

## Über einige natürlich vorkommende, biochemisch bemerkenswerte Pigmente

von P. Karrer.

(9. VI. 36.)

Zu den Erkenntnissen der modernen Biochemie gehört die Tatsache, dass ein bestimmter Typus einer organischen Verbindung von der pflanzlichen oder tierischen Zelle oft in ausserordentlich mannigfaltiger Art abgewandelt wird, so dass nicht selten eine sehr grosse Zahl eng verwandter Stoffe gefunden werden, die sich nur durch ein Mehr oder Weniger von Hydroxylen, Methylgruppen, C-Atomen usw. oder durch die Stellung solcher Substituenten unterscheiden. Alkaloide, Sterine, Zucker, Aminosäuren usw. sind bekannte Beispiele. Daneben treffen wir aber gelegentlich auch auf natürliche Substanzen, die etwas Einmaliges zu sein und keine näheren Verwandten im Naturreich zu haben scheinen. So viel wir heute übersehen können, trifft dies für manche Alkaloide, Vitamine und Hormone zu; einem Verwandten des Thyroxins ist man bisher in der Natur nicht begegnet und auch für das B<sub>1</sub>-Vitamin kennt man bis heute keine strukturverwandte natürliche Substanz.

Unter den natürlichen Pigmenten sind diese beiden verschiedenen Fälle auch verwirklicht. Es gibt natürliche Farbstoffklassen, welche die Natur in allen denkbaren Variationen abgewandelt hat; Beispiele liegen vor in den Flavonen, Flavonolen, Anthocyanen, aber auch in Blut- und Gallenfarbstoffen usw. Sehr viel seltener sind die Fälle, wo ein natürliches Pigment ohne nähere Verwandte auftritt und der Chemiker gezwungen ist, die Verbindungsklasse künstlich auszubauen.

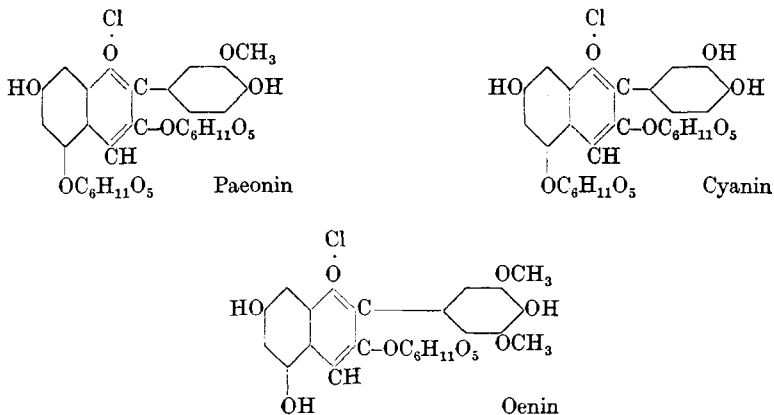
Unser Laboratorium hat sich in den letzten Jahren mit mehreren Gruppen von natürlichen Farbstoffen beschäftigt, von denen die einen dem ersten, eine andere dem zweiten der erwähnten Typen entspricht.

Es sind insbesondere die Carotinoide, Anthocyane und Flavine. Meine nachfolgenden Ausführungen beschäftigen sich mit einigen diese Verbindungsgruppen berührenden Fragen.

In dem bekannten Buch von L. S. Palmer über Carotinoide aus dem Jahr 1922 sind erst 6 krystallisierte und analysierte Carotinoide beschrieben (Carotin, Lycopin, Xanthophyll, Lutein, Fucoxanthin und Rhodoxanthin). Ferner war damals Bixin bekannt. Vor 3 Jahren hatte sich die Zahl dieser in der Natur aufgefundenen Pigmente auf etwa 15 erhöht; heute kennen wir aber schon ca. 30

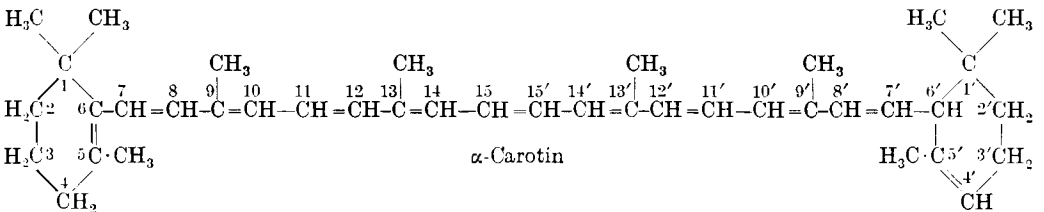
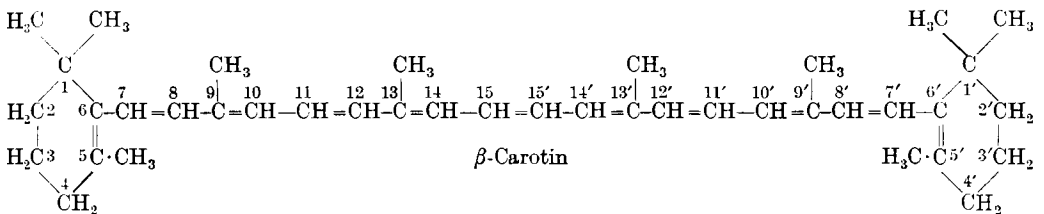
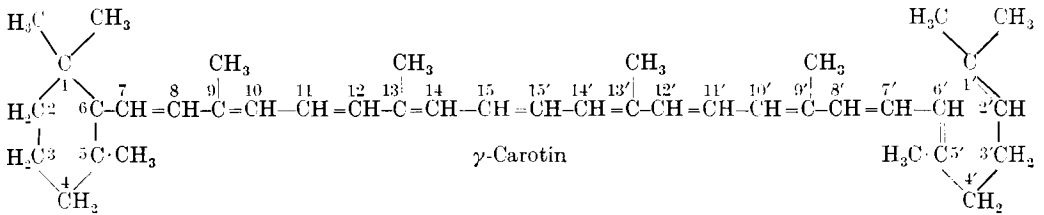
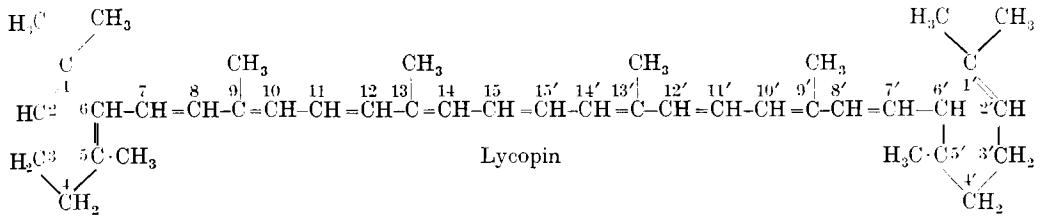
natürlich vorkommende Farbstoffe der Gruppe und spektralanalytisch wurden weitere nachgewiesen.

Diese sprunghaften Fortschritte sind einzig der Einführung neuer Trennungverfahren zu verdanken, unter denen die *Tswett*-sche chromatographische Analyse das weitaus wichtigste ist. Mit deren Hilfe konnten zahlreiche Carotinoidmischungen zerlegt und in reine Pigmente aufgeteilt werden. Die Übertragung der Methode auf andere Farbstoffklassen verspricht auch bei diesen neue Erkenntnisse. So haben wir kürzlich bei der Untersuchung von zwei Anthocyanen, dem Paeonin und dem Althaein, die beide als einheitlich angesehen worden waren, mit Hilfe der Chromatographie nachweisen können, dass sie keineswegs homogen sind, sondern recht bedeutende Mengen von Begleitern derselben Farbstoffklasse enthalten. Im Rohpaeonin wurde Cyanin, im Althaein Oenin gefunden, also Anthocyane, die sich von dem Hauptpigment durch einen Mehr- oder Mindergehalt von Methoxygruppen auszeichnen.



Diese Beobachtungen mahnen zur Vorsicht, wenn man aus Farbenreaktionen und Entmischungsverfahren allein Schlussfolgerungen über die Zusammensetzung von Anthocyanmischungen ziehen will. Jedenfalls ist durch solche Methoden weder die Anwesenheit des Cyanins im Paeonin noch die des Oenins im Althaein festgestellt worden und es ist vorauszusehen, dass ähnliche Begleiter auch in vielen anderen Anthocyanen aufgefunden werden können.

Was die Carotinoide anbetrifft, so lassen sie sich auf die vier Kohlenwasserstoffe Lycopin,  $\gamma$ -Carotin,  $\beta$ -Carotin und  $\alpha$ -Carotin zurückführen, und diese Kohlenwasserstoffe stehen unter sich selbst in engster konstitutioneller Beziehung.  $\gamma$ -Carotin ist ein Monocyclisierungsprodukt,  $\beta$ - und  $\alpha$ -Carotin sind Dicyclisierungsprodukte des Lycopins.



Die meisten anderen, bis heute konstitutionell aufgeklärten Carotinoide lassen sich als Hydroxyl-, Methoxyl- oder Keto-Derivate dieser Grundtypen formulieren.

So leiten sich vom Lycopin ab:

Lycoxanthin<sup>1)</sup> = 3-Oxy-lycopin

Lycophyll<sup>1)</sup> = 3,3'-Dioxy-lycopin.

Ein weiteres Lycopinderivat liegt im Rhodoviolascin vor, einem Carotinoid aus Purpurbakterien. Es enthält 2 Methoxylgruppen, deren Stellungen in der Molekel noch nicht festgesetzt sind und ist das einzige bis heute bekannte Carotinoid, in welchem OCH<sub>3</sub>-Gruppen nachgewiesen wurden.

<sup>1)</sup> Formel nach L. Zechmeister.

Vom  $\gamma$ -Carotin kann Rubixanthin<sup>1)</sup> = 3-Oxy- $\gamma$ -carotin abgeleitet werden.

Zahlreich trifft man unter den natürlichen Carotinoiden Derivate des  $\beta$ -Carotins an, so

- Kryptoxanthin<sup>1)</sup> = 3-Oxy- $\beta$ -carotin  
 Zeaxanthin = 3,3'-Dioxy- $\beta$ -carotin  
 Rhodoxanthin<sup>1)</sup> = 3,3'-Diketo-4,4'-dehydro- $\beta$ -carotin  
 Astacin = 3,4,3',4'-Tetraketo- $\beta$ -carotin  
 Euglenarhodon<sup>2)</sup> = 2,4,2',4'-Tetraketo- $\beta$ -carotin (?).

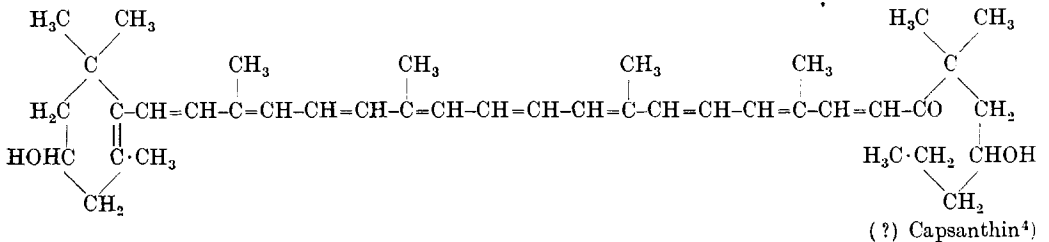
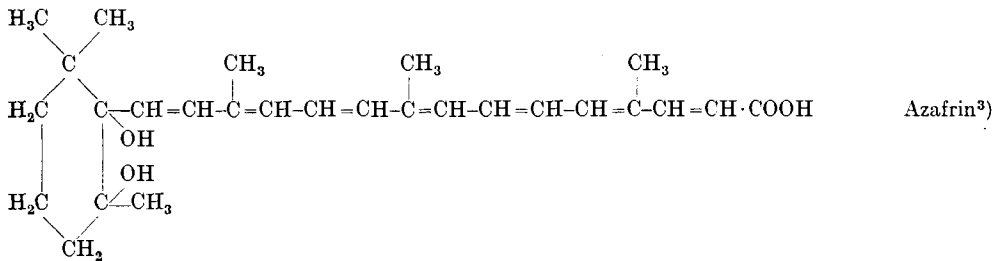
Als ein Hydroxylderivat des  $\alpha$ -Carotins ist das Xanthophyll, d. h. 3,3'-Dioxy- $\alpha$ -carotin, zu betrachten.

Schliesslich konnten verschiedene Carotinoide konstitutionell aufgeklärt werden, die sich als Abbauprodukte anderer Carotinoide betrachten lassen, nämlich:

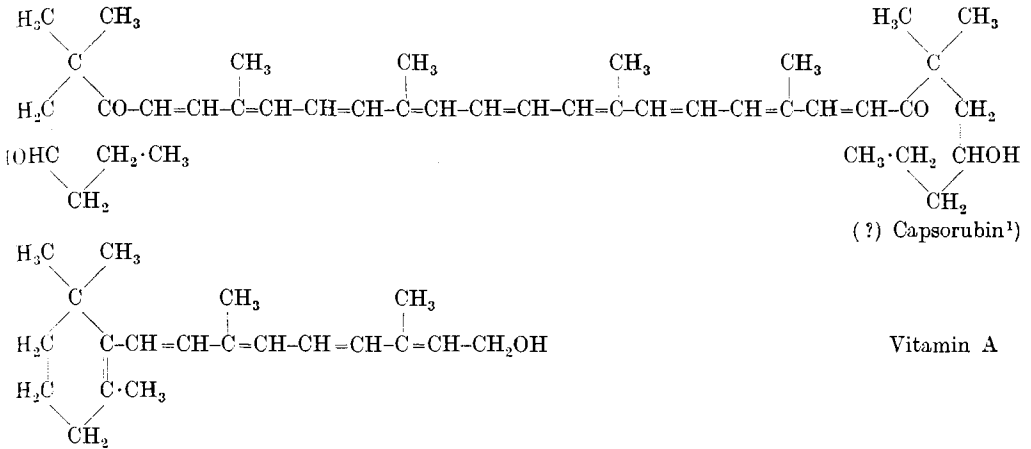
Crocetin, eine Dicarbonsäure, die durch oxydative Spaltung zwischen den C-Atomen 7,8 und 7',8' entstanden sein kann,

Bixin, eine Dicarbonsäure, die aus Lycopin durch Oxydation zwischen den C-Atomen 5,6 sowie 5',6' hervorgeht,

Azafrin, Capsanthin, Capsorubin, Vitamin A.



1) Formel nach R. Kuhn.  
 2) Formel nach S. Fischer.  
 3) Formel nach R. Kuhn und Mitarbeitern.  
 4) Formel nach Zechmeister und Mitarbeitern.



Vitamin A

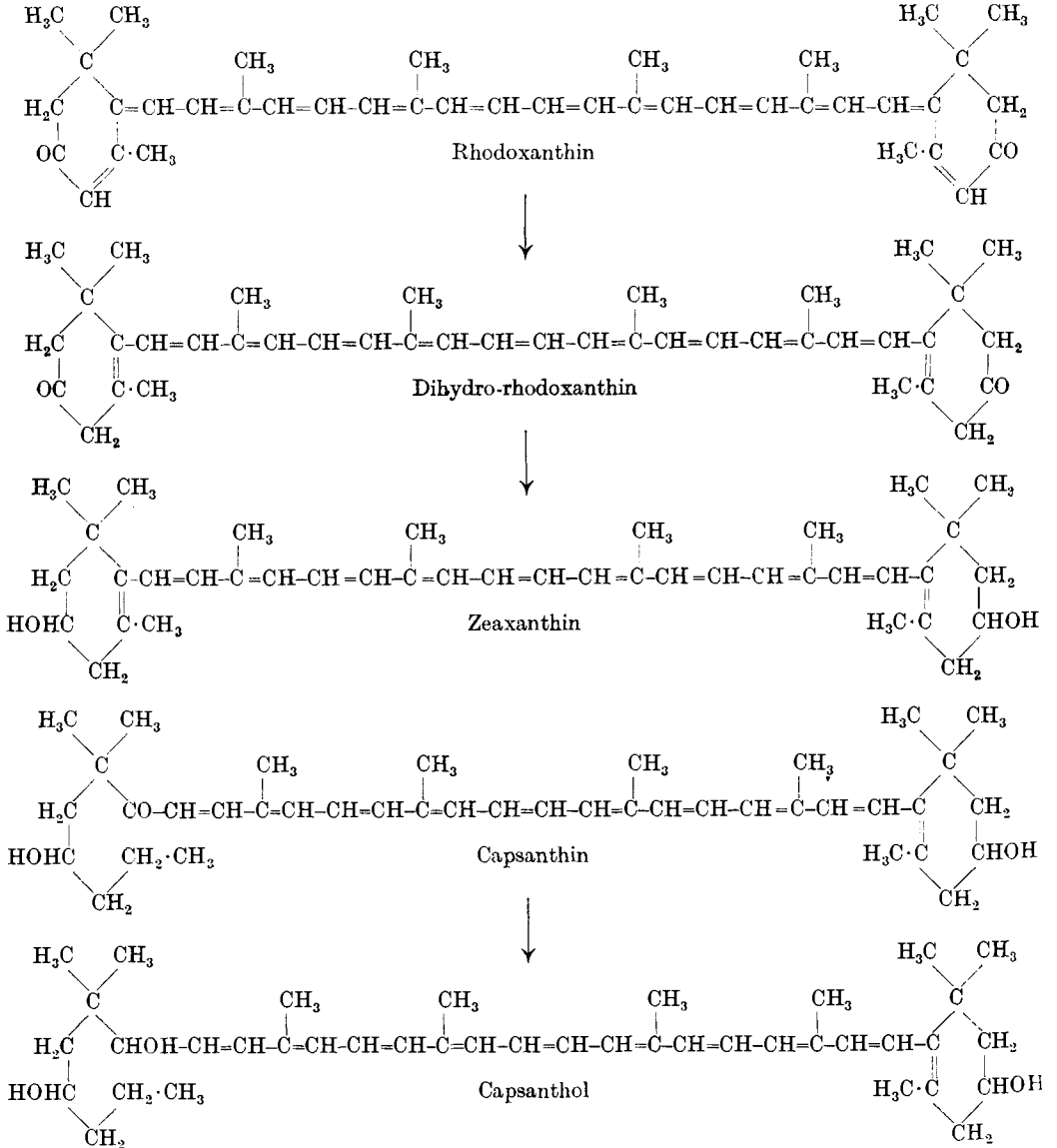
Bei dieser ausserordentlich nahen Verwandtschaft aller dieser Pigmente ist die Auffassung gewiss nicht unberechtigt, dass viele Carotinoide durch genetische Beziehungen verknüpft sind und in der pflanzlichen oder tierischen Zelle ineinander verwandelt werden können. Direkte Beweise dafür konnten bisher allerdings nur spärlich erbracht werden. Gesichert ist z. B. der Nachweis, dass  $\beta$ -Carotin,  $\alpha$ -Carotin,  $\gamma$ -Carotin und Kryptoxanthin im Tierkörper in Vitamin A verwandelt werden; ferner erscheint es im höchsten Grade wahrscheinlich, dass die Crustaceen und andere Tiere, welche Astacin führen, dieses Pigment aus anderen Carotinoiden ( $\beta$ -Carotin, Zeaxanthin, Xanthophyll usw.), die sie durch die Nahrung aufnehmen, bilden. Sowohl bei der Vitamin-A- wie bei der Astacin-Bildung müssen oxydative Prozesse vor sich gehen; sie in vitro nachzuahmen, ist bisher nicht gelungen. Dagegen war es möglich, durch Reduktionsvorgänge in bisher zwei Fällen Carotinoide in andere zu verwandeln. Es gelang nämlich, mittelst Aluminium-isopropylat Rhodoxanthin über Dihydro-rhodoxanthin zu Zeaxanthin zu reduzieren und Capsanthin in Capsanthol überzuführen; letztere Verbindung ist zwar in der Natur noch nicht nachgewiesen worden, doch wird sie wohl noch eines Tages gefunden werden.

Die Verbreitung der Carotinoide im Tier- und Pflanzenreich ist eine überaus weite; wir dürfen diese Pigmente als ubiquitär bezeichnen. Seitdem man ihre Trennungsmethoden vervollkommen hat, wurde man auch gewahr, dass sozusagen nie ein einzelnes Carotinoid in einem Organismus auftritt, sondern dass immer mehrere dieser Farbstoffe zusammen vorkommen. Ein Beispiel, das die grosse Mannigfaltigkeit der Carotinoid-skala in einem einzelnen Lebewesen eindrücklich belegt, sind die Purpurbakterien. So fand man in Rhodovibriobakterien nicht weniger als 5 Pigmente vom

<sup>1)</sup> Formel nach Zechmeister und Mitarbeitern.

Coratinoide Typus, und es ist möglich, dass man damit noch nicht alle erfasst hat:

Rhodoviolascin  $C_{42}H_{60}O_2$   
 Rhodopin  
 Rhodopurpurin  
 Rhodovibrin  
 Flavorhodin.



Die Trennung solcher komplexer Mischungen ist selbst unter Anwendung der Chromatographie recht schwierig.

Die ca. 30 Carotinoide, die bis heute isoliert und grösstenteils analysiert wurden, absorbieren das Licht ungefähr über einen Spektralbereich von 150 m $\mu$ . Bekanntlich weisen die Absorptionsspektren der meisten Carotinoide drei scharfe Maxima auf, selten (z. B. beim Astacin) ist eine einzige breite Bande ausgebildet. In Schwefelkohlenstoff liegen die Absorptionsmaxima der näher bekannten Pigmente wie folgt:

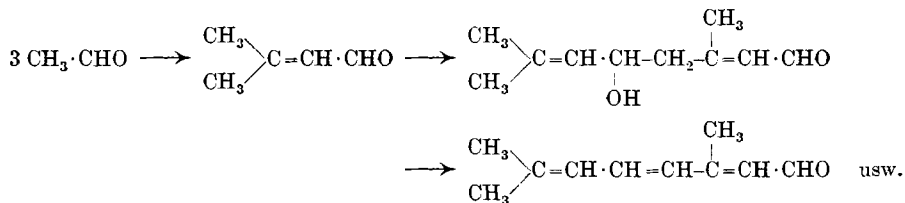
	1. Bande m $\mu$	2. Bande m $\mu$	3. Bande m $\mu$	Anzahl der $\bar{\nu}$ .	Anzahl der C=O
Rhodoviolascin . . .	573,5	534	496	13	
Rhodoxanthin . . .	564	525	491	12	2
Rhodovibrin . . .	556	517			
Rhodopurpurin . . .	550	511	479		
Astacin . . . . .	ca. 550	bis 450	(Max. 500)	11	4
Euglenarhodon . . .	ca. 550	bis 450	(Max. 505)	11	4
Lycopin . . . . .	548	507,5	477	13	
Rhodopin . . . . .	547	508	478	12	
Capsanthin . . . . .	542	503		10	1
Capsorubin . . . . .	541	503	468	9	2
$\gamma$ -Carotin . . . . .	533,5	496	463	12	
Rubixanthin . . . . .	533	494	461	12	
Bixin . . . . .	523,5	489	457	9	2
$\beta$ -Carotin . . . . .	521	485	450	11	
Echinenon . . . . .	520	488	450		
Kryptoxanthin . . .	518	483	453	11	
Pectenoxanthin . . .	518	488	454		
Zeaxanthin . . . . .	517	482	450	11	
Sulcatoxin . . . . .	516	482	450		
Antheraxanthin . . .	512,5	481	448		
Fucoxanthin . . . . .	510	477	445	10	
$\alpha$ -Carotin . . . . .	509	477		11	
Xanthophyll . . . . .	508	475	445	11	
Pentaxanthin . . . . .	506	474	444		
Flavorhodin . . . . .	502	472			
Taraxanthin . . . . .	501	469	440	11(?)	
Violaxanthin . . . . .	500,5	469	440	10	
Azafrin . . . . .	486	457		7	1
Crocetin . . . . .	482	453		7	2
Flavoxanthin . . . . .	478	447,5	420	11	

Das langwelligste Absorptionsmaximum in der vorstehenden Tabelle liegt somit bei 573 m $\mu$ , das kurzwelligste bei 420 m $\mu$ . In Öl sind alle diese Absorptionsspektren etwas in der Richtung der kürzeren Wellenlängen verschoben. So hat z. B. Rhodoviolascin in

Olivenöl die Absorptionsbanden 540, 505, 480 m $\mu$ . Da die Carotinoide in der Zelle meistens in Fetten und Ölen eingebettet sind, so kommen wir den natürlichen Verhältnissen am nächsten, wenn wir die Absorptionsspektren in Ölen zum Vergleich heranziehen. In diesem Lösungsmittel ziehen sie sich also etwa über den Spektralbereich 540—400 m $\mu$  hin.

In der Aufklärung der Bedeutung der Carotinoide für Pflanze und Tier hat die Forschung mit der Ermittlung ihrer Konstitution nicht ganz Schritt halten können. Wohl wissen wir aus Untersuchungen, die insbesondere auf *Th. Moore* und *H. v. Euler* zurückgehen, dass  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -Carotin sowie Kryptoxanthin Provitamine des Vitamins A sind und damit für die Entwicklung von Mensch und Tier fundamentale Bedeutung besitzen; aber es fehlen bis heute alle Anhaltspunkte dafür, dass der Organismus mancher Tiere auch andere Carotinoide anreichert. Warum werden im Fettgewebe von Pferd und Kuh nur Polyen-Kohlenwasserstoffe (Carotine) gespeichert, die Polyen-alkohole abgelehnt, während Geflügel sich gerade umgekehrt verhält und der Mensch sowohl die Polyen-kohlenwasserstoffe wie die Polyen-alkohole in seinem Depotfett ablagert? — Ebenso wenig wissen wir über die Bedeutung der Carotinoide für die Pflanze. Dass manche von ihnen in weiterem Sinn am Komplex der Assimilationsreaktionen irgendwie teilnehmen, vielleicht als Stapler der zugeführten Lichtenergie, halte ich für höchst wahrscheinlich; denn es gibt kein assimilierendes Organ, das nicht verhältnismässig reich an Carotinoiden ist. Nicht nur das grüne Blatt, in welchem Chlorophyll, Carotin und Xanthophyll in einem ziemlich konstanten Verhältnis stehen, ist ein Beispiel dafür; auch die assimilierenden Purpurbakterien sind, wie schon hervorgehoben wurde, durch ungemeinen Carotinoidreichtum ausgezeichnet und sie bilden diese Pigmente nur, wenn ihnen reichlich Licht zugeführt wird.

Bei den künstlichen Züchtungen dienen den Rhodovibriobakterien als einzige Kohlenstoffnahrung Äpfelsäure und Asparagin. Daraus bauen sie ihre ganze Körpersubstanz inklusive die Carotinoide auf. Man wird annehmen müssen, dass dies auf dem Umweg über Acetaldehyd als Dehydrierungsprodukt der Asparaginsäure und Äpfelsäure geschieht; aus letzterem dürfte, nach *v. Euler* und *Klussmann*, vielleicht über  $\beta$ -Methyl-crotonaldehyd<sup>1)</sup>, der Aufbau der Carotinoide stattfinden:



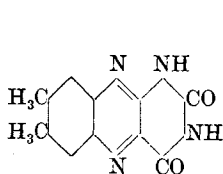
<sup>1)</sup> *H. v. Euler* und *Klussmann*.



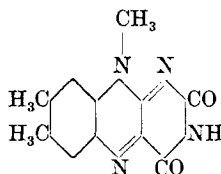
Während die Gruppe der Carotinoide, wie eben gezeigt wurde, ihre Mannigfaltigkeit ganz der Natur verdankt und der Chemiker zu ihrem Ausbau bisher recht wenig beitragen konnte, liegen die Verhältnisse bei den Flavinen gerade umgekehrt. Das von *Warburg* und *Christian* als Bestandteil des gelben Oxydationsfermentes entdeckte und von *Kuhn* und *Györgi* erstmals krystallisiert gewonnene Lactoflavin ist bis heute das einzige in der Natur nachgewiesene Pigment dieser Verbindungsklasse geblieben. Die aus Leber, Eiweiss, Eidotter, Niere, Malz, Löwenzahnblüten, Gras und aus der Retina von Fischeaugen isolierten, krystallisierten Flavinpräparate sind mit Lactoflavin identisch. Wollte man die Gruppe der Flavine eingehender erforschen, so konnte dies also nur durch künstlichen Ausbau erfolgen. Erfreulicherweise ist dies mit Erfolg möglich gewesen.

Bevor ich darauf eintrete, möchte ich vorerst ganz kurz die Gesichtspunkte zusammenfassen, die zur Aufstellung einer Konstitutionsformel des Lactoflavins führten.

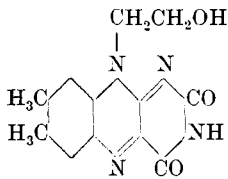
Bei der Belichtung alkalischer Flavinlösungen bildet sich nach *Warburg* und *Christian* Lumiflavin; wird die Belichtung dagegen bei neutraler Reaktion, am besten in verdünntem Methanol vorgenommen, so entsteht ein anderes Spaltstück, das Lumichrom, das auch bei der alkalischen Photolyse als Nebenprodukt auftritt. Letzteres erwies sich auf Grund der Analyse und übrigen Eigenschaften, unter denen die sehr charakteristische himmelblaue Fluorescenz erwähnt sei, identisch mit 6,7-Dimethyl-alloxazin (I). Ferner wurde festgestellt, dass Lumiflavin, für welches *Kuhn* durch Synthese die Formel des 6,7,9-Trimethyl-iso-alloxazins (II) bewiesen hatte, durch Licht in neutraler Lösung nicht in Lumichrom übergeführt wird; dagegen traf das für das künstlich dargestellte 9-Oxyäthyl-iso-alloxazin (III) zu. Daraus musste die Schlussfolgerung gezogen werden, dass der Lumichromabbau die Anwesenheit von OH-Gruppen in der in Stellung 9 des Flavins befindlichen Seitenkette zur Voraussetzung hat und so konnte man es wagen, die 4 im Lactoflavin nachgewiesenen OH-Gruppen in diese Seitenkette in 9-Stellung zu verlegen und dem Lactoflavin die Formel IV zuzuerteilen. Diese hat später durch die Synthese ihre Bestätigung gefunden.



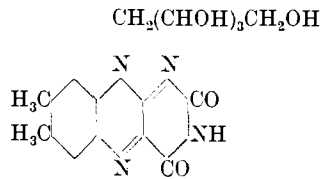
Lumichrom (I)



Lumiflavin (II)



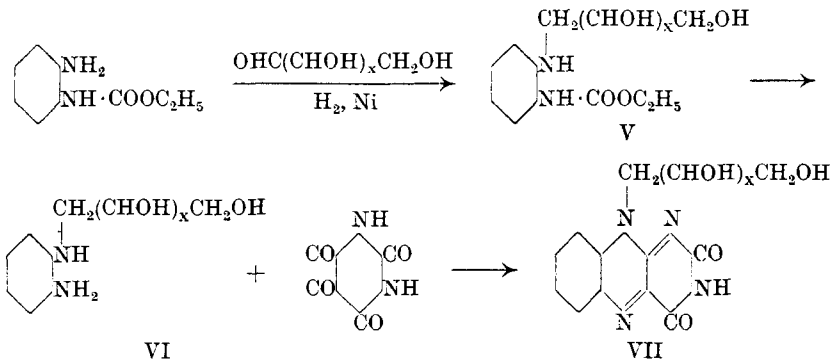
9-Oxyäthyl-6,7-dimethyl-iso-alloxazin (III)



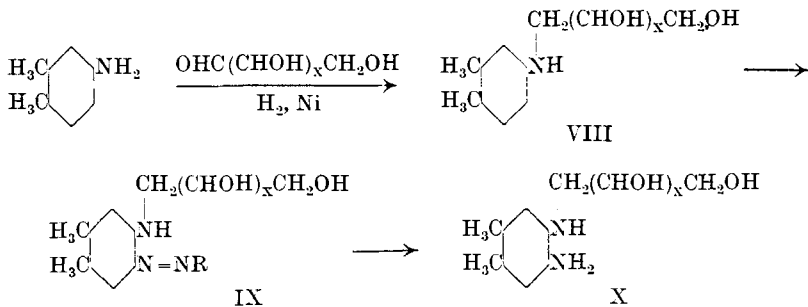
Lactoflavin (IV)

Für die Synthese von Flavinen sind folgende Verfahren ausgearbeitet worden:

1. Gleichzeitige Reduktion von Zuckern mit Mono-carbäthoxyderivaten aromatischer *o*-Diamine, Verseifung der entstandenen Kondensationsprodukte V zu den *o*-Amino-phenyl-derivaten von Amino-poly-alkoholen (VI) und Kondensation der letzteren mit Alloxan zum Flavin VII.

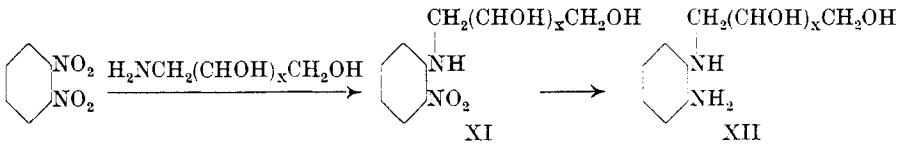


2. Reduzierende Kondensation von 3,4-Dialkyl-anilinen mit Zuckern zu 3,4-Dialkyl-phenyl-amino-poly-alkoholen VIII, Kuppelung der letzteren mit Diazoniumsalzen zu Azofarbstoffen IX, Reduktion derselben zu den *o*-Diamino-benzol-derivaten X und Umsatz der letzteren mit Alloxan zu Flavin.



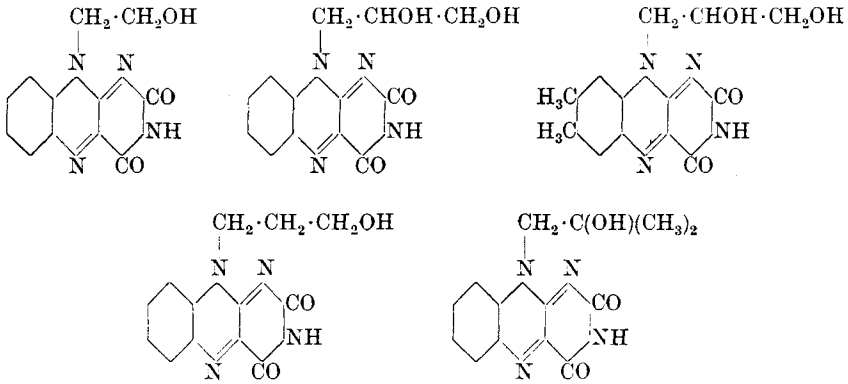
3. Umsatz von Amino-poly-alkoholen mit *o*-Dinitrobenzol oder dessen Alkylverbindungen zu Kondensationsverbindungen XI; diese

liefern bei der Reduktion die für die Flavinsynthese notwendigen *o*-Aminophenyl-derivate der Amino-poly-alkohole (XII). Dieses Verfahren gibt, trotz seiner Einfachheit in formaler Hinsicht, die ungünstigsten Resultate.

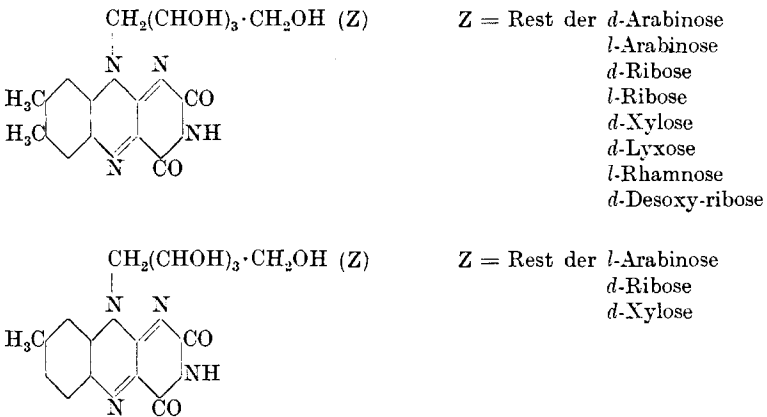


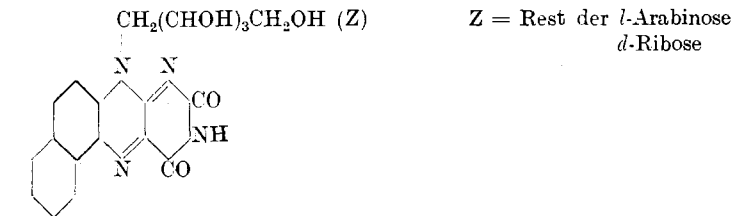
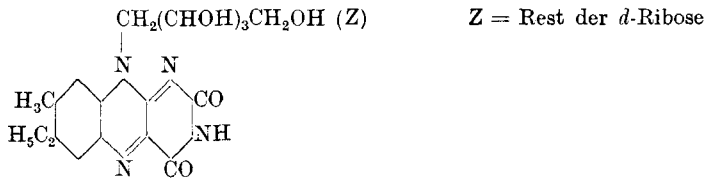
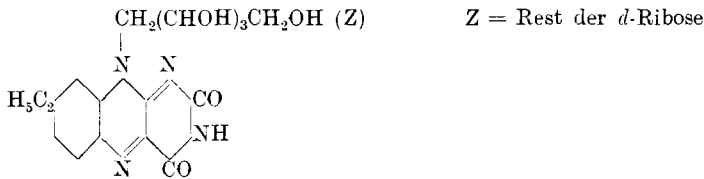
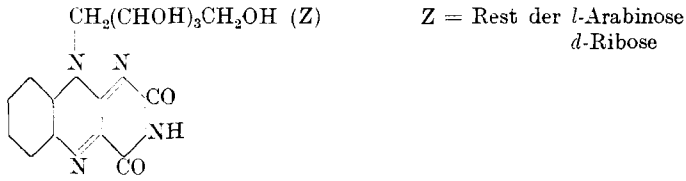
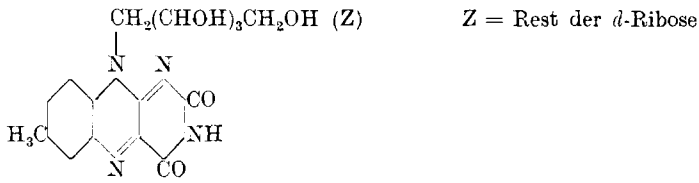
Nach diesen Methoden sind bisher die folgenden Flavine künstlich erhalten worden:

a) mit Seitenketten in 9-Stellung, die weniger als 5 C-Atome enthalten:

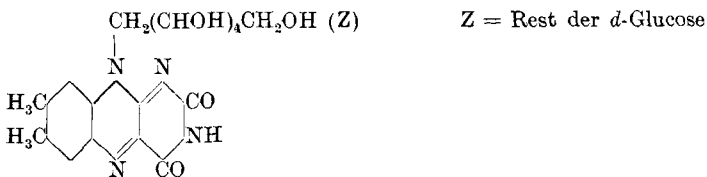
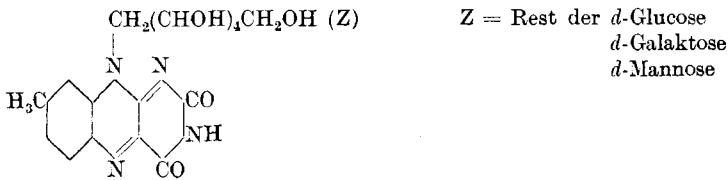


b) die Seitenketten leiten sich von Pentosen, Methylpentosen und Desoxy-pentosen ab.





c) die Seitenketten leiten sich von Hexosen ab.



Die physiologische Untersuchung dieser Verbindungen, die alle im Laboratorium *H. v. Euler's* auf Vitamin B<sub>2</sub>-Wirkung geprüft wurden, ergab bei folgenden Substanzen ausgesprochene Vitaminwirkung:

- 6,7-Dimethyl-9-*d*-ribityl-iso-alloxazin
- 6,7-Dimethyl-9-*d*-arabityl-iso-alloxazin
- 7-Monomethyl-9-*d*-ribityl-iso-alloxazin
- 6-Monomethyl-9-*d*-ribityl-iso-alloxazin
- 6-Äthyl-7-methyl-9-*d*-ribityl-iso-alloxazin

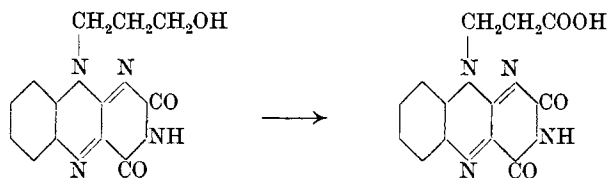
Stimulierend wirken, ohne das Wachstum andauernd zu unterhalten:

- 6,7-Dimethyl-9-*l*-arabityl-iso-alloxazin
- 7-Methyl-9-*d*-sorbityl-iso-alloxazin
- 7-Äthyl-9-*d*-ribityl-iso-alloxazin.

6,7-Dimethyl-9-*d*-ribityl-iso-alloxazin ist nach Schmelzpunkt, Mischschmelzpunkt, Schmelzpunkt des Tetracetats, Löslichkeit, spezifischer Drehung und physiologischer Wirksamkeit mit Lactoflavin identisch.

Dank des synthetischen Ausbaus gehört die Gruppe der Flavine also heute bereits zu den gut durchforschten Verbindungsklassen. Es ist einigermaßen überraschend, dass trotz der Beschränkung der Natur auf ein einziges Flavin, die Konstitutionsspezifität in dieser Gruppe nicht allzu scharf ausgeprägt ist. Wie die vorstehende Zusammenstellung zeigte, kommt ausser dem 6,7-Dimethyl-9-*d*-ribityl-iso-alloxazin noch verschiedenen anderen Flavinen biologische Wirksamkeit zu, aber die natürliche Verbindung, Lactoflavin, wird darin von keinem der verwandten Pigmente übertroffen.

Die ausserordentlich grosse Lichtempfindlichkeit ist allen Flavinen mit Hydroxylgruppen eigen. Der Lichtabbau setzt ein mit Dehydrierungsvorgängen in der aliphatischen Seitenkette der Farbstoffe; als Acceptor für den abgegebenen Wasserstoff kann sowohl der Sauerstoff der Luft, oder, unter anaëroben Bedingungen, eine andere Flavinmolekel dienen, die dabei in Leukoflavin übergeht. Es ist in wenigen Fällen gelungen, primäre Dehydrierungsprodukte zu fassen: aus 3'-Oxy-propyl-iso-alloxazin liess sich als Belichtungsprodukt Iso-alloxazin-9-propionsäure bzw. deren Methylester isolieren:

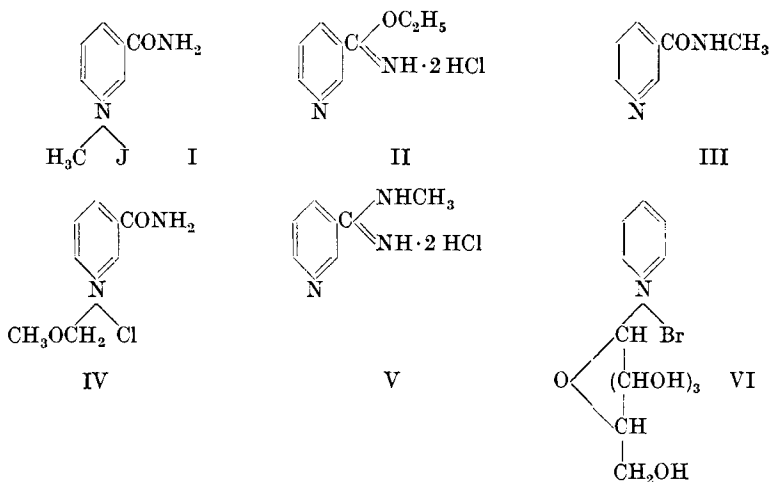


Die physiologische Bedeutung des Lactoflavins beruht nach den Untersuchungen von *Warburg* und seiner Schule zunächst auf der Fähigkeit, Wasserstoff zu übertragen. Vielleicht fallen ihm im Körper noch andere Funktionen zu; *H. v. Euler* denkt an das Transponieren kurzwelliger Strahlen in sichtbares Licht durch Lactoflavin im Auge.

Seine Funktion als Wasserstoffüberträger erfüllt Lactoflavin im Verband des sog. „gelben Oxydationsferments“ von *Warburg*, das sich nach *Theorell* aus einer Wirkungsgruppe, der Lactoflavin-phosphorsäure, und einem Eiweisskörper zusammensetzt. Der Lactoflavin-phosphorsäure wird der Wasserstoff von den hydrierten Formen zweier Cofermente, des wasserstoffübertragenden Coferments und der Cozymase, zugeführt, die nach *v. Euler* und *Warburg* aus Adenin, Nicotinsäure-amid, Zucker und Phosphorsäure bestehen.

Als wasserstoffübertragende Wirkungsgruppe im Coferment erkannte *Warburg* das Nicotinsäure-amid.

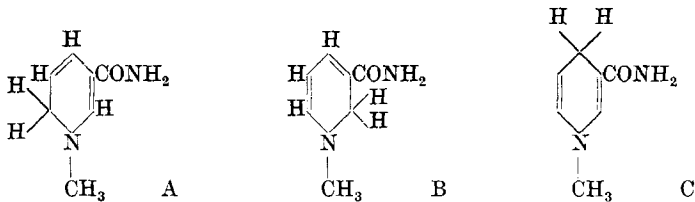
Um in die Art und Weise, wie diese Wasserstoffübertragung vor sich gehen könnte, Einblick zu erhalten, wurden Derivate des Nicotinsäure-amids und anderer Pyridinverbindungen als Modellsubstanzen hergestellt. Nicotinsäure-amid enthält drei funktionelle Gruppen: die beiden Stickstoffatome und den Amidstickstoff; diese drei Atome kamen somit allein für die Bindung einer der anderen im Coferment nachgewiesenen Komponenten in Frage. Es wurden daher als Modellsubstanzen verschiedene Alkylderivate des Nicotinsäure-amids dargestellt, welche die Alkylreste an den funktionellen Gruppen des Nicotinsäure-amids tragen, nämlich: Nicotinsäureamid-jodmethylat (I), Nicotinsäure-imidoäthyläther (II), Nicotinsäuremethylamid (III), Nicotinsäureamid-chlor-methoxymethylat (IV); ausserdem Nicotinsäure-N-methylamidin (V), da a priori noch die



Möglichkeit in Betracht zu ziehen war, dass das aus Coferment durch Hydrolyse entstandene Nicotinsäure-amid durch hydrolytische Spaltung aus einem Amidin hervorgegangen war; ausserdem wurde das vor Jahren in diesem Laboratorium hergestellte Glucosido-1-pyridiniumbromid als Vergleichssubstanz beigezogen.

O. Warburg stellte daraufhin fest, dass sich von den sechs untersuchten Substanzen nur die erste, Nicotinsäureamid-jodmethylat, beim Reduktionsversuch mit Natriumhyposulfit wie Coferment verhält. Sie wird ebenso schnell wie die Wirkungsgruppe des Coferments zu einer Substanz hydriert, die in ihren spektralen Eigenschaften mit der reduzierenden Wirkungsgruppe des Coferments übereinstimmt und wie letztere durch Säure momentan in eine zweite, inaktive Verbindung, mit kurzweiligerer Absorption übergeführt wird.

Wir haben daraufhin dieses primäre, reversible Reduktionsprodukt des Nicotinsäureamid-jodmethylats zu isolieren versucht und es in ca. 93-proz. Reinheitsgrad fassen können. Es ist ein gelbes Öl, also ein Pigment, und besitzt die Konstitution eines N-Methyl-ortho-dihydro-nicotinsäure-amids, für welches die beiden nachstehenden Formeln A und B in Betracht zu ziehen sind:



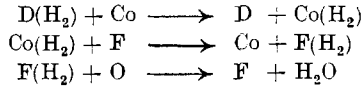
Die Verbindung gehört zu den stärksten Reduktionsmitteln. Silbernitrat, Methylenblau, Indigotetrasulfonat, Indigotrisulfonat und Indigodisulfonat werden schon in der Kälte momentan reduziert, ebenso Kaliumferricyanid, durch welches sie sich titrieren lässt.

Neben diesem ortho-Dihydroderivat entsteht bei der Hyposulfitreduktion des Nicotinsäureamid-jodmethylats eine kleine Menge (höchstens 10%) N-Methyl-para-dihydro-nicotinsäure-amid (Formel C). Diese Verbindung ist farblos, krystallisiert und ist ein viel schwächeres Reduktionsmittel; so spricht sie z. B. auf Kaliumferricyanid nicht an und reduziert Silbernitrat erst beim Kochen.

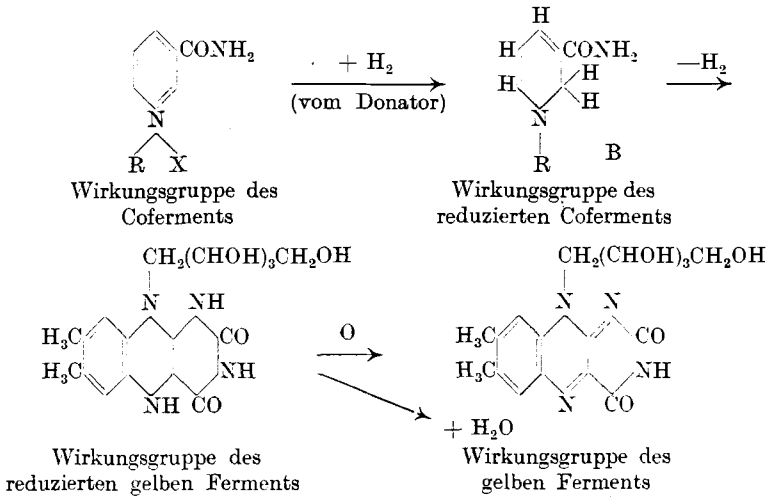
Aus diesen Feststellungen ergibt sich die Wahrscheinlichkeit, dass Nicotinsäure-amid im Coferment als quaternäres Salz gebunden ist und dass die reversible Hydrierbarkeit mit diesem besonderen Bindungszustand zusammenhängt. Das primäre Reduktionsprodukt, welches sich bei der Übernahme des Wasserstoffs vom Donator D bildet, wäre eine o-Dihydroverbindung (z. B. Formel B), welche

hierauf nach *Warburg* den Wasserstoff an das gelbe Ferment (Lactoflavin-phosphorsäure + Protein) weitergibt; am Hydrierungsprodukt des gelben Ferments findet schliesslich die Oxydation durch den Luftsauerstoff statt.

Die Dehydrierung eines Donators  $D(H_2)$  unter der Wirkung des Coferments (Co) und des gelben Oxydationsfermentes (F), die sich früher durch die Symbole



darstellen liess, kann heute, nach der Konstitutionsaufklärung des Lactoflavins und den gewonnenen Einblicken in die Bindungsweise des Nicotinsäure-amids im Coferment, schematisch wie folgt spezifiziert werden:



Wir sehen so das sogenannte Vitamin  $B_2$  die Funktion eines Enzyms erfüllen und erkennen darin die nahe Verbindung von Vitaminen und Fermenten, die auseinanderzuhalten in manchen Fällen kaum möglich und jedenfalls nicht notwendig zu sein scheint. Obwohl wir noch keine natürliche Avitaminose kennen, die auf den Mangel an Lactoflavin zurückzuführen ist, hat man doch in die Funktion dieses biologischen Faktors mehr Einblick als in diejenige anderer Vitamine erzielt.