

benzol vom Schmp. 127—128° mit dieser Säure eine Anfangs violette Lösung, die sich schnell nach einem roten Farbton aufhellt. Nach 10 Min. haben sich allerdings beide Lösungen entfärbt, wobei jedoch die zuletzt genannte im Gegensatz zur ersten eine ganz schwache orangefarbene Tönung beibehält.

Bei der Anwendung der neuen synthetischen Methode zur Darstellung einiger der beschriebenen Verbindungen hat uns Hr. cand. rer. nat. Walter Riedel wertvolle Hilfe geleistet. Es sei ihm auch an dieser Stelle herzlich dafür gedankt.

#### 460. Richard Kuhn und Hermann Rudy: Lactoflavin als Co-Ferment; Wirkstoff und Träger.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizin. Forschung, Heidelberg, Institut für Chemie.]  
(Eingegangen am 19. Oktober 1936.)

Anlässlich der Synthese des ersten Flavins, das Wachstumswirkung zeigte<sup>1)</sup> (6.7-Dimethyl-9-*l*-araboflavin) wurde in einem Vortrag<sup>2)</sup> mitgeteilt, daß dieser synthetische Farbstoff ähnlich wie natürliches Lactoflavin befähigt sei, mit dem kolloiden Träger des gelben Ferments von O. Warburg und W. Christian eine „katalytisch wirksame Verbindung“ zu bilden. Der quantitative Vergleich ergab, daß die Wirkung geringer als die des gelben Ferments und die Bindung „nicht spezifisch“ war<sup>3)</sup>. Durch genügend lange Dialyse konnte aller Farbstoff vom Träger entfernt werden. Der Befund von H. Theorell<sup>4)</sup>, daß bei der Zerlegung des gelben Ferments durch verd. Säure eine Flavin-phosphorsäure entsteht und daß diese, nicht aber Lactoflavin, mit dem kolloiden Träger unter Rückbildung des gelben Ferments kuppelt, ließ die beobachtete katalytische Wirkung des Lactoflavins und des 6.7-Dimethyl-9-*l*-araboflavins „rätselhaft“<sup>5)</sup> erscheinen.

Nachdem die Synthese der Lactoflavin-5'-phosphorsäure<sup>6)</sup> und deren Kupplung zum gelben Ferment<sup>7)</sup> gelungen sind, haben wir neue Versuche über die katalytische Wirksamkeit von Lactoflavin in Gegenwart des jetzt viel weiter gereinigten kolloiden Trägers ausgeführt. Die Meinung, daß das Vitamin B<sub>2</sub> erst nach vorangehender Veresterung mit Phosphorsäure zur Bildung einer katalytisch wirksamen Protein-Verbindung — eines gelben Ferments — befähigt sei, hat sich dabei nicht als richtig erwiesen.

Mißt man die Geschwindigkeit der O<sub>2</sub>-Aufnahme im System von O. Warburg und W. Christian<sup>8)</sup>: Neuberg-Ester + Co-Ferment aus Blutzellen + Zwischenferment aus Hefe mit einer gegebenen Menge von kolloidem Träger unter Zusatz steigender Mengen von Lactoflavinphosphorsäure so wird, sobald die äquivalente Menge von 0.64 % zugesetzt ist, eine

<sup>1)</sup> R. Kuhn u. F. Weygand, B. **67**, 1939, 2084 [1934].

<sup>2)</sup> 26. Nov. 1934; Referat Angew. Chem. **48**, 29 [1935]; Nature **134**, 966 [1934].

<sup>3)</sup> B. **68**, 166 [1935] u. zwar S. 168.

<sup>4)</sup> Biochem. Ztschr. **275**, 37 [1934].

<sup>5)</sup> H. Theorell, Biochem. Ztschr. **278**, 263 [1935], u. zwar S. 266.

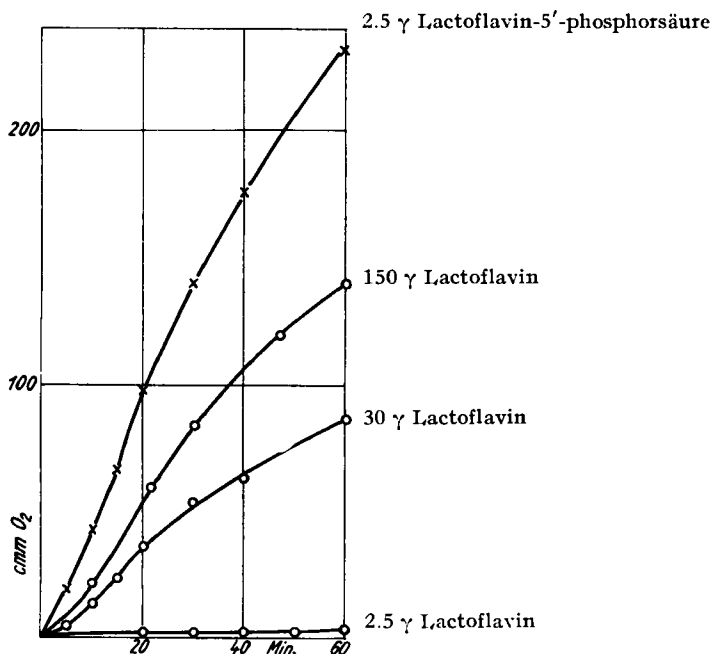
<sup>6)</sup> R. Kuhn, H. Rudy u. F. Weygand, B. **69**, 1543 [1936].

<sup>7)</sup> R. Kuhn u. H. Rudy, B. **69**, 1974 [1936].

<sup>8)</sup> Biochem. Ztschr. **254**, 438 [1932]; **257**, 492 [1933]; **263**, 228 [1933].

maximale Reaktionsgeschwindigkeit erhalten, die durch weiteren Zusatz von Lactoflavin-phosphorsäure nicht mehr gesteigert werden kann. Dies ist von H. Theorell<sup>9)</sup> für die aus dem natürlichen Ferment gewonnene Flavinphosphorsäure gezeigt worden und dies trifft für die synthetische Lactoflavin-5'-phosphorsäure in gleicher Weise zu. Sobald der Träger durch die äquivalente Menge der prosthetischen Gruppe abgesättigt ist, kann kein weiterer Farbstoff mehr zu katalytischer Wirkung gelangen.

Stellt man dieselbe Versuchsreihe mit Lactoflavin an, so ist bei Zusatz der äquivalenten Menge (Mol.-Gew. des Lactoflavins = 376, Mol.-Gew. des Trägers = 70000) fast keine O<sub>2</sub>-Aufnahme feststellbar. Steigert man aber den Lactoflavin-Zusatz bei konstanter Menge des Trägers weiter<sup>10)</sup>, so nimmt die Geschwindigkeit der O<sub>2</sub>-Aufnahme ständig zu und sie nähert sich schließlich der mit Lactoflavin-5'-phosphorsäure erzielbaren maximalen Reaktionsgeschwindigkeit (Abbild. 1).



Abbild. 1. Co-Ferment-Wirkung von Lactoflavin.

Die Kurve für Lactoflavin-5'-phosphorsäure stellt die bei der gegebenen Träger-Menge erzielbare maximale Reaktionsgeschwindigkeit dar.

Krystallisiertes Lactoflavin aus Milch<sup>11)</sup>, aus Hefe<sup>12)</sup> und das synthetische Vitamin<sup>13)</sup> zeigen dasselbe Verhalten, so daß die katalytische Wirkung

<sup>9)</sup> Biochem. Ztschr. **278**, 263 [1935], u. zwar S. 283.

<sup>10)</sup> In den eingangs erwähnten Versuchen [Fußn. 2] mit natürlichem Lactoflavin und synthetischem 6.7-Dimethyl-9-L-araboflavin war ein großer Überschuß an Farbstoff angewandt worden.

<sup>11)</sup> R. Kuhn, H. Rudy u. F. Weygand, B. **68**, 625 [1935].

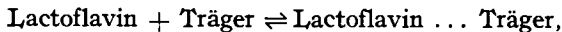
<sup>12)</sup> R. Kuhn u. H. Rudy, unveröffentlicht.

<sup>13)</sup> R. Kuhn, K. Reinmund, F. Weygand u. R. Ströbele, B. **68**, 1765 [1935].

nicht durch geringe Mengen von Begleitstoffen erklärbar ist. Ohne Zusatz des Trägers sind auch die höchsten angewandten Vitaminmengen praktisch wirkungslos.

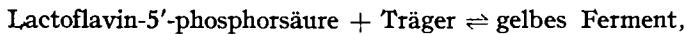
Eine Phosphorylierung des Lactoflavins findet, wie besondere Versuche zeigten, während des katalytischen Vorganges nicht statt. Selbst nach 15-stdg. Versuchsdauer lag der gesamte Farbstoff noch als freies Flavin vor.

Es gibt also zwei verschiedene Arten der Bindung des Wirkstoffes Lactoflavin an den Träger, die beide zu katalytisch wirksamen Symplexen<sup>14)</sup> führen. Das phosphorfreie und das phosphorhaltige Flavin-Enzym unterscheiden sich wesentlich durch die Haftfestigkeit der prosthetischen Gruppen: 1) Lactoflavin und Träger vereinigen sich umkehrbar,



wobei das Gleichgewicht bei neutraler Reaktion und sehr großer Verdünnung der in äquivalenten Mengen vorhandenen Reaktionsteilnehmer praktisch ganz auf der linken Seite liegt. Mit steigender Konzentration an Lactoflavin nimmt die Konzentration der katalytisch wirkenden Verbindung Lactoflavin ... Träger zu. Durch Dialyse bei  $p_H$  7 läßt sich alles Vitamin vom Träger entfernen.

2) Zwischen Lactoflavin-5'-phosphorsäure und Träger besteht ein entsprechendes Gleichgewicht,



das bei neutraler Reaktion ganz auf der rechten Seite liegt. Dieses Gleichgewicht ist  $p_H$ -abhängig, so daß, wie H. Theorell<sup>15)</sup> gezeigt hat, erst in saurer Lösung ( $p_H < 4$ ) aller Farbstoff vom Träger durch Dialyse entfernt ist<sup>15a)</sup>.

Der Unterschied in der Co-Ferment-Wirkung von Lactoflavin und Lactoflavin-5'-phosphorsäure ist nur quantitativer Art. Er beruht ganz überwiegend auf der verschiedenen Lage der beiden Dissoziationsgleichgewichte. Das absolute Wirkungsvermögen der Verbindung Lactoflavin ... Träger ist, wie aus den Abbild. 1 und 2 zu schließen ist, von derselben Größenordnung wie das der Verbindung Lactoflavin-5'-phosphorsäure ... Träger. Beide Protein-Verbindungen stellen Fermente dar. Es ergibt sich, daß Lactoflavin nicht nur die biologische Vorstufe eines Ferments, ein *Pro-Ferment*, ist, sondern daß ihm unmittelbar bereits die Eigenschaften eines *Co-Ferments* zukommen. Daß ein Co-Ferment durch Dialyse bei neutraler Reaktion von seinem Träger abgelöst werden kann, ist in anderen Fällen schon vielfach beobachtet worden.

Die Veresterung des Lactoflavins mit Phosphorsäure ist, quantitativ betrachtet, für die katalytischen Wirkungen, die das Vitamin im Organismus entfaltet, von größter Bedeutung. Die Frage, inwieweit daneben auch phosphorfreie Flavin-Enzyme physiologisch eine Rolle spielen können, ist von geringerer Wichtigkeit. Man muß sich allerdings vergegenwärtigen, daß in den tierischen Organen stets beträchtliche Mengen des Vitamins bzw. seines Phosphorsäure-esters in freiem Zustande vorkommen, in dem sie fluores-

<sup>14)</sup> R. Willstätter u. M. Rohdewald, Ztschr. physiol. Chem. **225**, 103 [1934].

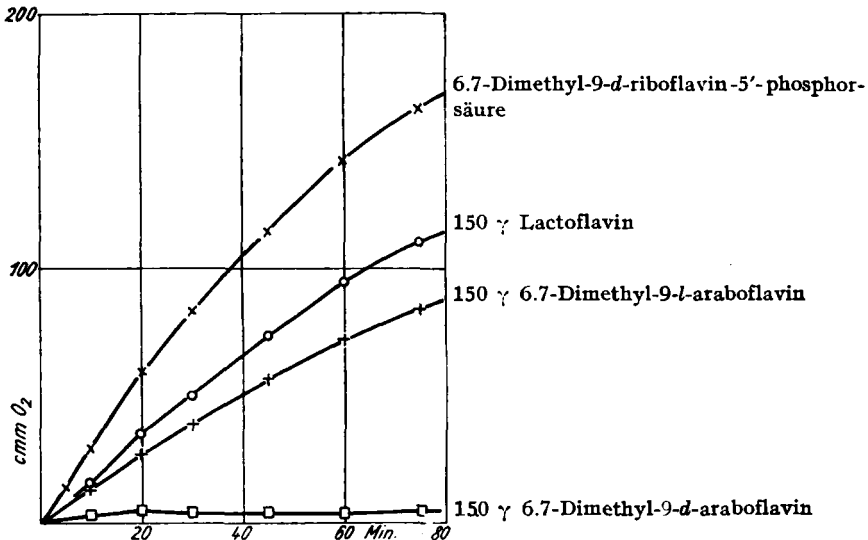
<sup>15)</sup> Biochem. Ztschr. **272**, 155 [1934]; **278**, 263 [1935].

<sup>15a)</sup> Für Esterasen haben H. Kraut u. W. v. Pantschenko-Jurewicz (Biochem. Ztschr. **275**, 114 [1935]) ein Gleichgewicht zwischen aktiver Gruppe (Agon) und Träger (Pheron) eingehend erörtert.

cieren (Ph. Ellinger und W. Koschara<sup>16</sup>), H. v. Euler und E. Adler<sup>17</sup>). In der Leber eines im Alter von 2 Jahren verstorbenen Kindes fand Hr. F. Weygand 1.30 mg freies Lactoflavin und nur 0.09 mg Lactoflavin-phosphorsäure. Die Resorption war offenbar ohne vorangehende Phosphorylierung eingetreten.

Die bloße Feststellung, daß ein Flavin — wie z. B. dasjenige in der Netzhaut<sup>17</sup> — dialysierbar ist, schließt eine Bindung an Eiweiß nicht aus.

Ähnlich wie Lactoflavin (6.7-Dimethyl-9-*d*-riboflavin) gibt auch 6.7-Dimethyl-9-*l*-araboflavin<sup>1</sup>) mit dem Träger eine leicht dissoziierende, katalytisch wirksame Eiweiß-Verbindung, während das Spiegelbild (6.7-Dimethyl-9-*d*-araboflavin)<sup>18</sup>) wirkungslos ist (Abbild. 2).



Abbild. 2. Spezifität der Co-Ferment-Wirkung freier Flavine.

Das 3.6.7-Trimethyl-9-*d*-riboflavin<sup>19</sup>) ist ebenso unwirksam, wie die daraus gewonnene 3.6.7-Trimethyl-9-*d*-riboflavin-(5')-phosphorsäure. Das direkt kupplungs-unfähige Flavin wurde also auch durch Veresterung mit Phosphorsäure nicht aktiv. Im Versuchsteil sind eine Reihe von weiteren Flavinen zu finden, die auf Co-Ferment-Wirkung geprüft wurden. Die bis jetzt vorliegenden Ergebnisse führen zu folgendem Bild:

1) Die Bildung eines Flavin-Enzyms ist nur möglich, wenn die NH-Gruppe in 3-Stellung *frei* ist. Der Ersatz von NH durch NCH<sub>3</sub> macht alle Flavine unfähig zur Bildung nicht fluoreszierender Alkalisalze und damit gleichzeitig unfähig zur Bildung nicht fluoreszierender, katalytisch wirksamer Protein-Verbindungen.

<sup>16</sup>) Ph. Ellinger u. A. Hirt, Ztschr. Anat. Entwickl.-Gesch. **90**, 791 [1929]; Ph. Ellinger u. A. Hirt in E. Abderhaldens Handb. d. biolog. Arbeitsmethoden, Abteil. V, Tl. 2/2, S. 1753 [1930]; Ph. Ellinger u. W. Koschara, B. **66**, 315 [1933].

<sup>17</sup>) Ztschr. physiol. Chem. **223**, 105 [1934].

<sup>18</sup>) R. Kuhn u. F. Weygand, B. **68**, 1282 [1935].

2) Nächst der freien NH-Gruppe in 3-Stellung sind die Struktur der hydroxydhaltigen Seitenkette in 9-Stellung und die stereochemische Anordnung der Hydroxyle ausschlaggebend.

a) Von den Flavinen, die in 9-Stellung eine Pentitkette tragen, sind bisher nur solche in Flavin-Enzyme übergeführt worden, bei denen die OH-Gruppe in 2'-Stellung bei der üblichen Schreibweise nach links zu stehen kommt, wie es bei den von der *d*-Ribose und *l*-Arabinose abgeleiteten Farbstoffen der Fall ist.

b) Die Acetylierung aller Hydroxyle *vernichtet* jede Co-Ferment-Wirkung. 2'.3'.4'.5'-Tetraacetyl-lactoflavin<sup>19)</sup> und 2'.3'.4'-Triacetyl-lactoflavin-5'-phosphorsäure<sup>20)</sup> sind ganz unwirksam.

c) Die den Nucleosiden entsprechenden Flavin-9-glucoside können keine Flavin-Enzyme bilden. Selbst das 6.7-Dimethyl-flavin-9-*d*-ribosid<sup>21)</sup>, das sich vom Vitamin B<sub>2</sub> nur durch den Mindergehalt von 2 H-Atomen unterscheidet, zeigt gar keine katalytische Wirkung.

3) Die beiden 6.7-ständigen Methylgruppen des Vitamins dürfen nicht gleichzeitig in Fortfall kommen.

4) Die Veresterung mit Phosphorsäure ist, sobald die voranstehenden Bedingungen erfüllt sind, für die katalytische Wirksamkeit der Flavine nicht notwendig, aber für die Haftfestigkeit der Farbstoffe am Träger bedeutungsvoll.

Diese *in vitro* gewonnenen Ergebnisse wollen wir nun Punkt für Punkt vergleichen mit denjenigen, zu denen wir bei der Prüfung derselben Flavine *in vivo* gekommen sind, also mit der Wachstumswirkung an B<sub>2</sub>-frei ernährten Ratten:

1) Wie im katalytischen Test haben wir auch im Vitamin-Test nach P. György, F. W. van Klaveren, R. Kuhn und Th. Wagner-Jauregg<sup>22)</sup> alle Flavine, bei denen die NH-Gruppe in 3-Stellung methyliert ist, unwirksam befunden<sup>23)</sup>.

2) Konstitution und Konfiguration der hydroxylhaltigen Seitenkette wirken sich bei beiden Bestimmungsmethoden gleichartig aus. Eine quantitative Übereinstimmung, d. h. eine Proportionalität zwischen katalytischer Wirkung und Wachstumseffekt ist nicht zu erwarten.

a) Soweit eigene Versuche vorliegen<sup>23)</sup>, ist die Übereinstimmung bisher vorzüglich. Eine wesentliche Vermehrung des Vergleichsmaterials an weiteren Flavinen steht hier in Aussicht. Ein Widerspruch liegt vor beim 6.7-Dimethyl-9-*d*-araboflavin, das keine katalytische Wirksamkeit hat, das aber H. v. Euler, P. Karrer und M. Malmberg<sup>24)</sup> auf Grund von Versuchsversuchen unter die Zahl der wirksamen B<sub>2</sub>-Vitamine aufgenommen haben. Im hiesigen Institut ist das 6.7-Dimethyl-9-*d*-araboflavin<sup>25)</sup> an B<sub>2</sub>-frei ernährten Ratten wiederholt geprüft und stets unwirksam befunden worden. Hr. B. C. P. Janzen teilte uns mit, daß auch in Amsterdam keine Wachstumswirkung dieses Flavins festgestellt werden konnte.

<sup>19)</sup> R. Kuhn u. Th. Wagner-Jauregg, B. **66**, 1577 [1933].

<sup>20)</sup> R. Kuhn, H. Rudy u. F. Weygand, B. **69**, 1543 [1936].

<sup>21)</sup> R. Kuhn u. R. Ströbele, Angew. Chem. **49**, 6 [1936].

<sup>22)</sup> Ztschr. physiol. Chem. **223**, 236 [1934].

<sup>23)</sup> R. Kuhn, Angew. Chem. **49**, 6 [1936].

<sup>24)</sup> Helv. chim. Acta **18**, 1336 [1935]; P. Karrer u. T. H. Quibell, Helv. chim. Acta **19**, 1034 [1936].

<sup>25)</sup> R. Kuhn u. F. Weygand, B. **68**, 1282 [1935].

b) Die Vernichtung der katalytischen Wirksamkeit durch Acetylierung der Hydroxyle war auf Grund der *in vivo* gewonnenen Ergebnisse unerwartet, denn die Wachstumswirkung des 2'.3'.4'.5'-Tetraacetyl-lactoflavins bleibt hinter derjenigen des freien Vitamins nur wenig zurück<sup>26)</sup>. Wenn man bedenkt, wie äußerst leicht Tetraacetyl-lacto-flavin verseifbar ist<sup>19)</sup>, wird man geneigt sein, diesen Gegensatz durch die Annahme zu erklären, daß die Tetraacetyl-Verbindung im Organismus Hydrolyse erleidet und erst das freie Lactoflavin zur Wirkung gelangt.

c) 6.7-Dimethylflavin-9-*d*-ribosid ist im Tierversuch nicht nur bei peroraler Verabreichung, wobei mit hydrolytischer Spaltung im Magen zu rechnen war, sondern auch bei intraperitonealer Einspritzung, ohne Wachstumswirkung.

3) In Übereinstimmung mit dem katalytischen Test ist noch kein Flavin bekannt geworden, das bei unsubstituiertem Benzolkern (freie 5-, 6-, 7- und 8-Stellung) Wachstum an B<sub>2</sub>-frei ernährten Ratten hervorruft.

4) Die Veresterung des Lactoflavins mit Phosphorsäure in 5'-Stellung ist ohne Einfluß auf die Wachstumswirkung<sup>27)</sup>. Bei der im hiesigen Institut angewandten Grundkost<sup>22)</sup> erzeugen Lactoflavin, Lactoflavin-5'-phosphorsäure und gelbes Ferment übereinstimmend eine Gewichtszunahme von 40 g in 30 Tgn., wenn 7—8  $\gamma$  Farbstoff (C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>) je Tag und Ratte gegeben werden. Selbst beim gelben Ferment macht es dabei nichts aus, ob man per os füttert oder intraperitoneal spritzt<sup>28)</sup>.

Aus der soeben durchgeführten Gegenüberstellung erhellt, daß mit den vorliegenden Versuchen auf dem Gebiete des Vitamins B<sub>2</sub> ein Ziel der Wirkstoff-Forschung erreicht scheint: ohne Zellen und Gewebe über Wirksamkeit und Unwirksamkeit natürlicher wie synthetischer Wachstumsstoffe entscheiden zu können. Der neue katalytische Test erfordert zur Ausführung etwa eine Stde. gegenüber vielen Wochen, die man zum Wachstumstest benötigt. Über die praktischen Anwendungsmöglichkeiten eines Vitamins wird immer nur der Versuch am lebenden Objekt entscheiden. Dem Chemiker aber, der Stoffe mit Vitamin-Wirkung synthetisch darstellt, wird eine schnell ausführbare Orientierung darüber, ob er auf dem richtigen Wege ist, willkommen sein: die katalytisch unwirksamen Flavine werden aller Voraussicht nach auch im Tierversuch keine Wachstumswirkung entfalten. Umgekehrt wird man damit rechnen, daß vielfach Flavine im lebenden Tier das Wachstum schwächer beeinflussen werden, als es ihrer katalytischen Wirksamkeit *in vitro* entspricht. Denn die Resorption und neben anderen Umständen insbesondere die Veresterung mit Phosphorsäure, die für die quantitativen Verhältnisse ausschlaggebend ist, werden von Fall zu Fall verschieden sein. Sollten wider Erwarten katalytisch unwirksame Flavine mit Sicherheit als wachstumsfördernd erkannt werden<sup>29)</sup>, so wird dies die seit 3 Jahren vertretene Vorstellung, daß die Wirksamkeit des gelben Vitamins auf die katalytischen Wirkungen eines im Tierkörper daraus entstehenden gelben Ferments hinausläuft, nicht mehr

<sup>26)</sup> P. György, R. Kuhn u. Th. Wagner-Jauregg, Ztschr. physiol. Chem. **223**, 241 [1934].

<sup>27)</sup> R. Kuhn u. H. Rudy, Ztschr. physiol. Chem. **239**, 47 [1936].

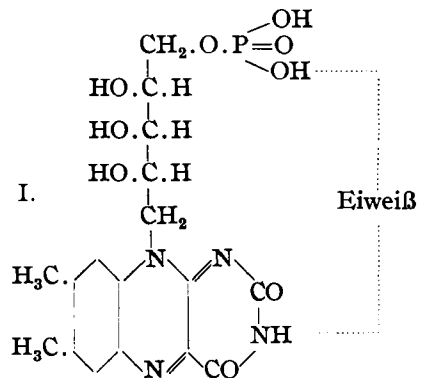
<sup>28)</sup> R. Kuhn u. H. Rudy, unveröffentlicht; teilweise ref. Angew. Chem. **49**, 323 [1936].

<sup>29)</sup> vergl. die Angaben von H. v. Euler, P. Karrer u. M. Malmberg (Fußn. 24) über die Wachstumswirkung des 6.7-Dimethyl-9-*d*-araboflavins. Daß aus einem unwirksamen Flavin im Organismus eine aktive Flavin-phosphorsäure gebildet wird, erscheint nicht unmöglich.

erschüttern. In allen Einzelheiten, die wir aufgezeigt haben, und bei allen synthetischen Flavinen, die bisher von uns untersucht wurden, tritt die nahe Beziehung zwischen katalytischer Wirksamkeit und Wachstumswirkung klar zu Tage. In Zukunft etwa noch auftretende Unstimmigkeiten dürften den gewonnenen Einblick in die Wirkungsweise eines Vitamins nur noch um die Erkenntnis zusätzlicher Hilfsmaßnahmen des Tierkörpers bei der Bildung von Flavin-Enzymen aus Flavinen bereichern.

Der katalytische Test, wie wir ihn vorschlagen, ist bei genauer Betrachtung nicht ganz physiologisch. Da wir die Wachstumswirkung der Flavine an der Ratte messen, sollten wir auch den in den Organen der Ratte vorkommenden und nicht den aus Hefe isolierten spezifischen Eiweißkörper als kolloiden Träger zur Messung der katalytischen Wirksamkeit benutzen, sofern quantitative Vergleiche angestrebt werden. In Anbetracht der Tatsache, daß die Globine in den Blutfarbstoffen verschiedener Tiere, ja sogar bei verschiedenen Individuen derselben Art, charakteristische Unterschiede (S-Gehalt!) aufweisen, wird man auch eine Verschiedenheit der in Hefen und in verschiedenen Tieren gebildeten Träger-Proteine des gelben Vitamins bis auf weiteres für möglich halten. Daß die Dehydrase (Zwischenferment) im katalytischen Test gleichfalls aus Hefe stammt und nicht tierischen Ursprungs ist, erachten wir demgegenüber nicht als störend; ebensowenig den Umstand, daß die Dehydrierung von Neuberg- und Robison-Ester, die als Substrate angewandt werden, mit dem Wachstumsvorgang bei Tieren vielleicht gar nichts zu tun hat. Denn es geht aus den Untersuchungen von O. Warburg und W. Christian überzeugend hervor, daß Substrat und Dehydrase nur die Aufgabe haben, die Nicotinsäure-amid-Gruppen des im Reaktionsansatz enthaltenen farblosen Co-Ferments aus Blutzellen zu hydrieren. Diese Dihydro-Verbindung, auf deren Bildungsweise es mithin nicht ankommt, stellt für die geprüften Flavin-Enzyme das „unmittelbare Substrat“ dar. Nachdem nicht nur die hydrierte Stufe des Co-Ferments aus Blutzellen (Triphospho-Pyridin-Nucleotid), sondern nach H. v. Euler auch die hydrierte Stufe der Cozymase aus Hefe (Diphospho-Pyridin-Nucleotid) durch gelbes Ferment spezifisch dehydriert wird, ist eine Reihe von Modifikationen zur Prüfung der katalytischen Wirkungen natürlicher und synthetischer Flavine naheliegend.

Versucht man aus den vorliegenden Tatsachen eine Strukturformel des gelben Ferments abzuleiten, welche die Bindungsverhältnisse der prosthetischen Gruppe an den Träger zum Ausdruck bringt, so muß man, wie schon R. Kuhn und P. Boulanger<sup>30)</sup> sowie H. Rudy<sup>31)</sup> ausgeführt haben, der überragenden Bedeutung der NH-Gruppe in 3-Stellung (salzartige Bindung) und der Phosphorsäure (Haftfestigkeit) gleichzeitig Ausdruck verleihen:

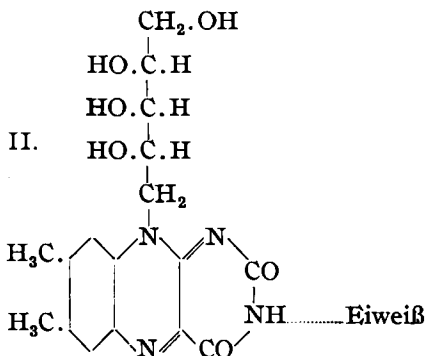


<sup>30)</sup> B. 69, 1557 [1936].

<sup>31)</sup> Naturwiss. 24, 501 [1936].

Die Schlußfolgerung, daß „mindestens“ 2 Haftstellen anzunehmen sind<sup>32)</sup>, wird durch die neuen katalytischen Versuche als sehr berechtigt erwiesen. Denn es zeigt sich, daß das Wirkungsvermögen der Flavine, das wir jetzt ohne Zellen und Gewebe messend vergleichen können, ebenso wie deren Einfluß auf das Wachstum auch von den Methylgruppen am Benzolkern sowie von den freien Hydroxylen der Seitenkette in hohem Maße abhängt. Es liegt nun nahe, zu sagen, die Frage nach den Haftstellen und deren Formulierung verliert damit ihren Sinn, man müßte die punktierten Linien, hinter denen sich die Grenzen unseres Wissens verbergen, vom Träger-Eiweiß auch nach den Hydroxylen und nach den Methylen am Benzolkern ziehen: die prosthetische Gruppe als Ganzes bettet sich an einer bevorzugten Stelle des Trägermoleküls ein. Wir glauben, daß diese Vorstellung sehr weitgehend zutrifft, aber wir glauben nicht, daß dadurch die überragende Bedeutung der im Formelbild ersichtlichen Haftstellen geschmälert wird. Die Methylgruppen haben einen so starken Einfluß auf das Redox-Potential<sup>30)</sup>, daß es vorläufig nicht nötig erscheint, an dieser Stelle eine unmittelbare Bindung an den Träger anzunehmen.

In dem ohne Vermittlung von Phosphorsäure aus Lactoflavin entstehenden Flavin-Enzym ist die hauptsächlichste Haftstelle an der NH-Gruppe in 3 zu suchen.



Der große Einfluß, den Änderungen in der Konstitution und Konfiguration der Pentitkette ausüben, legt auch in diesem Falle die Vorstellung von der „Einbettung“ des gesamten Farbstoffmoleküls am Eiweiß nahe.

Das Flavo-phospho-protein I, in dem die prosthetische Gruppe an 2 Stellen am Eiweiß haftet, zerfällt erst in saurer Lösung in die beiden Komponenten. Das Flavo-protein II, in dem sich nur eine Haftstelle findet, ist schon bei neutraler Reaktion sehr weitgehend dissoziiert.

### Beschreibung der Versuche.

Die zur Gewinnung des kolloiden Trägers verwendeten Präparate von gelbem Ferment waren wie früher<sup>7)</sup> aus Hefe der Löwenbrauerei-München nach H. Theorell<sup>8)</sup> dargestellt. Sie enthielten 376 Tle. Farbstoff ( $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_8$ ) in etwa 140000 Tln. Trockensubstanz. Die 6.7-Dimethyl-9-*d*-riboflavinschwefelsäure wurde durch Einwirkung von Chlorsulfonsäure in Pyridin auf Lactoflavin bereitet. Das geprüfte Präparat enthielt gar kein unverestertes Vitamin und wanderte bei  $\text{p}_\text{H} = 7.2$  so wie Lactoflavin-5'-phosphorsäure anodisch. Die Co-Ferment-Wirkung dieses Schwefelsäure-esters ist bemerkenswert, aber nicht mit derjenigen des 5'-Phosphorsäure-esters vergleichbar. Denn durch Dialyse bei neutraler Reaktion ließ sich der Farbstoff vom Träger ablösen.

<sup>32)</sup> Die Lactoflavin-5'-phosphorsäure ist dreibasisch. Ob von den beiden sauren OH-Gruppen, die das Phosphoratom trägt, nur eine oder beide die Bindung an den spezifischen Eiweißkörpern vermitteln, ist noch unbekannt.



## Methylenblau-Entfärbung.

Je 0.50 ccm Methylenblau 1:5000, 0.10 ccm  $m_{1/2}$ -Phosphat von  $p_H 7.0$ , 0.1 ccm  $m_{10}$ -Neuberg-Ester (Kaliumsalz), 0.20 ccm Co-Ferment aus Pferdeblut, 0.50 ccm Zwischenferment aus Löwenbräu-Hefe. 37°. Je 10  $\gamma$  Farbstoff als  $C_{17}H_{20}N_4O_6$  (Überschuß).

Je 0.50 ccm kolloider Träger	entfärbt nach
0.10 ccm Wasser .....	17 Min.
0.10 ccm 6.7-Dimethyl-9-d-riboflavin-5'-phosphorsäure.....	1 „
0.10 ccm 3.6.7-Trimethyl-9-d-riboflavin-phosphorsäure.....	16 „
0.10 ccm 6.7-Dimethyl-9-d-riboflavin-schwefelsäure (Na-Salz) .....	3 $\frac{1}{2}$ „
0.10 ccm Lactoflavin ohne Träger (+ 0.5 ccm Wasser) .....	16 „

Je 0.50 ccm kolloider Träger + wechselnde Mengen Flavin	entfärbt nach
0.10 ccm Wasser .....	21 Min.
0.10 ccm 6.7-Dimethyl-9-d-riboflavin (synth.) .....	30 $\gamma$ 1 $\frac{1}{4}$ „
	12 $\gamma$ 2 „
	3 $\gamma$ 4 $\frac{1}{2}$ „
0.10 ccm 6.7-Dimethyl-9-l-araboflavin .....	30 $\gamma$ 1 $\frac{3}{4}$ „
	12 $\gamma$ 2 $\frac{1}{2}$ „
	3 $\gamma$ 5 $\frac{1}{2}$ „
0.10 ccm 6.7-Dimethyl-9-d-araboflavin.....	30 $\gamma$ 17 $\frac{1}{4}$ „
	12 $\gamma$ 20 $\frac{1}{2}$ „
0.10 ccm 3.6.7-Trimethyl-9-d-riboflavin .....	30 $\gamma$ 15 „
	12 $\gamma$ 20 „
	3 $\gamma$ 22 „
0.10 ccm 6.7-Dimethyl-9-d-riboflavin-schwefelsäure (Na-Salz) ..	30 $\gamma$ 2 $\frac{1}{4}$ „
	12 $\gamma$ 2 $\frac{1}{4}$ „
	3 $\gamma$ 5 $\frac{1}{4}$ „

Je 0.50 ccm kolloider Träger + 0.10 ccm Wasser.....	entfärbt nach
	23 Min.
0.10 ccm 6.7-Dimethyl-9-d-riboflavin aus Molke .....	150 $\gamma$ 1 $\frac{3}{4}$ „
	50 $\gamma$ 2 $\frac{1}{2}$ „
0.10 ccm 9-d-Riboflavin .....	150 $\gamma$ 8 $\frac{3}{4}$ „
	50 $\gamma$ 10 $\frac{1}{4}$ „
0.10 ccm 9-d-Araboflavin .....	150 $\gamma$ 11 „
	50 $\gamma$ 14 $\frac{3}{4}$ „
0.10 ccm 9-l-Araboflavin .....	150 $\gamma$ 11 „
	50 $\gamma$ 12 $\frac{3}{4}$ „
0.10 ccm Tetraacetyl-6.7-dimethyl-9-d-riboflavin (aus Molke) ..	100 $\gamma$ 12 $\frac{1}{2}$ „
	50 $\gamma$ 16 „
0.10 ccm 9-d-Glucoflavin.....	150 $\gamma$ 11 $\frac{3}{4}$ „
	50 $\gamma$ 14 „
0.10 ccm 6.7-Dimethyl-9-d-ribosidoflavin.....	35 $\gamma$ 12 „
0.10 ccm 6.7-Dimethyl-9-d-araboflavin ohne Träger.....	150 $\gamma$ 12 $\frac{3}{4}$ „
0.10 ccm 6.7-Dimethyl-9-d-riboflavin aus Molke + 0.5 ccm Wasser .....	150 $\gamma$ 18 „

+ 0.1 ccm Wasser	23 Min.
0.1 ccm 6.7-Dimethyl-9-d-riboflavin-5'-phosphorsäure .....	15 $\gamma$ 2 $\frac{1}{2}$ „
0.1 ccm Triacetyl-6.7-dimethyl-9-d-riboflavin-5'-phosphorsäure .....	15 $\gamma$ 17 „
0.1 ccm 6.7-Dimethyl-9-d-glucoflavin .....	50 $\gamma$ 11 „

Unmittelbar vergleichbar sind nur die mit gleichem Träger und Zwischenferment ausgeführten Versuche. Dasselbe gilt für die folgenden manometrischen Messungen.

Sauerstoff-Aufnahme (cmm).

Je 1 ccm  $m_{10}$ -Neuberg-Ester, 0.20 ccm  $m_x$ -Phosphat pH 7.0, 0.50 ccm Co-Ferment aus Pferdeblut, 0.50 ccm Zwischenferment aus Löwenbräu-Hefe. Im Anhang 0.50 ccm kolloider Träger + 0.10 ccm Flavin bzw. Flavinphosphorsäure (wechselnde Mengen). Im Einsatz 0.20 ccm 2-n. Kalilauge. Reiner Sauerstoff, 37°.

Zeit in Min.	Träger ohne Flavin	6.7-Dimethyl-9-d-riboflavin-5'-phosphorsäure	3.6.7-Tri-methyl-9-d-riboflavin-phosphorsäure	6.7-Di-methyl-9-d-riboflavin-schwefel-säure	6.7-Dimethyl-9-d-riboflavin (synth.)			3.6.7-Tri-methyl-9-d-riboflavin
		2.5 $\gamma$	4 $\gamma$	4 $\gamma$	30 $\gamma$	13 $\gamma$	2.5 $\gamma$	24 $\gamma$
[nach Abzug des vom Träger aufgenommenen O <sub>2</sub> aus Spalte 2]								
5	1.55	19.25	0	1.8	5.2	3.4	0	0.85
10	3.3	43.3	0	1.7	13.6	3.6	0	1.55
15	3.3	67.4	0	4.9	23.7	5.3	+0.5	2.75
20	3.3	96.9	0	4.9	37.1	7.0	0	5.15
30	9.35	121.6	2.1	11.6	54.8	6.1	-0.8	6.35
40	17.1	175.9	0	11.8	62.2	1.8	0	5.9
60	26.5	232.5	0.5	19.7	86.5	4.4	+0.5	4.9

Zeit in Min.	Träger ohne Flavin	150 $\gamma$ Lacto-flavin ohne Träger	6.7-Di-methyl-9-d-riboflavin-5'-phosphorsäure	3.6.7-Tri-methyl-9-d-riboflavin-phosphorsäure	6.7-Di-methyl-9-d-riboflavin-schwefel-säure (Na-Salz)	6.7-Di-methyl-9-d-riboflavin	3.6.7-Tri-methyl-9-d-riboflavin	6.7-Di-methyl-9-l-arabo-flavin	6.7-Di-methyl-9-d-arabo-flavin
		30 $\gamma$	30 $\gamma$	30 $\gamma$	150 $\gamma$	150 $\gamma$	150 $\gamma$	150 $\gamma$	150 $\gamma$
[nach Abzug des vom Träger bzw. Flavin allein aufgenommenen O <sub>2</sub> aus Spalte 2 u. 3]									
5	1.6	0.1	13.0	0	0.1	1.9	0	4.7	0.8
10	1.6	0	28.8	0	5.1	13.9	1.6	13.5	3.25
20	3.1	1.7	59.0	2.1	12.0	35.0	1.8	28.3	5.4
30	6.3	1.7	82.5	2.3	17.2	50.7	0.2	39.3	3.8
45	9.4	3.4	114.6	2.8	22.5	73.6	0.4	56.6	3.9
60	15.7	8.4	142.3	4.9	31.4	95.3	0.3	72.2	3.7
75	18.8	11.8	162.2	3.5	36.7	110.2	2.2	84.2	5.2

Zeit in Min.	Träger ohne Flavin	6.7-Di-methyl-9-d-riboflavin-5'-phosphorsäure	Triacetyl-6.7-di-methyl-9-d-riboflavin-5'-phosphorsäure	Tetra-acetyl-6.7-dimethyl-9-d-riboflavin	9-d-Ribo-flavin	9-l-Arabo-flavin	9-d-Arabo-flavin	6.7-Di-methyl-9-l-arabo-flavin
		15 $\gamma$	15 $\gamma$	100 $\gamma$	150 $\gamma$	150 $\gamma$	150 $\gamma$	150 $\gamma$
[nach Abzug des vom Träger bzw. Flavin allein aufgenommenen O <sub>2</sub> ]								
5	3.2	2.2	0	0	0	0	0	0.3
10	6.5	9.5	0	0	0	0	0	0.5
20	9.7	21.3	0	0	0	0	0	6.0
35	16.2	40.3	1.0	0	0	0.5	1.0	10.0
50	17.8	54.2	1.0	0	1.6	1.0	0	18.8
75	21.1	80.0	1.3	1.7	4.8	1.2	0.5	26.0
110	29.2	102.8	1.1	1.1	12.0	1.8	0.9	32.0

Zeit in Min.	Träger ohne Flavin	6.7-Dimethyl- 9-d-riboflavin (aus Molke)
		150 $\gamma$
10	0	20.5
20	0	27.4
30	0	36.4
40	1.6	47.1
55	6.5	63.2
75	16.3	77.8
105	21.3	105.7

Hrn. H. W. Rzeppa danken wir für seine ausgezeichnete Unterstützung bei der Ausführung aller Messungen.

#### 461. Felix Seidel und Otto Engelfried: Chemische und textilchemische Studien an neuen Textilhilfsmitteln und Farbstoffen.

[Aus d. Chem. Institut d. Universität Tübingen.]

(Eingegangen am 9. Oktober 1936.)

Seit dem Beginn der großtechnischen Herstellung künstlicher Spinnfasern war die Textilchemie ständig bestrebt, deren Eigenschaften zu verbessern. Diese Einstellung zeigt sich einerseits an der Vervollkommnung des Spinnvorganges und andererseits an der Verwendung vieler und verschiedenartigster Spezialpräparate, die als Zusätze zu den Spinnlösungen oder für eine Nachbehandlung des fertigen Fadens Verwendung finden.

Bekanntlich besitzt Kunstseide in nassem Zustande — gegenüber der natürlichen Cellulosefaser — eine erheblich verminderte Reißfestigkeit; dieser Nachteil zeigt sich bei allen Naß-Behandlungen in der häufigen Wiederkehr mechanischer Schäden. Wäscherei und Bleicherei müssen mildere Behandlungsformen wählen, die im allgemeinen auf eine Verminderung von Temperatur und Einwirkungszeit hinauslaufen. Gegenwärtig findet diese Forderung in den vorhandenen Netz- und Emulgierungsmitteln ihre Erfüllung.

Die Erfahrungen und Erfolge, welche fast immer zuerst bei der Nachbehandlung künstlicher Spinnfäden mit den verschiedenartigsten technischen Präparaten gewonnen wurden, sind alsbald auch auf pflanzliche und tierische Spinnfasern übernommen worden. Die chemische Patentliteratur und der Reklameteil textilchemischer Zeitschriften weisen dauernd auf die Veredelungsmöglichkeiten aller Gespinnstfasern hin. Es ist aber geradezu überraschend, daß dieses Gebiet der Chemie kaum eine eingehende wissenschaftliche Bearbeitung gefunden hat. Nur über die neueren chemischen Waschmittel, die sauren Schwefelsäure-ester der Fettalkohole und die Kondensationsprodukte vom Typus der „Igepone“ finden sich einige wissenschaftliche Abhandlungen, aber auch ihr Inhalt ist z. Tl. weniger auf präparative und systematische Forschung eingestellt, als vielmehr auf eine etwas einseitige Betonung der Vorzüge moderner technischer Handelspräparate der Veredelungsindustrie. Demzufolge finden sich im chemischen Schrifttum auch kaum Veröffentlichungen, wie sie die Farbenchemie in so großer Zahl kennt, in denen