

## 59. Einfache Synthese kristallisierter Lactoflavin-5'-phosphorsäure (Coferment des Flavinenzyms)

von M. Viscontini, C. Ebnöther und P. Karrer.

(4. I. 52.)

Lactoflavin-5'-phosphorsäure, welche als Coferment von Flavinenzymen wirksam ist, wurde zuerst von *R. Kuhn* und Mitarbeitern<sup>1)</sup>, später nach einem anderen Verfahren von dem einen von uns und Mitarbeitern<sup>2)</sup> synthetisch erhalten. Alle diese Präparate waren aber uneinheitlich. Neuerdings teilten *L. A. Flexner & W. G. Farkas*<sup>3)</sup> in einer Notiz mit, dass sie den genannten Phosphorsäureester durch Einwirkung von hydratisiertem Phosphoroxchlorid auf Lactoflavin darstellten und ein kristallisiertes Monodiäthanolamin-Salz der Verbindung erhielten.

Nach Abschluss unserer Versuche wurde uns ein amerikanisches Patent bekannt, in welchem die Phosphorylierung von Lactoflavin mittels Pyrophosphorsäure beschrieben wird<sup>4)</sup>. Nach dieser Patentschrift entstehen aus Lactoflavin und Pyrophosphorsäure bei stundenlangem Erwärmen Dilactoflavin-pyrophosphorsäureester, welche sich durch Mineralsäuren zu Lactoflavin-5'-phosphat hydrolysieren lassen. Über die Reinheit der erhaltenen Präparate gibt die Patentschrift keine Unterlagen.

Es ist uns gelungen, Lactoflavin-5'-phosphorsäureester auf einfachem Wege rein und kristallisiert darzustellen: Bei der Einwirkung von Metaphosphorsäure (frei von Pyrophosphorsäure) auf Lactoflavin bei 50—60° erhält man ein Gemisch von Phosphorsäureestern, das nach der Hydrolyse mit *n.* Salzsäure ein Gemisch von wenig Lactoflavin, etwas Lactoflavin-polyphosphat (wahrscheinlich Diphosphat oder einer Mischung von Diphosphaten) und als Hauptprodukt Lactoflavin-5'-monophosphat ergibt. Das Papierchromatogramm (Entwicklungsflüssigkeit 5-proz. wässrige Natriumacetatlösung + Isoamylalkohol) dieser Mischung zeigt drei gelbe Flecken; der am wenigsten weit gewanderte enthält Lactoflavin, der mittlere Lactoflavin-5'-monophosphat und der oberste wahrscheinlich ein Diphosphat. Der mittlere Fleck übertrifft die beiden anderen stark an Intensität.

<sup>1)</sup> *R. Kuhn, H. Rudy & F. Weygand*, B. **69**, 1543 (1936); *R. Kuhn & H. Rudy*, B. **69**, 1974 (1936).

<sup>2)</sup> *P. Karrer, P. Frei & H. Meerwein*, Helv. **20**, 79 (1937).

<sup>3)</sup> Chem. Engin. News **29**, 3947 (1951).

<sup>4)</sup> USA. Patent Nr. 2 535 385 vom 9. Januar 1947, erteilt Dezember 1950 (*Breivogel & Ridge*, White Laboratories Inc. Newark, N. J.).

Die Trennung der drei Substanzen liess sich auf folgende Weise ausführen: Durch Kristallisation aus Wasser erfolgt die Trennung in einen kristallinen Niederschlag, bestehend aus Lactoflavin-5'-phosphat und Lactoflavin, und in einen in der Mutterlauge verbliebenen Anteil, welcher das leichter lösliche Lactoflavin-diphosphat enthält.

Lactoflavin und Lactoflavin-5'-phosphorsäure trennten wir durch Behandeln mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung, wobei Lactoflavin ungelöst bleibt, während der Phosphorsäureester als Natriumsalz in Lösung geht. Er wird durch Ansäuern daraus zurückgewonnen und aus Wasser umkristallisiert.

Lactoflavin-5'-phosphat kristallisiert in zu Drusen verwachsenen feinen Nadeln. Sein Calciumsalz ist in Wasser schwer, das Magnesiumsalz beträchtlich, das Natriumsalz sehr leicht löslich.

Die Stellung des Phosphorsäurerestes geht daraus hervor, dass die Verbindung bei der Behandlung mit Perjodsäure<sup>1)</sup> keinen Formaldehyd bildet.

Herr Prof. *Otto Warburg*, Berlin-Dahlem, hatte die Freundlichkeit, unser Präparat von kristallisierter Lactoflavin-5'-phosphorsäure auf seine Wirksamkeit als Coferment des Flavinenzyms zu prüfen. Er fand, dass die Wirkung des synthetischen Präparates derjenigen des natürlichen Cofermentes zumindest ebenbürtig (evtl. um einige Procente stärker) ist.

Herrn Prof. *Warburg* danken wir für die Ausführung dieses Versuches verbindlichst.

Ferner danken wir bestens der *Stiftung für wissenschaftliche Forschung an der Universität Zürich* sowie den *Arbeitsbeschäftigungskrediten des Bundes*, deren finanzielle Unterstützungen zur Ausführung dieser Arbeit beitrugen.

### Experimenteller Teil.

1 g fein gepulvertes Lactoflavin wird in Metaphosphorsäure, die durch Entwässern von 7 cm<sup>3</sup> 85-proz. Orthophosphorsäure hergestellt worden war, eingetragen und diese Mischung während 10—15 Min. auf 50—60° erwärmt. Nach dem Erkalten nimmt man die Reaktionsmasse in 5—6 cm<sup>3</sup> Wasser auf und zentrifugiert einen geringen Niederschlag, der im wesentlichen aus unverändertem Lactoflavin besteht, ab. Die klare Lösung wird hierauf in 50 cm<sup>3</sup> abs. Äthanol eingegossen, wobei ein gelber, flockiger Niederschlag ausfällt, den man abzentrifugiert und mit Alkohol und Äther wäscht. Ausbeute 1,30 g.

Dieses hygroskopische Rohprodukt wird in 100 cm<sup>3</sup> n. HCl gelöst, die Lösung während 10 Min. auf 100° erwärmt, hierauf im Vakuum bis zur Trockene eingedampft, der Rückstand mit 30 cm<sup>3</sup> abs. Alkohol verrieben, der Niederschlag abzentrifugiert und mit Alkohol und Äther gewaschen. Ausbeute 900 mg eines nichthygroskopischen Produktes, das, wie sich durch Papierchromatographie nachweisen lässt (Entwicklungsflüssigkeit: Mischung von 5-proz. Natriumacetatlösung und Isoamylalkohol 1:1) aus etwas Lactoflavin, einem Lactoflavin-diphosphat und als Hauptmenge aus Lactoflavin-5'-phosphat besteht.

Man löst dieses Rohprodukt (900 mg) in 20 cm<sup>3</sup> Wasser. Aus dieser Lösung kristallisiert innerhalb 24 Std. ein Gemisch von Lactoflavin-5'-phosphat und Lactoflavin aus,

<sup>1)</sup> *P. Karrer & K. Pfäehler*, *Helv.* **17**, 766 (1934); *H. v. Euler, P. Karrer & B. Becker*, *Helv.* **19**, 1060 (1936).

während in der Mutterlauge die Lactoflavin-diphosphorsäure gelöst bleibt. Sollte der Niederschlag noch etwas Diphosphat enthalten (Papierchromatogramm-Test), so ist eine weitere Kristallisation aus Wasser notwendig.

Hierauf wird der Niederschlag, der aus Lactoflavin-5'-phosphat und wenig Lactoflavin besteht, in 20 cm<sup>3</sup> Wasser suspendiert und mit einer Natriumhydrogencarbonat-Lösung genau neutralisiert. Dabei geht Lactoflavin-5'-phosphorsäure als Natriumsalz in Lösung, während Lactoflavin ungelöst bleibt. Nach Zugabe von etwas Tierkohle trennt man den Niederschlag ab, säuert das klare Filtrat mit Salzsäure leicht an und konzentriert es im Vakuum. Nach kurzem Stehen kristallisiert aus dieser Lösung Lactoflavin-5'-phosphorsäureester aus, der praktisch rein ist. Die Kristalle bestehen aus zu Drusen verwachsenen feinen Nadeln.

$C_{17}H_{21}O_9N_4P \cdot 3 H_2O$ (510)	Ber. C 40,00 Gef. „ 40,36	H 5,29 „ 5,16	N 10,98 „ 11,15	P 6,08% „ 5,85%
---	------------------------------	------------------	--------------------	--------------------

Das Calciumsalz des Lactoflavin-5'-phosphates ist in Wasser wenig, das Magnesiumsalz ziemlich leicht löslich. Die Natrium- und Kalisalze der Verbindung lösen sich in Wasser leicht auf.

Bei der Oxydation von 100 mg Lactoflavin-5'-phosphat mittels Perjodsäure nach dem von uns früher beschriebenen Verfahren<sup>1)</sup> wurde nur 1 mg Formaldehyd-dimedon erhalten. Unter denselben Bedingungen lieferte die Oxydation von 125 mg Lactoflavin ca. 40 mg der Formaldehyd-dimedon-Verbindung. Der Versuch zeigt, dass die untersuchten Präparate von Lactoflavin-5'-phosphat höchstens Spuren von Lactoflavin enthalten.

### Zusammenfassung.

Es wird eine einfache Methode zur Darstellung kristallisierter Lactoflavin-5'-phosphorsäure (Coferment des Flavinenzyms) beschrieben, die in der Einwirkung von Metaphosphorsäure auf Lactoflavin besteht.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

## 60. Zur Konstitution des „Aneurinthiazolons“

von P. Karrer und H. Krishna.

(4. I. 52.)

Beim Erhitzen von Aneurin-disulfid in hochsiedenden Lösungsmitteln bilden sich Thiochrom und eine farblose, bei 237° schmelzende Verbindung<sup>2)</sup>, welche „Aneurinthiazolon“ genannt wurde. Für das Aneurinthiazolon haben *P. Sykes & A. R. Todd*<sup>3)</sup> Formel I sehr wahrscheinlich gemacht; sie konnten aber keine übersichtlich verlaufende Synthese finden, welche diese Formel bestätigt hätte.

Der nachstehend beschriebene Versuch zeigt, dass sich „Aneurinthiazolon“ durch  $LiAlH_4$  zu Dihydro-aneurin (II) reduzieren lässt,

<sup>1)</sup> *P. Karrer & K. Pfähler*, *Helv.* **17**, 766 (1934); *H. v. Euler, P. Karrer & B. Becker*, *Helv.* **19**, 1060 (1936).

<sup>2)</sup> *R. R. Williams & O. Zima*, *B.* **73**, 941 (1940).

<sup>3)</sup> *Soc.* **1951**, 534.