-sauer gemachte Probe gab beim Durchschütteln mit Essigester keinen Farbstoff an diesen ab, ein Zeichen, daß der Trityl-Rest abgespalten war. Zur Aufarbeitung wurde die essigsaure Lösung des Farbstoffs mit Wasser verdünnt, zur Entfernung des abgespaltenen Tritanols mit viel Benzin ausgeschüttelt und das Triacetyl-lactoflavin dann der wäßrigen Schicht mit viel Essigester entzogen. Nach dem Einengen der Essigester-Lösung im Vakuum wurde das krystallisiert zurückbleibende Flavin in wenig siedendem Essigester gelöst und mit Benzin versetzt. Diese Umfällung wurde 2-mal wiederholt. Umkrystallisiert wurde zuletzt 1-mal aus Essigester, dann 2-mal aus Wasser. Aus Wasser erhält man das 2'.3'.4'-Triacetyl-lactoflavin in gelben, langen, an den Enden abgesehenen Stäbchen (Auslöschung 90°). Schmp. 202—203° (k. Th.).

Zur Analyse wurde 1 Stde. bei 100° und 0.1 mm getrocknet.

4.526 mg Sbst.: 9.04 mg CO₂, 2.195 mg H₂O. — 4.906 mg Sbst.: 0.476 ccm N (751 mm, 21°). — 6.298 mg Sbst.: 3.50 ccm n₁₀₀-NaOH.

C₂₃H₂₆O₉N₄ (502.25). Ber. C 54.95, H 5.22, N 11.15, CH₃CO 25.80.

Gef. „ 54.50, „ 5.43, „ 11.13, „ 23.91.

Das Triacetyl-lactoflavin geht wie das Tetraacetyl-lactoflavin aus verd. wäßriger Lösung beim einmaligen Durchschütteln mit Chloroform vollständig in dieses über.

Lactoflavin-5'-phosphorsäure (VI).

40 mg Triacetyl-lactoflavin werden in 100 ccm trockenem Pyridin heiß gelöst und nach dem Abkühlen auf 15—20° mit einer etwa 25° warmen

Lösung von 1 g Phosphoroxychlorid in 50 ccm trockenem Pyridin versetzt. Sehr bald tritt schwache Braunfärbung auf, die sich zusehends verstärkt. Zur Zersetzung des unveränderten Phosphoroxychlorids wird nach einigen Min. auf Eis gegossen, dann das Pyridin im Vakuum entfernt, der Farbstoff an Frankonit KL adsorbiert und das Adsorbat mehrfach mit Wasser ausgewaschen. Nach Elution mit Pyridin-Methanol-Wasser wird im Vakuum zur Trockne verdampft und der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen. Die Abspaltung der Acetylgruppen erfolgt durch 5 Min. langes Stehenlassen bei 15—20° in etwa $n/4$ -alkalischer Lösung. Die weitere Reinigung wird durch Versetzen der neutralisierten Lösung mit Silbernitrat, Abtrennen des Niederschlags, Zerlegen mit Schwefelwasserstoff, Einengen im Vakuum und Fällung mit Calciumacetat aus wäßrig-alkoholischer Lösung vorgenommen.

Die Lactoflavin-5'-phosphorsäure enthielt keine Spur von freiem Lactoflavin, wovon wir uns nach demselben Verfahren überzeugten, das zur Messung der Kinetik der Phosphorsäure-Abspaltung aus Lactoflavin-phosphorsäuren entwickelt worden ist³⁾.

Der Justus-Liebig-Gesellschaft danken wir aufrichtig für die Gewährung eines Stipendiums.

281. Richard Kuhn und John C. Lyman: Über das Redox-Potential des Murexids.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizin. Forschung, Heidelberg, Institut für Chemie.]
(Eingegangen am 22. Mai 1936.)

Versetzt man eine wäßrige Lösung von Murexid mit etwas Natriumhydrosulfit, so wird sie augenblicklich entfärbt. Schüttelt man dann mit Luft, so kehrt die rote Farbe in unverminderter Stärke zurück. Dieser Versuch zeigt, daß der seit über 100 Jahren bekannte Farbstoff¹⁾ zur Bildung einer Leuko-Verbindung befähigt ist. Durch Titration mit Natriumhydrosulfit läßt sich der Farbstoffgehalt in Präparaten verschiedener Darstellung quantitativ bestimmen: 1 Mol. Murexid nimmt 2 H-Atome auf. Man findet auf diesem Wege, daß die zahlreichen Verfahren, die zur Darstellung von Murexid empfohlen wurden, sehr unreine Präparate liefern, die meist nur wenige Prozent Farbstoff enthalten²⁾ und in der Hauptsache aus Uramil bestehen, dessen elementare Zusammensetzung ($C_4H_5N_3O_3$) sich von der des Ammoniumsalzes der Purpursäure ($C_8H_9N_6O_8$) kaum unterscheidet. Nach sehr zahlreichen Versuchen erhielten wir die reinsten Präparate nach dem Verfahren von O. Piloty³⁾. Sie enthielten nach der Titration mit Hydrosulfit 97—98% Farbstoff. Die Ausbeute betrug aber nur etwa 2% des an-

¹⁾ W. Prout, Philos. Trans. Roy. Soc. London 1818, 420; J. Liebig u. F. Wöhler, A. 26, 319 [1838]; 33, 120 [1840].

²⁾ Ein von Dr. Fraenkel u. Dr. Landau bezogenes Präparat von Murexid enthielt weniger als 1% Farbstoff.

³⁾ A. 333, 22 [1904]. Geeignet, aber auch nicht ergiebig, sind ferner die Verfahren von M. Slimmer u. J. Stieglitz (Amer. chem. Journ. 31, 661 [1904]) und von W. N. Hartley (Journ. chem. Soc. London 87, 1791, 1805, 1819 [1905]), der auch die Lage der Absorptionsbanden feststellte.