

Zur Kenntnis der Netzhautstoffe IV¹

Über die Flavine der Netzhaut

Von

O. BRUNNER und E. BARONI

Aus dem I. Chemischen Universitätslaboratorium in Wien

Mit einer Figur im Text

(Eingegangen am 9. 6. 1936. Vorgelegt in der Sitzung am 18. 6. 1936)

Gelegentlich unserer ersten Mitteilung² haben wir auf das Vorkommen von Flavin in der Netzhaut des Rindes und des Schweines hingewiesen, jedoch den von uns eingeschlagenen Arbeitsgang nicht ausführlich beschrieben. Wir wollen dies nunmehr nachtragen.

Das Auftreten von Flavin in der Netzhaut des Rindes ist inzwischen auch von EULER und ADLER³ festgestellt worden; während diese Autoren sich jedoch mit der Feststellung des Vorkommens von Flavin begnügten, haben wir besonderen Wert auf die Charakterisierung der Farbstoffe gelegt.

Wir konnten in den wäßrig-alkoholischen Auszügen der Netz- und Aderhäute⁴ von Rindern und Schweinen drei Vertreter der Farbstoffe der Flavineihe auffinden: Das Flavin, welches wahrscheinlich mit dem Lactoflavin (Vitamin B₂) identisch sein dürfte, das Lumiflavin (6, 7, 9-Trimethyl-isoalloxazin) und das Lumichrom (6, 7-Dimethyl-alloxazin).

Die Abtrennung und Isolierung der einzelnen Farbstoffe erfolgte im Großen und Ganzen auf dem von R. KUHN und TH. WAGNER-JAUREGG⁵ bei der Darstellung des Lactoflavins aus Eiklar und Molke eingeschlagenen Wege. Die Farbstoffe wurden nach der Extraktion der Netz- und Aderhäute mit Alkohol und Ab-

¹ 3. Mitteilung siehe vorhergehende Arbeit.

² BRUNNER, BARONI, KLEINAU, Hoppe-Seylers Z. physiol. Ch. **236** (1935) 257.

³ V. EULER und ADLER, Ark. Kem. Mineral. Geol. Ser. B **11**, Nr. 20, 21; Hoppe-Seylers Z. physiol. Ch. **223**, 105; über Flavin aus Fischaugen vgl. Hoppe-Seylers Z. physiol. Ch. **228**, 1 und KARRER, EULER und SCHÖPP, Ark. Kem. Mineral. Geol. Ser. B **11**, Nr. 54.

⁴ Da eine Abtrennung des Pigmentepithels von den Aderhäuten in großem Maßstabe sehr mühsam und zeitraubend gewesen wäre, haben wir die Aderhäute als solche abpräpariert und dadurch Pigmentepithel und Aderhaut gemeinsam verarbeitet.

⁵ R. KUHN und TH. WAGNER-JAUREGG, Ber. dtsh. chem. Ges. **66** (1933) 1034, 1577.

trennung der petrolätherlöslichen Anteile zuerst aus saurer Lösung an Sillitonit⁶ adsorbiert, mit Pyridin-Methanol-Wasser eluiert und sodann mit Äther extrahiert. Hierbei blieb das Flavin in der wäßrigen Phase, während das Lumiflavin und das Lumichrom in die Ätherlösung übergingen. Durch neuerliche Adsorption an Sillitonit bzw. Frankonit, Elution mit Pyridin-Methanol-Wasser bzw. Aceton-Methanol, Fällung als Silbersalz, Zerlegung des letzteren mit Schwefelwasserstoff usw. resultierte schließlich eine reine Farbstofffraktion, deren Absorptionsspektrum aufgenommen wurde. Die so erhaltene Absorptionskurve zeigte in schöner Übereinstimmung mit der von R. KUHN und Mitarbeitern⁷ für das Lactoflavin angegebenen ein ausgesprochenes Maximum bei 266 $\mu\mu$, sowie ein Nebenmaximum bei 300 $\mu\mu$; ein drittes Maximum oberhalb 350 $\mu\mu$ konnte wegen der zu geringen Dispersion unseres Apparates in diesem Gebiete nicht mehr sicher ausgewertet werden.

Bekanntlich tritt das Lactoflavin in dreierlei Form auf: Als freies Flavin (z. B. in der Milch), als Phosphorsäureester (z. B. in der Leber) und an Phosphorsäure und an Eiweiß gebunden im gelben Oxydationsferment (Hefe). Für das Flavin der Fischeaugen konnten EULER und seine Mitarbeiter eine Verknüpfung an Eiweiß dadurch ausschließen, daß ihnen die Feststellung gelang, daß das Flavin der Fischeaugen dialysabel ist und durch die Membran hindurchgeht. Um in unserem Falle auch zwischen freiem Flavin und seinem Phosphorester unterscheiden zu können, hat der eine von uns (O. B.) gemeinsam mit W. KLEINAU das Verhalten des Flavins der Rinder- und der Schweineaugen auch bei der Kataphorese untersucht. Hierbei zeigte sich, daß bei einer angelegten Spannung von 220 Volt und einem Stromdurchgang von 8 Milliampère der Farbstoff nicht im mindesten wanderte, das Flavin somit als neutrales Molekül vorhanden sein muß und eine Bindung an Phosphorsäure daher gleichfalls ausgeschlossen ist.

Die ätherlösliche Fraktion, welche das Lumiflavin und das Lumichrom enthielt, wurde — wie im experimentellen Teil ausführlich beschrieben wird — in ähnlicher Weise aufgearbeitet. Die Trennung dieser beiden Farbstoffe wurde durch Verteilung zwischen Butylalkohol und n/10 Kalilauge bewirkt, wobei das Lumiflavin in die butylalkoholische Schicht, das Lumichrom in

⁶ Wir danken auch an dieser Stelle den Pfrschinger Mineralwerken in Kitzingen am Main für die liebenswürdige Überlassung von Frankonit und Sillitonit.

⁷ R. KUHN und Mitarbeiter, Ber. dtsch. chem. Ges. 68 (1935) 1765.

die alkalische Lösung übergeht. Das so gewonnene Lumiflavin (6, 7, 9-Trimethyl-isoalloxazin) wurde schließlich in Form von schönen Kristallen erhalten, welche im evakuierten Röhrchen bei 324° (BEHLBLOCK) schmolzen. Die Ausbeute aus 3800 Rinder-Netz- und Aderhäuten betrug 2,7 mg kristallisiertes Produkt.

Auch das Lumichrom zeigte die von KARRER und Mitarbeiter⁸ beschriebenen Eigenschaften.

Die nach der ersten Adsorption der Flavine resultierenden sauren Mutterlaugen zeigten unter der Analysenquarzlampe immer noch eine blaue Fluoreszenz. Ein Teil dieser blau fluoreszierenden Stoffe ließ sich durch Behandlung mit Chloroform in dieses überführen, während ein anderer Teil auch bei lang andauernder Extraktion mit diesem Lösungsmittel in der wäßrigen Phase verblieb. Die Menge des in die Chloroformlösung übergegangenen Stoffes war für eine restlose Aufarbeitung leider zu gering; sie mußte vorläufig daher zurückgestellt werden. Aus den wäßrigen Phasen ließ sich jedoch durch Fällung mit Bleiacetat und mit Mercurichlorid eine Substanz abtrennen, die unter der Analysenquarzlampe schwach blaue Fluoreszenz zeigte. Sie wurde kristallisiert erhalten und erwies sich als Kreatinin. Die Identifizierung erfolgte durch Darstellung des bei 212° schmelzenden Pikrates. Aus 1000 Rinderaugen wurden so 20 mg reinstes Pikrat erhalten.

Da die Standextrakte der Netz- und Aderhäute nach einigem Stehen schwach alkalische Reaktion und einen aminähnlichen Geruch aufwiesen, nahmen wir auch eine Aufarbeitung auf Amine vor. Über das Vorkommen von Aminen in der Retina oder Chorioidea ist bisher in der Literatur kein Hinweis zu finden. Über das Vorkommen von Ammoniak, besonders in der belichteten Netzhaut, berichten RÖSCH und KAMP⁹.

Wir haben das bei der Extraktion der Flavine zurückgewonnene Methanol unter Zusatz von etwas Schwefelsäure abdestilliert und die so erhaltene Aminfraktion in das Chlorhydrat übergeführt. Durch Extraktion mit absolutem Alkohol konnte nun von der Hauptmenge, welche aus Ammonchlorid bestand, eine weiße Kristallmasse von Aminchlorhydrat abgetrennt werden, die nach der Methode von KLEIN, STEINER und LÖFFLER¹⁰ auf Amine

⁸ KARRER und Mitarbeiter, *Helv. chim. Acta* **17**, 1010; **18**, 1126.

⁹ RÖSCH und KAMP, *Hoppe-Seylers Z. physiol. Ch.* **175**(1928) 158; **186**(1929) 237.

¹⁰ KLEIN und STEINER, *Jahrb. wiss. Bot.* **68** (1928) 602. — STEINER und LÖFFLER, *ebda.* **71** (1929) 463.

geprüft wurde. Diese Methode besteht darin, daß die Amine mit 2,4-Dinitronaphtol umgesetzt werden, und sie gestattet Mengen von 1 bis 5 γ eines Amins auf Grund der charakteristischen Kristallform der 2,4-Dinitronaphtolverbindung nebeneinander nachzuweisen.

Die hiebei erhaltenen Kristalle zeigten die für das Trimethylamin-2,4-Dinitronaphtol typische Kristallform (Fig. 1). Ein anderes

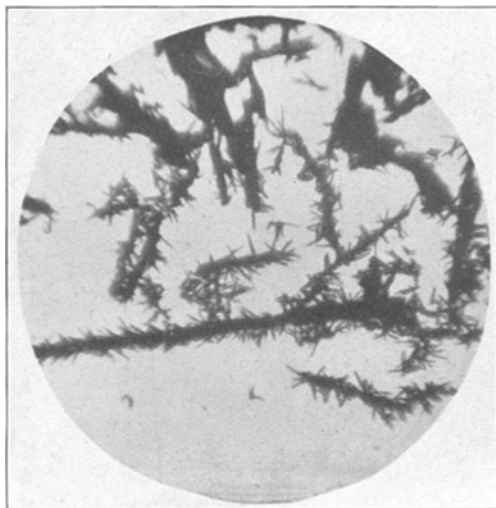


Fig. 1.

Amin konnte nicht nachgewiesen werden; in der Aminfraktion war daher nur Trimethylamin vorhanden.

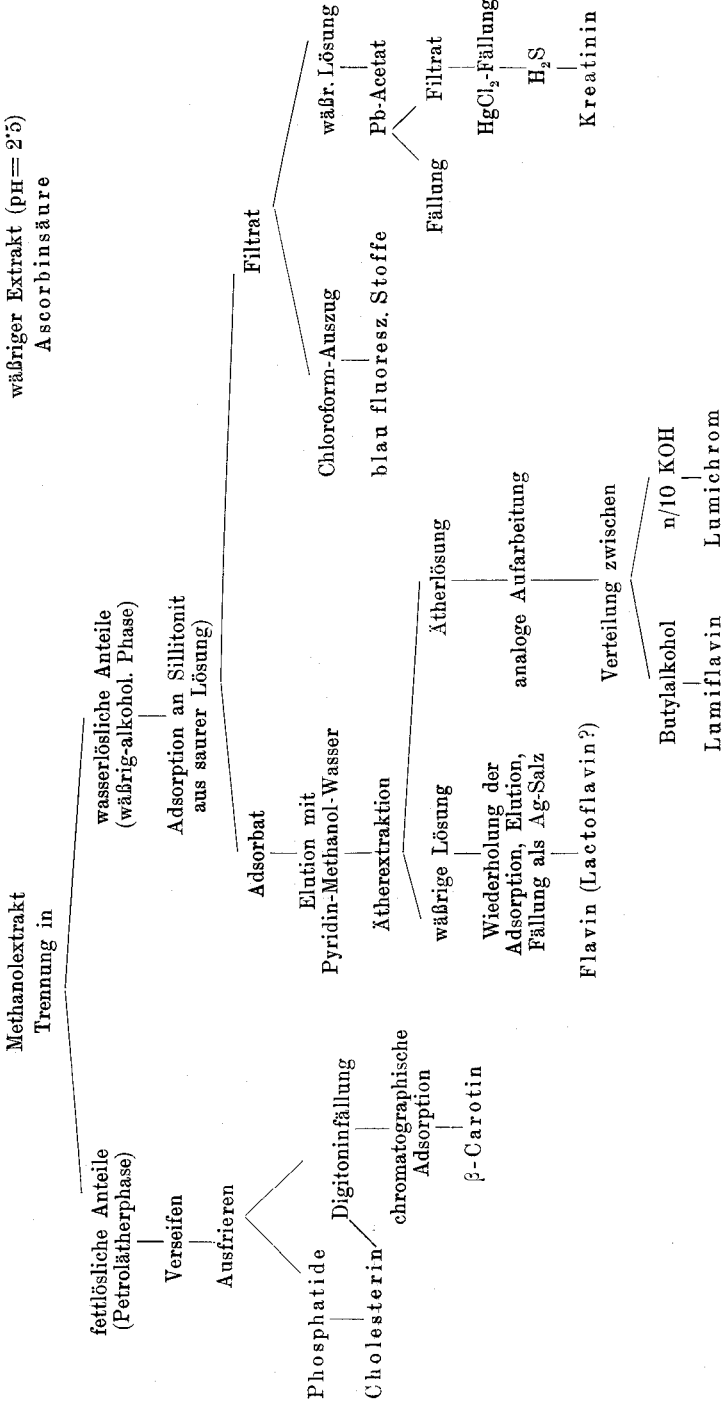
Wir möchten es nicht verabsäumen, auch an dieser Stelle den Herren Prof. Dr. H. MARK und Prof. Dr. A. FUCHS für die Gewährung der Mittel, der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft für die Überlassung eines Spektrographen aufrichtigst zu danken.

Experimenteller Teil.

Zur Verwendung gelangten frische Augen von Rindern und Schweinen. Sie wurden durch einen Frontalschnitt knapp hinter dem Ciliarkörper eröffnet, Glaskörper und Linse entfernt und die Netzhaut durch vorsichtiges Ablösen beim Sehnerveneintritt herauspräpariert. Die so gewonnenen Netzhäute wurden sofort in absolutes Methanol eingetragen und darin über Nacht

Anfarbeitungsschema.

Netzhäute



liegen gelassen. Am nächsten Tage wurde die Flüssigkeit abgossen und zur vollständigen Extraktion durch neues Methanol ersetzt.

Da eine Abtrennung des Pigmentepithels als solches sehr mühsam und an dem notwendigen großen Material nur mit sehr großen Schwierigkeiten durchzuführen gewesen wäre, haben wir auf eine isolierte Aufarbeitung desselben verzichtet und das Pigmentepithel gemeinsam mit der gesamten Aderhaut abgelöst und verarbeitet. Diese Verarbeitung erfolgte in gleicher Weise wie bei den Netzhäuten.

Die so gewonnenen methylalkoholischen Extrakte wurden nun zur Entfernung der Lipoide und Lipochrome mit Wasser versetzt und mit Petroläther erschöpfend ausgezogen. Die nach der Entfernung der fettlöslichen Bestandteile verbleibenden methylalkoholischen Mutterlaugen wurden nun im Vakuum bei einer Badtemperatur von ca. 40° so lange eingeeengt, bis sich im Destillationsbügel Wassertropfen ansetzten. Das lästige Schäumen der Lösung — insbesondere gegen Ende der Destillation — konnte mit Hilfe einer im Kolbenhalse angebrachten Kapillare beseitigt werden. Die so erhaltenen gelben, trüben Rückstände (100 bis 150 cm³), die eine intensiv grüne Fluoreszenz zeigten, wurden durch Zusatz von Salzsäure auf eine Konzentration von n/1 Salzsäure gebracht. Dann wurde für je 100 cm³ 1 g Sillitonit zugefügt und drei Stunden gerührt. Nach dem Stehen über Nacht wurde die Adsorptionserde von der Mutterlauge getrennt und halogenfrei gewaschen; die Mutterlauge wurde in der später angegebenen Weise weiterverarbeitet.

Die Elution erfolgte durch zweistündiges Schütteln mit einem Gemisch von Wasser-Methanol-Pyridin (4:1:1) und Wiederholung mit Aceton-Methanol (1:1). Die gesamten Eluate wurden dann im Vakuum auf ein kleines Volumen eingeeengt, die dabei ausfallende Erde abzentrifugiert und mit Methanol-Aceton gewaschen. Durch Zusatz des gleichen Volumens Methanol zum Destillationsrückstand — eventuell unter gleichzeitiger Zugabe einiger Tropfen Eisessig — gelingt es, den kolloidal gelösten Sillitonit auszuflocken. Aus der im Vakuum eingeeengten Lösung wurden durch Zusatz von Aceton und Methylalkohol weitere Begleitstoffe ausgefällt. Diese Fällung wurde zweimal wiederholt. Die von Alkohol und Aceton befreiten Lösungen wurden nun im Extraktionsapparat 48 Stunden mit Äther

ausgezogen und so das Lumiflavin bzw. Lumichrom von dem ätherunlöslichen Flavin geschieden.

Zur weiteren Aufarbeitung des Flavins wurde nun die wäßrige Phase abgetrennt und mit dem gleichen Volumen Methanol-Aceton (1:1) einige Tage im Dunklen stehen gelassen. Nach Filtration wurde auf wenige Kubikzentimeter eingeeengt und sodann neuerlich an Sillitonit (auf 10 cm^3 $0\text{'}05\text{ g}$) adsorbiert. Die Erde wurde mit wenig Wasser gewaschen und mit einer Mischung von Pyridin-Methanol-Wasser (1:4:5), der einige Tropfen Aceton zugesetzt waren, eluiert. Nach dem Zentrifugieren wurde neuerdings eingeeengt und mit Methanol-Aceton stehen gelassen. Nach dem Abfiltrieren des abgeschiedenen Niederschlages wurde das Filtrat auf 5 cm^3 eingeeengt und das Flavin mit 5% iger Silbernitratlösung unter vorsichtigem Zusatz von Ammoniak als braun gefärbtes Silbersalz niedergeschlagen. Die Vollständigkeit der Fällung wurde unter der Analysenquarzlampe kontrolliert.

Das Silbersalz wurde durch Digerieren mit kleinen Portionen 50% iger Essigsäure in Lösung gebracht, das Silber mit Schwefelwasserstoff gefällt. Das Silbersulfid wurde zweimal mit wenig warmer, 50% iger Essigsäure ausgewaschen und die Waschflüssigkeit mit dem Filtrat der Silbersulfidfällung vereinigt. Die intensiv gelb gefärbten Lösungen wurden nun im Vakuum vorsichtig zur Trockene gebracht und der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen. Durch Ausschütteln mit Chloroform konnte eine geringe Menge Lumiflavin, welche durch unvermeidliche Lichteinwirkung während der Aufarbeitung entstanden war, entfernt werden.

Die so erhaltenen Flavinlösungen wurden nun neuerlich der Reinigung als Silbersalz unterworfen. Die schließlich erhaltene Lösung war intensiv gelb gefärbt, fluoreszierte im gefilterten Ultraviolettlicht intensiv gelbgrün und ließ sich mit Natriumhyposulfit zur Leukoverbindung reduzieren, welche beim Schütteln mit Luftsauerstoff wieder den Farbstoff zurückbildete. Da die Menge für die Gewinnung von Kristallen zu gering war, mußten wir uns auf die Aufnahme des UV-Spektrums beschränken. Sie ergab ein scharfes Maximum bei $266\mu\mu$, ein Nebenmaximum bei $300\mu\mu$ und einen weiteren Anstieg in der Gegend von $350\mu\mu$ ab, den wir leider wegen der zu geringen Dispersion unseres Spektralapparates in diesem Gebiet nicht mehr auswerten konnten.

Für das Lactoflavin geben KUHN und Mitarbeiter¹¹ auf Grund der lichtelektrischen Photometrie ein Maximum bei 266 $\mu\mu$, ein Nebenmaximum bei 300 $\mu\mu$ und schließlich ein drittes Maximum bei 365—380 $\mu\mu$ an.

Die bei der Extraktion der Flavinklösung mit Äther erhaltenen ätherischen Lösungen zeigten eine intensiv gelbgrüne Fluoreszenz und ließen eine verhältnismäßig große Menge an Lumiflavin erwarten. Sie wurden mit den Chloroformausschüttlungen vereinigt und zunächst am Wasserbad im Vakuum abgedunstet. Der braune Rückstand wurde mit viel heißem Wasser in Lösung gebracht und nun einer ähnlichen Reinigung, wie sie beim Flavin beschrieben wurde, unterworfen. Wir erhielten so schließlich eine klare Lösung, welche zur Entfernung der Essigsäure zur Trockene abgedunstet wurde. Der Rückstand wurde mit heißem Chloroform mehrmals ausgezogen und so eine intensiv gelb gefärbte Lösung mit starker gelbgrüner Fluoreszenz gewonnen. Aus dieser Lösung konnte schließlich eine geringe Menge von Kristallen gewonnen werden, welche im evakuierten Röhrchen bei 324° (BERLBLOCK) schmolzen. Die Ausbeute betrug 27 mg aus 3800 Rinder-Netz- und Aderhäuten.

Das Lumichrom wurde teils aus den hochkonzentrierten Lumiflavinfractionen durch Verteilung zwischen Butylalkohol und n/10 Kalilauge gewonnen, teils dienten zur Darstellung des Lumichroms die bei der Gewinnung von Sehpurpurlösungen anfallenden Alaun- und Natriumchloridlösungen. In letzterem Fall wurden die wäßrigen Lösungen zunächst durch Zusatz von Aceton von der Hauptmenge der mineralischen Salze sowie anderen Begleitstoffen befreit. Nach dem Abdunsten und Aufnehmen mit heißem Wasser wurde mit 5% iger Silbernitratlösung gefällt und der resultierende Niederschlag, der in der Hauptsache aus Silberchlorid bestand, mit 50% iger Essigsäure behandelt. Das Filtrat wurde mit Schwefelwasserstoff entsilbert, die Lösung schwach alkalisch (3% KOH) gemacht und zur Entfernung von Verunreinigungen mit Chloroform ausgeschüttelt. Die alkalische Lösung wurde dann nach Neutralisation mit Essigsäure in analoger Weise wie oben aufgearbeitet.

Die nach der Adsorption der Flavinfarbstoffe an Sillitonit resultierenden salzsauren Mutterlaugen zeigten immer noch schwach blaue Fluoreszenz unter der Analysenquarzlampe. Die

¹¹ Loc. cit.

Lösungen wurden daher zunächst mit Chloroform ausgeschüttelt, wobei ein Teil der fluoreszierenden Stoffe in das Chloroform überging, während ein anderer Teil trotz langdauernder Extraktion in der wäßrigen Phase verblieb.

Die Chloroformlösungen wurden über Natriumsulfat getrocknet und sodann zur Trockene gebracht. Der Rückstand wurde in absolutem Alkohol gelöst, nach der Filtration abgedunstet und mit Wasser aufgenommen. Nach mehrstündigem Stehen wurde neuerlich filtriert und der Lösung mit Chloroform die fluoreszierende Substanz entzogen. Versuche, die Substanz durch Adsorption an Tierkohle aus der Chloroformlösung und nachherige Elution weiter zu reinigen, führten zu keinem positiven Ergebnis. Da nur eine ganz geringe Menge dieser Fraktionen vorhanden war, mußte ihre weitere Bearbeitung vorläufig zurückgestellt werden.

Die nach der oben angeführten Chloroformausschüttlung anfallenden salzsauren Lösungen wurden am Wasserbade zuerst stark eingeeengt und nach dem Erkalten filtriert. Das Filtrat wurde mit Bleiacetatlösung gefällt, der Niederschlag abgetrennt und mit 5% iger Salzsäure gewaschen, Mutterlauge und Waschwasser vereinigt und durch Zusatz von konzentrierter Sodalösung entbleit. Dann wurde mit Essigsäure neutralisiert und mit gesättigter Sublimatlösung gefällt. Nach mehrtägigem Stehen wurde der Niederschlag abgesaugt, in Wasser aufgeschlämmt und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Die vom Quecksilbersulfid abgetrennte Lösung wurde mit Tierkohle gereinigt und am Wasserbad langsam abgedunstet. Der Rückstand bildete kleine Kristalle, die in alkoholischer Lösung mit Pikrinsäure umgesetzt wurden. Das Pikrat schied sich in Form feiner verfilzter Nadeln aus, die aus absolutem Alkohol umgelöst wurden. Sie sinterten im Vakuumröhrchen bei 209—211° und schmolzen bei 212° unter Dunkelfärbung.

Analyse: 2'197 mg Sbst. gaben 0'481 cm³ N₂. (korr.)

Gefunden: 24'7% N.

Berechnet für C₁₀H₁₀O₈N₆: 24'5% N.

Zur Untersuchung der Amine wurden die Methylalkoholdestillate vorsichtig mit Schwefelsäure bis zur schwach sauren Reaktion versetzt und dann der Methylalkohol abdestilliert. Die hierbei abgeschiedene Kristallmasse wurde abgesaugt, in wenig Wasser gelöst und nach Zugabe von konzentrierter Lauge die

in Freiheit gesetzten Amine in eine mit Salzsäure beschickte Vorlage überdestilliert. Die nach dem Abdunsten erhaltenen Chlorhydrate wurden sodann im Vakuum scharf getrocknet und im Soxhletapparat mit absolutem Alkohol extrahiert. Die aus dem alkoholischen Extrakt gewonnenen Aminchlorhydrate wurden nach der Methode von KLEIN, STEINER und LÖFFLER¹² durch Umsetzen mit 2,4-Dinitro-naphtol auf Amine untersucht. Hierbei wurden bloß die für Trimethylamin typischen Kristalle erhalten (Fig. 1). Ein anderes Amin konnte nicht nachgewiesen werden.

Der bei der Extraktion in absolutem Alkohol unlösliche Teil bestand aus reinem Ammonchlorid.

¹² Loc. cit.