

tion unterbrochen, das Reduktionsprodukt möglichst schnell abgesaugt, mit 5 cm³ eiskaltem Methanol gewaschen und zweimal aus wenig heissem Methanol umkrystallisiert (Abkühlung in Kältemischung). Alle Operationen müssen wegen der Zersetzlichkeit der Verbindung möglichst schnell ausgeführt werden. Smp. 82°. Ausbeute 0,7 g. Die Lösung der Verbindung in Methanol fluoresciert nicht wesentlich.

C₁₂H₁₃ON Ber. C 76,98 H 6,95%
 (137,1) Gef. „ 76,54; 77,24 „ 6,63; 6,60%

Potentiometrische Titration:

- a) 10,1 mg Subst. verbrauchten 1,082 cm³ 0,1-n. K₃[Fe(CN)₆]-Lsg.
 b) 10,06 mg Subst. verbrauchten 1,063 cm³ 0,1-n. K₃[Fe(CN)₆]-Lsg.
 Berechnet für 2 Äquivalente: a) 1,080 cm³ Kaliumferricyanidlsg.
 b) 1,076 cm³ Kaliumferricyanidlsg.

Reduktionspotential:

Eine Lösung von 0,0200 g Substanz in 24 cm³ absolutem Alkohol + 1 cm³ 0,1-n. wässriger Natronlauge erzeugte auf einer blanken Platinelektrode bei 20° ein Potential von -0,128 Volt gegen n-Wasserstoffelektrode (Mittelwert von 3 Bestimmungen); in rein wässriger Lösung scheint es negativer zu liegen.

Weiterhin dienten uns zur Prüfung die Redoxindikatoren:

- | | |
|---|--------|
| 1. Neutralrot E _h (p _H = 7,0) | -0,3 |
| 2. Indigo-disulfonat | -0,125 |
| 3. Indigo-trisulfonat | -0,081 |
| 4. Indigo-tetrasulfonat | -0,046 |
| 5. Methylenblau | +0,011 |
| 6. o-Kresol-indophenol | +0,195 |
| 7. o-Chlorphenol-indophenol | +0,233 |

Von obigen Indikatoren wurden Lösungen von je 10 mg in 10 cm³ Wasser hergestellt. Hierauf brachte man je 1,5 cm³ Indikatorlösung, 1 cm³ Pufferlösung (p_H 7 bzw. p_H 10) und 3 mg p-Methoxyphenyl-o-dihydro-pyridin in 1 cm³ absolutem Alkohol in *Thunberg*-Röhren und evakuierte. Die Indikatoren 6 und 7 wurden momentan, 3 bis 5 ziemlich schnell, 2 nur im Vakuum und bei p_H 10 vollständiger als bei p_H 7 reduziert. Neutralrot liess sich durch die Substanz nicht in den Leukokörper überführen.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

7. Zur Konstitution der Lactoflavin-phosphorsäure aus Leber

von P. Karrer, P. Frei und H. Meerwein.

(18. XII. 36)

Flavin-phosphorsäure, welche *H. Theorell*¹⁾ aus Hefe darstellte, lässt sich auch, wie wir früher zeigten, aus Leber gewinnen²⁾. Unsere damaligen Präparate waren allerdings nicht rein. Seither

¹⁾ Bioch. Z. 275, 37, 344 (1935).

²⁾ Helv. 18, 1022 (1935).

haben wir die Extraktionsmethode verbessert, so dass es heute keine besonderen Schwierigkeiten bereitet, Flavin-phosphorsäure aus Leberpulver decigrammweise darzustellen.

Solche Präparate besitzen meistens einen Phosphorgehalt von 5,3—6,3 %, und ihr Stickstoffgehalt liegt bei 12—13,5 %. Für ein normales Calciumsalz der Lactoflavin-phosphorsäure $C_{17}H_{19}O_9N_4PCa$ berechnen sich 6,3 % P und 11,3 % N. *H. Theorell* fand in seinem lactoflavin-phosphorsauren Calcium aus Hefe 5,3 % P und 11,2 % N, also Werte, die sowohl der Theorie wie den unsrigen Zahlen sehr nahe kommen. Als wir aber in unserem lactoflavin-phosphorsauren Calcium aus Leber gleichzeitig Kohlenstoff und Calcium ermittelten, wurden Werte erhalten, die sich mit der Formel $C_{17}H_{19}O_9N_4PCa$ nicht vereinbaren liessen, nämlich ca. 25—26 % C statt 41,27 % C und ca. 21,2 % Ca gegenüber 8,1 % der Theorie. Daraus folgte, dass die Präparate ausser lactoflavin-phosphorsaurem Calcium noch eine weitere, sehr stickstoffreiche Komponente enthalten mussten, welche bei allen Adsorptionsprozessen (Adsorption an Fullererde und zweimalige Adsorption an Bleisulfid) die Flavin-phosphorsäure begleitete.

Diese zweite Substanz hat sich als ein Adenin-nucleotid erwiesen. Adenin haben wir daraus nach der Hydrolyse als Pikrat isoliert. Nach der colorimetrischen Bestimmung¹⁾ enthalten unsere Präparate ca. 40 % Lactoflavin-phosphorsäure; der hohe Calciumgehalt der Präparate dürfte darauf beruhen, dass nicht Calciumsalze der Summenformel $C_{17}H_{19}O_9N_4PCa$ bzw. $C_{10}H_{14}O_8N_5PCa$ vorliegen, sondern Calcium-reichere Niederschläge. Freies Lactoflavin sowie anorganisches Phosphat waren in unsern aus Leber gewonnenen Präparaten nicht vorhanden.

Bisher ist uns die Befreiung der Lactoflavin-phosphorsäure von der Adenylsäure nicht gelungen. Trotzdem möchten wir nicht annehmen, dass zwischen den beiden Substanzen eine chemische Verbindung besteht — obwohl dies nicht ganz ausgeschlossen erscheint — wir werden uns im Gegenteil weiter um ihre Trennung bemühen. Durch die für Flavine gebräuchlichsten Adsorptionsmittel gelingt dies nicht, und so ist anzunehmen, dass auch die aus Muskelgewebe (Herzmuskel²⁾ usw.) bisher dargestellten Präparate das Nucleotid enthielten. Ob dies ebenso für die aus Hefe dargestellte Lactoflavin-phosphorsäure gilt, ist ungewiss, da dort die Verhältnisse anders liegen können. *H. Theorell* hat in seinen Präparaten seinerzeit nur Phosphor und Stickstoff bestimmt, und diese Werte weichen von denjenigen, die wir bei der Analyse der Adenylsäure-haltigen Lactoflavin-phosphorsäure aus Leber erhielten, wenig ab.

¹⁾ Überführung in Lumiflavin und Bestimmung des letzteren.

²⁾ *I. Banga* und *A. v. Szent-Györgyi*, *Bioch. Z.* **246**, 203 (1932); *R. Kuhn*, *H. Rudy*, *F. Weygand*, *B.* **69**, 1543 (1936).

Trotz der Uneinheitlichkeit der Lactoflavin-phosphorsäurepräparate aus Leber waren sie doch geeignet, die Frage nach der Stellung der Phosphorsäure im Zuckerrest zu beantworten. Wir haben kürzlich gezeigt¹⁾, dass Perjodsäure aus Hexose-6-phosphorsäure und Pentose-5-phosphorsäure unter geeigneten Reaktionsbedingungen keinen Formaldehyd abspaltet, während solcher aus Pentose-3-phosphorsäure, wie erwartet, entsteht. Unsere Flavin-phosphorsäurepräparate aus Leber, mit 40% Flavinegehalt, bilden bei der Oxydation mit Perjodsäure keine Spur Formaldehyd. Damit ist bewiesen, dass sie Lactoflavin-frei sind und ferner dass der Phosphorsäurerest nicht in den Stellungen 2' oder 3' sitzt; in Frage kommen nur die Stellungen 4' und 5', von denen die letztere natürlich viel wahrscheinlicher erscheint. Auch die Adenylsäure des tierischen Organismus — die, wie wir eben sahen, die Lactoflavin-phosphorsäure bei der Isolierung begleitet — ist bekanntlich ein 5-Phosphorsäure-ester.

Ob Flavin-phosphorsäure aus Hefe ebenfalls Lactoflavin-5'-phosphorsäure ist, erscheint wahrscheinlich, ist aber keineswegs sicher; z. B. unterscheidet sich die Adenylsäure der Hefe (Adenosin-3-phosphorsäure-ester), wie man aus den Untersuchungen *Levene's* weiss, von der Muskeladenylsäure durch die Stellung des Phosphatrestes.

R. Kuhn und *H. Rudy*²⁾ haben die natürliche Lactoflavin-phosphorsäure aus Herzmuskel und aus Hefe kürzlich als Lactoflavin-5'-phosphorsäure-ester angesprochen, weil sie mit einem synthetischen, über die Tritylverbindung des Lactoflavins dargestellten Phosphorsäure-ester in der Löslichkeit der Salze, im Adsorptionsvermögen (Frankonit u. a.), in der p_H -Abhängigkeit der Fluoreszenz, im Reduktions-Oxydationspotential, in der Wachstumswirkung an B_2 -frei ernährten Ratten und in der Kupplungsfähigkeit mit dem kolloiden Träger zum gelben Ferment übereinstimmt. Wir haben uns in Dutzenden von Versuchen bemüht, die synthetische Lactoflavin-phosphorsäure rein zu erhalten, was uns aber bisher nicht gelungen ist; die Zusammensetzung der Präparate war im Gegenteil stets Schwankungen unterworfen und entsprach nicht derjenigen eines einfachen Calciumsalzes einer Lactoflavin-monophosphorsäure. Es ist anzunehmen, dass die genannten Autoren ähnlichen Schwierigkeiten begegneten, da sie über ihre Verbindung keine Analysenzahlen veröffentlichten (wohl aber für die phosphorfreien Zwischenprodukte). — Andererseits sind die aus tierischen Organen bisher dargestellten Lactoflavin-phosphorsäurepräparate sicher ebenfalls noch nicht einheitlich. Dass unter diesen Umständen weder die

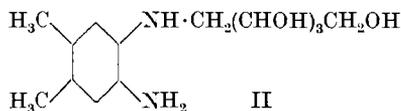
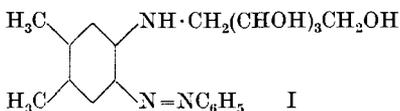
¹⁾ Helv. 19, 1060 (1936).

²⁾ *Kuhn, Rudy, Weygand*, B. 69, 1543 (1936); *Kuhn, Rudy*, B. 69, 1974 (1936).

Löslichkeit der Salze noch das adsorptive Verhalten zur Identifizierung der synthetischen mit den natürlichen Präparaten benutzt werden können, ist verständlich; andererseits könnte eine gleichartige Wachstumswirkung und Kupplungsfähigkeit mit dem kolloiden Träger nur dann als Beweis für die Identität der natürlichen Lactoflavin-phosphorsäure mit Lactoflavin-5'-phosphorsäure angesehen werden, wenn nachgewiesen wäre, dass sich Lactoflavin-phosphorsäuren mit anderen Stellungen des Phosphatrestes in dieser Hinsicht anders verhalten. Darüber liegen aber bisher keine Erfahrungen vor, und eine wesentliche Verschiedenheit ist, zum mindesten was die Zuwachswirkung anbetrifft, auch nicht sehr wahrscheinlich.

Der Beweis, dass Lactoflavin-phosphorsäure aus Leber bzw. tierischem Ausgangsmaterial die Phosphorsäuregruppe in 5'-(oder evtl. 4')-Stellung enthält, liegt aber in den oben mitgeteilten Ergebnissen des Abbaus durch Perjodsäure.

Mit der Darstellung synthetischer Lactoflavin-phosphorsäurepräparate hatten wir uns schon vor Jahren beschäftigt¹⁾. Neuerdings wurde ein modifiziertes Verfahren eingeschlagen, das darin besteht, dass man den Azofarbstoff I, welcher bei der Lactoflavinsynthese von *P. Karrer* und *H. F. Meerwein*²⁾ als Zwischenprodukt entsteht, in Pyridin mit Phosphoroxychlorid phosphoryliert, nachher zum Phosphorsäure-ester von II reduziert und letzteren mit Alloxan in das phosphorylierte Lactoflavin überführt.



Man erhält hierbei Lactoflavin-phosphorsäurepräparate, die ungefähr ähnliche Zusammensetzung haben wie die durch direkte Phosphorylierung des Lactoflavins oder seiner 2',3',4'-Triacetylverbindung gewonnenen und die nach Mitteilung von Herrn *H. Theorell*, dem wir für die Ausführung des Kupplungsversuches danken, auch Kupplungsfähigkeit mit dem kolloiden Träger zeigen.

Experimentelle Ergänzungen.

1. Die Hydrolyse des Adenylsäure enthaltenden Lactoflavin-phosphorsäurepräparats aus Leber wurde durch 6-stündiges Erhitzen mit 0,1-n. Schwefelsäure ausgeführt. Fällung des Adenins mit Silber-sulfatlösung³⁾, Zerlegung des Niederschlags mit Schwefelwasserstoff und Fällung als Pikrat.

¹⁾ Vgl. hierzu *H. Theorell*, *Bioch. Z.* **278**, 267 (1935).

²⁾ *Helv.* **19**, 264 (1936).

³⁾ Vgl. *O. Warburg, W. Christian, A. Griese*, *Bioch. Z.* **282**, 182 (1935).

Zersetzungspunkt des Pikrats nach Umkrystallisieren aus Wasser 285°. Mischzersetzungspunkt mit Adeninpikrat 285°.

N Gef. 30,87 Ber. 30,8%

2. Oxydation von lactoflavin-phosphorsaurem Calcium aus Leber mit Perjodsäure. Zur Anwendung gelangte ein Präparat mit 40% Flavinegehalt.

20 mg Substanz, gelöst in 7,0 cm³ H₂O + 0,4 cm³ 0,1-n. H₂SO₄ wurden mit 1,2 cm³ 0,1-molarer Perjodsäurelösung zur Oxydation 1½ Stunden bei Zimmertemperatur stengelassen und hierauf allfällig entstandener Formaldehyd in bekannter Weise abdestilliert und mit Dimedon bestimmt¹⁾. Dabei konnte Formaldehyd-Dimedon-Verbindung auch nicht spurenweise gewonnen werden. Unter analogen Verhältnissen entstanden aus 12,5 mg Lactoflavin 5,0 mg Dimedon-Formaldehyd-Kondensationsprodukt.

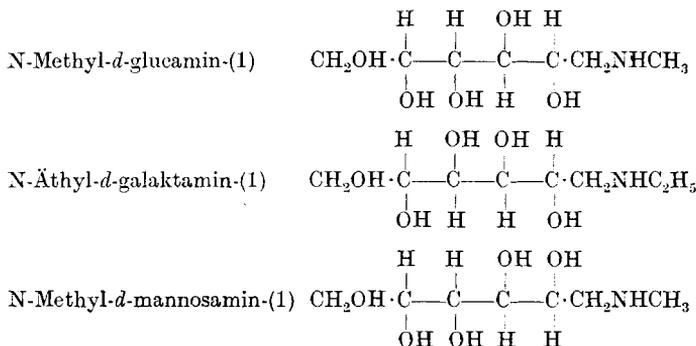
Zürich, Chemisches Institut der Universität.

8. Über einige weitere Reduktionsprodukte aus Zuckern und aliphatischen Aminen

von P. Karrer und E. Herkenrath.

(18. XII. 36)

Durch die neue Methode der reduzierenden Kondensation von Zuckern und Aminen sind auch Amino-polyalkohole, die sich von aliphatischen Aminen ableiten, leicht zugänglich geworden. Vor einiger Zeit²⁾ beschrieben wir das N-Äthyl-d-glucamin-(1), welches bei der katalytischen Reduktion einer Verbindung entsteht, die sich nach *Irvine*³⁾ durch Einwirkung von Äthylamin auf Glucose bildet. In ähnlicher Art wurden nun auch



¹⁾ Vgl. *Criegee*, A. **495**, 211 (1932). — *Pfaehler*, Diss. Zürich 1935, S. 64.

²⁾ *Helv.* **18**, 1338 (1935).

³⁾ *Am. Soc.* **103**, I, 246 (1913).