

den Absorptionsbanden erhalten: α : 522, 490, 466 $m\mu$, β : 502, 482, 452 $m\mu$ (in Alkohol). *Lederer*²⁸⁾ isolierte aus *Torula rubra* das *Torulen* in kristallisiertem Zustand (Absorptionsbanden: 565, 522, 488 $m\mu$ in CS_2). *Fink* und *Zenger*²⁹⁾ haben aus roten *Torulaceen* offenbar auch *Torulen* gewonnen (562,5, 522,5, 486 $m\mu$ in CS_2), daneben aber noch ein weiteres, außerordentlich langwellig absorbierendes Carotinoid nachweisen können (588, 535, 491 $m\mu$ in CS_2). *V. Reader*³⁰⁾ hat mit Hilfe der chromatographischen Adsorptionsanalyse in *Sarcina aurantiaca* Lycopin und Carotin spektroskopisch nachgewiesen und in *Streptothrix corallinus* das Vorhandensein eines neuen Carotinoids, *Coralin*, wahrscheinlich gemacht. (Absorptionsbanden: 509—485, 465—455 $m\mu$ in Äther). Nach *E. Chargaff*³¹⁾ findet sich in *Sarcina lutea* neben einem Xanthophyll ein Kohlenwasserstoff, das *Sarcinin*, welches folgende Absorptionsbanden besitzt: 469, 440, 415 $m\mu$ (Petroläther).

²⁸⁾ Compt. rend. Acad. Sciences 197, 1694 [1933].

²⁹⁾ Wchschr. Brauerei 1933, Nr. 12, 24. März.

³⁰⁾ Biochemical Journ. 19, 1039 [1925].

³¹⁾ Naturwiss. 20, 872 [1932].

Sehr erfolgreich in der Bearbeitung der Carotinoide von Seetieren war *E. Lederer*³²⁾, der im Anschluß an seine Untersuchungen mit *R. Kuhn* zeigte, daß das Astacin in Meerestieren weit verbreitet ist. *Lederer* hat aus *Pectunculus glycymeris* ein bei 148—153° schmelzendes Carotinoid, das *Glycymerin*, isoliert, das ebenso wie Astacin nur eine Absorptionsbande (495 $m\mu$ in CS_2) besitzt. Aus *Actinia equina* gewann *Lederer* das *Actino-erythrin*, das in braunvioletten Rhombodern kristallisiert und bemerkenswerterweise in Schwefelkohlenstoff drei Absorptionsbanden (574, 533, 495 $m\mu$), in Alkohol dagegen nur eine Absorptionsbande besitzt (zwischen 577 und 518 $m\mu$).

Aus dem roten Muskelfleisch isolierten *H. v. Euler*³³⁾ und *Hellström* eine Carotinoid-carbonsäure, die *Salmen-säure*, denselben Autoren³⁴⁾ gelang die Isolierung einer weiteren Carotinoid-carbonsäure, *Asterinsäure* $C_{28}H_{40}O_4$, aus verschiedenen Echinodermen, insbesondere *Asterias rubens*. [A. 41.]

³²⁾ Bull. Soc. Chim. biol. 16, 105 [1933].

³³⁾ Svensk Kem. Tidskr. 45, 151 [1933].

³⁴⁾ Ztschr. physiol. Chem. 223, 89 [1934].

Flavine¹⁾.

Von Priv.-Doz. Dr. Th. WAGNER-JAUREGG, Kaiser Wilhelm-Institut, Heidelberg.

(Eingeg. 28. April 1934.)

Geschichtliche Einleitung. Nomenklatur. In Pflanzen und Tieren kommen weitverbreitet wasserlösliche, stickstoffhaltige Farbstoffe von gelber Farbe und grüner Fluoreszenz vor, die bis vor etwa zwei Jahren kaum Beachtung fanden. Es rührt dies wohl einerseits davon her, daß diese Farbstoffe sich vielfach nur in geringer Konzentration vorfinden, andererseits häufig von intensiver gefärbten Pigmenten begleitet werden und demnach der direkten Beobachtung entgehen. Am frühesten lenkte der gelbe, wasserlösliche Farbstoff der Kuhmolke die Aufmerksamkeit der Chemiker auf sich, den *A. W. Blyth*²⁾ im Jahre 1879 in sehr unreinem Zustande als rotorange gefärbtes Harz isolierte und dem er den Namen *Lactochrom* gab. Die Reindarstellung des Molkenfarbstoffes, den man anfangs für ein Alkaloid, später für einen Abkömmling des Phenylalanins und dann für identisch mit Urobilin und Urochrom hielt, machte nur geringe Fortschritte³⁾. Viel später wurden zwei wasserlösliche, gelbe Farbstoffe beschrieben, deren Zugehörigkeit zur Gruppe des Molkenpigments sich nachträglich erwiesen hat: im Jahre 1932 gewannen *J. Banga* und *A. Szent-Györgyi*⁴⁾ ein goldgelb gefärbtes Atmungs-Coferment-Präparat aus Schweineherz-Kochsaft, dessen Farbkomponente sie den Namen *Cytoflavin* gaben, und im selben Jahre stellten *O. Warburg* und *W. Christian*⁵⁾ aus Hefe ein gelbes Oxydationsferment dar, aus dessen Farbkomponente sie ein kristallisiertes Abbauprodukt gewinnen konnten. Zu Beginn des Jahres 1933 isolierten *R. Kuhn*, *P. György* und *Th. Wagner-Jauregg*⁶⁾ aus Eiklar und Molke die ersten natürlichen Vertreter dieser Farbstoffklasse in reiner, kristallisierter Form, nachdem *P. György*, *R. Kuhn* und *Th. Wagner-Jauregg*⁷⁾ Be-

ziehungen der gelben, wasserlöslichen Farbstoffe aus Leber, Niere, Herz, Muskel, Hefe, Eiklar, Molke, Spinat u. a. zum Vitamin B_2 aufgefunden hatten. Zu gleicher Zeit beschrieben *Ph. Ellinger* und *W. Koschara*⁸⁾ verschiedene kristallinische Farbstoffpräparate aus Molke. Diese Autoren waren auf die neue Klasse von Farbstoffen durch die gelbgrüne Spontanfluoreszenz tierischer Organe aufmerksam geworden, die sich mittels der Methode der „Intravital-Mikroskopie“⁹⁾ beobachten läßt. *Ph. Ellinger* und *W. Koschara* nannten diese Naturfarbstoffe „*Lyochrome*“, während *R. Kuhn*, *P. György* und *Th. Wagner-Jauregg* die Bezeichnung „*Flavine*“ (*Ovoflavin*, *Lactoflavin* usw.) vorschlugen. Nach Übereinkommen der genannten Autoren sollen die Einzelvertreter als Flavine (mit der entsprechenden Vorsilbe) benannt werden, während Lyochrome als Gruppenname verwendet wird¹⁰⁾. Diese Nomenklatur hat sich allgemein eingebürgert. Die Identität des Vitamins B_2 mit Lactoflavin ist durch die Untersuchungen von *P. György*, *R. Kuhn* und *Th. Wagner-Jauregg*^{6, 11)} außerordentlich wahrscheinlich gemacht worden. Vor kurzem gelang *P. Karrer*, *H. Salomon* und *K. Schöpp* die Darstellung von reinem, kristallisiertem Flavin aus Leber (*Hepaflavin*)¹²⁾, das wahrscheinlich mit Lactoflavin identisch ist, und *W. Koschara*^{12a)} isolierte ein kristallisiertes Lyochrom aus Harn (*Uroflavin*).

Verbreitung, Bestimmungsmethoden und Art des Vorkommens. Die Lyochrome finden sich weitverbreitet im Tier- und Pflanzenreich; am reichlichsten in einigen, besonders in anaerob wachsenden, stark gärenden Bakterien, in Hefe, in Säugetier-leber, -niere und -herz und

¹⁾ Nach einem am 22. März 1934 vor dem Bezirksverein Frankfurt a. M. des Vereins deutscher Chemiker und der Chem. Gesellschaft Frankfurt a. M. gehaltenen Vortrag.

²⁾ Journ. chem. Soc. 1879, 530.

³⁾ Literatur bei *B. Bleyer* u. *O. Kallmann*, Biochem. Ztschr. 155, 54 [1925].

⁴⁾ Ebenda 246, 203 [1932].

⁵⁾ Naturwiss. 20, 688, 980 [1932]; Biochem. Ztschr. 254, 438 [1932]; 257, 492 [1933]; 266, 377 [1933].

⁶⁾ Ber. Dtsch. chem. Ges. 66, 317, 676, 1034, 1577 [1933].

⁷⁾ Naturwiss. 21, 560 [1933]; Klin. Wchschr. 12, 1241 [1933].

⁸⁾ Ber. Dtsch. chem. Ges. 66, 315, 808, 1411 [1933].

⁹⁾ *Ph. Ellinger* u. *A. Hirt*, Ztschr. Anat. Entwickl. Gesch. 90, 791 [1929]; dieselben in *E. Abderhalden*, „Handbuch d. biol. Arbeitsmethoden“ Abt. V, Tl. 2/2, 1753 [1930].

¹⁰⁾ Siehe dagegen *O. Warburg* u. *W. Christian*, Biochem. Ztschr. 266, 377 [1933].

¹¹⁾ *P. György*, *R. Kuhn* u. *Th. Wagner-Jauregg*, Ztschr. physiol. Chem. 223, 21, 27, 236, 241 [1934].

¹²⁾ Helv. chim. Acta 17, 419 [1934].

^{12a)} Ber. Dtsch. chem. Ges. 67, 761 [1934].

in der Netzhaut der Augen mancher Fische. Über die quantitative Verbreitung der Flavine in Bakterien, in pflanzlichen und tierischen Produkten geben die folgenden drei Tabellen einen Überblick.

Tabelle 1¹³⁾.

Zellart	mg Flavin pro kg Trockensubstanz
Essigbakterien (<i>Bacterium Pasteurianum</i>)	15
Bierhefe (Schultheiß-Patzenhofer)	30
Bäckerhefe	36
Milchsäurebakterien (<i>Bacterium Delbrückii</i>)	115
Buttersäurebakterien (<i>Clostridium butyricum</i>)	136

Tabelle 2¹⁴⁾.

	mg Flavin
1 l Weißwein (Pfalz 1933, Oberhaardt)	0,125
1 l Apfelsinensaft	0,089
1 kg Hagebutten (frisch)	0,069
1 kg Bananen (geschält)	0,075
1 kg Aprikosen (getrocknet)	0,57
1 kg Tomatenmark (Boschi & Figli)	0,71
1 kg Karotten (frisch)	0,20
1 kg Spinat (frisch)	0,57
1 kg Heumehl	7,0
1 kg Kartoffeln (Pfälzer „Industrie“)	0,075
1 l helles Bier (Spaten, München)	0,29
1 kg Weizenkleie	0,33
1 kg Malzextrakt (E. Löflund)	2,10
1 kg Tannenhonig (1933, Deutscher Imkerbund)	1,06
1 kg Hefe (Löwenbräu, trocken)	18,0
1 l Menschenharn ¹⁵⁾	0,075
1 l Molke (Kuhmilch)	0,45
1 kg Eialbumin (trocken)	14,1
1 kg Rindsleber (frisch)	15,9
1 kg Dorschleber (frisch)	0,53

Tabelle 3¹⁶⁾.

Untersuchtes Material	Gesamtflavinegehalt in γ pro g Frischgew.	Untersuchtes Material	Gesamtflavinegehalt in γ pro g Frischgew.
Leber . . (Rind)	10–20	Auge . . . (Rind)	
Niere . . (Rind)	10–20	Netzhaut . . .	1–5
Nebenniere (Rind)	5–10	Pigmentepithel	0,5–1,0
Corpus luteum (Rind)	5–10	Auge . . (Schaf)	
Gehirn . . (Rind)	1–5	Netzhaut . . .	1–5
Ovarium . (Rind)		Auge (Kaninchen)	0,025–0,5
Stroma . . .	1–5	Auge . . (Huhn)	1–5
Follikelwand .	0,025–0,5	Auge . . (Fische)	10–20
Follikelsaft .	0,025	Blut . . . (Rind)	
Milz . . . (Rind)	0,5–1,0	Vollblut . . .	0,025
Lunge . . (Rind)	0,5–1,0	Serum	0,025
Hypophyse (Rind)		Roux-Sarkom (Huhn)	0,5–1,0
Vorderlappen	0,5–1,0	Jensen-Sarkom (Ratte)	0,025–0,5
Hinterlappen .	0,025–0,5		
Plazenta (Mensch)	0,5–1,0		

P. György u. R. Kuhn¹⁷⁾ fanden den Liquor eines Kindes mit Meningitis tuberculosa durch einen flavinähnlichen Farbstoff stark gelbgrün gefärbt; im normalen Liquor cerebrospinalis kommen nur Spuren von Flavin vor¹⁸⁾.

¹³⁾ Nach O. Warburg u. W. Christian, l. c. 10.

¹⁴⁾ Nach unveröffentlichten Versuchen von Dr. H. Kalt-smith.

¹⁵⁾ Th. Wagner-Jauregg u. H. Wollschütt, Naturwiss. 22, 107 [1934]. Das Urochrom, der Farbstoff, dem der normale Harn seine gelbe Farbe verdankt, gehört sicherlich nicht zur Gruppe der Flavine.

¹⁶⁾ H. v. Euler u. E. Adler, Ztschr. physiol. Chem. 223, 108 [1934].

¹⁷⁾ Naturwiss. 21, 405 [1933].

¹⁸⁾ F. Plaut u. K. Bossert, Klin. Wochschr. 13, 450 [1934].

Die Zahlen der Tabellen 1 und 2 wurden in der Weise gewonnen, daß Kochsäfte bzw. alkoholisch-wässrige Extrakte der fein zerkleinerten Produkte entweder direkt oder nach vorheriger Adsorption und Elution (siehe später) in alkalischer Lösung unter Kühlung der Bestrahlung mit dem Licht einer starken elektrischen Glühbirne unterworfen wurden. Dabei gehen die Flavine in die ebenfalls grüngelb gefärbten Lumiflavine über (siehe später), die sich nach dem Ansäuern der Lösung mit Chloroform ausschütteln lassen. Die quantitative Bestimmung erfolgte durch Colorimetrieren im Stufenphotometer. Die erhaltenen Zahlen stellen Mindestwerte dar, die besonders bei geringem Flavinegehalt bis zu 50% zu tief sein können. Die Werte der Tabelle 3 stützen sich auf quantitative Schätzungen durch direkte Fluoreszenzmessung von wässrigen Acetonextrakten, aus denen durch Entmischen mit Petroläther die lipoidlöslichen Stoffe entfernt worden waren. Dabei können natürlich fluoreszierende Begleitsubstanzen fehlerhafte Zahlen vortäuschen. Zur Entscheidung, ob in einem gegebenen Falle ein gewöhnliches Lyochrom vorliegt, sollte stets der Lumiflavin-Test (Bestrahlung in alkalischer Lösung) herangezogen werden. Es ist natürlich zu bedenken, daß es Derivate der Flavine geben könnte, welche bei Belichtung in alkalischer Lösung nicht chloroformlöslich werden.

Die Verbreitung der Lyochrome, wie sie aus den Tabellen hervorgeht, war zum Teil schon vorher bekannt aus biologischen Bestimmungen. Da das Vitamin B₂ ein Flavin ist (siehe später), geben frühere Untersuchungen über das Vorkommen des Vitamins B₂^{19, 20)} gleichzeitig Auskunft über den Flavinegehalt.

Die Flavine kommen teils in freier, dialysabler Form vor, wie in der Kuhmilch und in den Netzhäuten der Fische, teils undialysabel, wie im Spinat, in der Rinderleber und der Hefe, als gelbes, Warburgsches Oxydationsferment (Flavinenzym)²¹⁾. Es ist darin ein Flavin an Protein gebunden (Flavoprotein)²²⁾. Beim Kochen oder bei Behandlung mit Methanol oder Aceton wird die (niedrigmolekulare) Farbkomponente vom kolloiden Träger abgespalten.

Isolierung. Die Anreicherung der Flavine aus Lösungen kann nach Fällungsverfahren erfolgen, aus Leberkochaft beispielsweise folgendermaßen²³⁾: Fällung mit Bleiacetat: dabei wird die Hauptmenge des Flavins niedergeschlagen; Zerlegung der Bleifällung durch verdünnte Schwefelsäure. Fällung mit Phosphorwolframsäure in 1 n-schwefelsaurer Lösung; Entfernung der Phosphorwolframsäure aus dem flavinhaltigen Filtrat durch Ausschütteln mit Amylalkohol. Fällung mit Silbernitrat (oder Mercurisulfat) in saurer Lösung; das Flavin verbleibt dabei in Lösung. Fällung des Filtrates mit Silbernitrat bei neutraler Reaktion; Zerlegung der flavinhaltigen Silberfällung mit verdünnter Salzsäure. Ausfällung von Begleitstoffen (vor allem Salze und Glykogen) durch Alkohol.

Weit besser und weniger verlustreich ist die Reinigung mittels Adsorptionsmethoden. Gute Adsorptionsmittel sind Fullererde²⁴⁾ (in 1 n-mineralsaurer

¹⁹⁾ W. R. Aykroyd u. M. H. Roscoe, Biochemical Journ. 23, 483 [1929]. Aykroyd, ebenda 24, 1479 [1930]. Chick u. Copping, ebenda 24, 1764 [1930]. M. H. Roscoe, ebenda 24, 1754 [1930]; 25, 1205, 2050 [1931].

²⁰⁾ P. György, R. Kuhn u. Th. Wagner-Jauregg, l. c. 11.

²¹⁾ H. v. Euler u. E. Adler in: E. F. Nord u. R. Weidenhagen, Ergebnisse der Enzymforschung, III. Bd., S. 149 (1934).

²²⁾ H. Theorell, Naturwiss. 22, 289, 290 [1934].

²³⁾ B. Ch. Guha, Biochemical Journ. 25, 945 [1931]. P. György, R. Kuhn u. Th. Wagner-Jauregg, l. c. 11.

²⁴⁾ Für die Adsorption des Vitamins B₂ angegeben von A. Seidell, M. S. Publ. Health Rep. 31, 364 [1916]. W. D. Salomon, N. B. Guerrant u. J. M. Hays, Journ. biol. Chemistry 80, 91 [1928]. B. T. Narayanan u. J. C. Drummond, Biochemical Journ. 24, 19 [1930].

Lösung) und Frankonit KL²⁶) (bei neutraler Reaktion). Aus diesen Adsorbaten lassen sich die Flavine mittels Pyridin-Methanol-Wasser-Gemischen eluieren^{6, 7, 8}). Auch Bleisulfid ist ein geeignetes Adsorptionsmittel^{9, 12}).

Die Darstellung reinen, kristallisierten Lactoflavins aus Kuhmolke gestaltet sich danach folgendermaßen^{6, 26}): Adsorption des Farbstoffes an Fullererde; Elution mit Pyridinmischung. Adsorption an Frankonit; aus dem stark eingengteten Eluat werden Begleitstoffe, vor allem Kreatinin, durch Pikrinsäure niedergeschlagen. Nach dem Ausäthern der überschüssigen Pikrinsäure fällt bei starkem Einengen Lactoflavin in schönen, orangegelben Nadelchen aus. Die weitere Reinigung erfolgt über das gelb gefärbte Thallo- und das intensiv rote Silbersalz. Schließlich wird mehrmals aus 2 n-Essigsäure umkristallisiert. Ausbeute aus 1000 Liter Molken etwa 70 mg ganz reines Lactoflavin.

Physikalische und chemische Eigenschaften. Reines Lactoflavin besitzt die Summenformel $C_{17}H_{20}N_4O_6$ und schmilzt bei 278° (korrr., unter Zers.). Es ist löslich in Wasser (Sättigung bei etwa 0,025%, Zimmertemperatur), wenig in Alkohol (auch Amylalkohol und Cyclohexanol), unlöslich in Äther, Aceton, Chloroform, Benzol usw. Die grüngelb gefärbte, neutrale wäßrige Lösung zeigt intensiv gelbgrüne Fluorescenz²⁷), die auf Zusatz von Alkalien oder Mineralsäuren verschwindet. Der Extinktionskoeffizient einer 0,005%igen Lösung von reinem Lactoflavin in Wasser beträgt für eine Wellenlänge von 470 m μ $\epsilon = 1,45$ (Farbfilter S 47 des Zeißschen Stufenphotometers). Das Spektrum (Abb. 1) zeigt eine Bande im

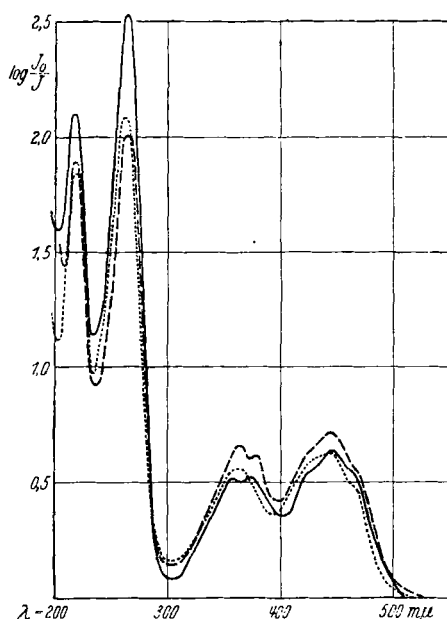


Abb. 1. — — — Lactoflavin, — Ovoflavin, Lumiflavin aus Hefe. Lösungsmittel = Wasser; c = 0,005%; d = 0,508 cm.

Sichtbaren mit dem Maximum bei 445 m μ , sowie eine im nahen und zwei (höhere) im fernen Ultraviolett (372, 269, 225 m μ). Die pH-Kurve der Fluorescenz²⁸) besitzt ein breites Optimum zwischen pH 3 und pH 9 und stellt

²⁵) Erhältlich bei: Pfirsching Mineralwerke, Kitzingen a. Main (Bayern).

²⁶) R. Kuhn, H. Rudy u. Th. Wagner-Jauregg, Ber. Dtsch. chem. Ges. 66, 1950 [1933].

²⁷) Die Lösungen reiner Flavine zeigen die Farbe und die Fluorescenz sehr verdünnten Trypaflavins, mit dem sie aber konstitutionschemisch nichts zu tun haben.

²⁸) R. Kuhn u. G. Moruzzi, Ber. Dtsch. chem. Ges. 67, 888 [1934].

die Dissoziationsrestkurve eines amphoteren Elektrolyten dar; nur die elektrisch neutralen Moleküle bzw. die Zwitterionen fluorescieren. Die Dissoziationskonstanten betragen $k_a = 63 \times 10^{-12}$ und $k_b = 0,5 \times 10^{-12}$ ($p_{ka} = 10,2$; $p_{kb} = 1,7$); der isoelektrische Punkt liegt bei $p_H = 6,0$. Optische Aktivität zeigt Lactoflavin nur in alkalischer, nicht in neutraler oder saurer Lösung ($[\alpha]_D$ in $n/20$ NaOH = -125°).

In der Bindung an den hochmolekularen Träger ist die Absorption nach dem Langwelligen verschoben; die honiggelb gefärbte wäßrige Lösung des „gelben Oxydationsferments“ aus Hefe zeigt im Sichtbaren Maxima bei 465 u. 495 m μ ⁵). Im Licht der Analysenquarzlampe fluorescieren die Lösungen gelbgrün.

Gegen Säuren, Oxydationsmittel, Brom und salpetrige Säure sind die Flavine sehr beständig; heißes Alkali zerstört unter starker Farbaufhellung. Bei der Acetylierung mit Essigsäureanhydrid in Pyridin gibt Lactoflavin ein chloroformlösliches Tetraacetat vom Schmp. 242–243° (unkorr., unter Zers.), das schon durch kalte, verdünnte Natronlauge sehr rasch verseift wird.

Durch Natriumhydrosulfit, Zinkstaub oder katalytisch erregten Wasserstoff werden die Flavine leicht zu farblosen Hydroverbindungen (Leuko-Flavinen) reduziert, die beim Schütteln mit Luft die ursprünglichen gelben, grün fluorescierenden Farbstoffe zurückbilden. Das Reduktions-Oxydations-Potential der Flavine beträgt bei p_H 7,0 etwa $-0,20$ V²⁹), ist also stark negativ. Demnach sind diese Farbstoffe sehr schwache Oxydations-, ihre Leukoverbindungen starke Reduktionsmittel. Bei der Einwirkung von Zink, Zinn, Natriumamalgam u. a. in mineral-saurer Lösung tritt eine rote Zwischenstufe der Reduktion auf, die eine radikalartige Monohydroverbindung darstellt^{30, 30a}).

Tabelle 4 enthält eine Zusammenstellung der Normal-Reduktions-Oxydations-Potentiale des Lactoflavins und einiger seiner Derivate (siehe später). Es ist bemerkenswert, daß auch die nur mehr schwach gefärbte Abbau-Oxocarbonsäure $C_{12}H_{12}N_2O_3$ noch das gleiche Potential wie Lactoflavin besitzt.

Tabelle 4 ^{30a}).

	pH 5,9	pH 7,0
Lactoflavin $C_{17}H_{20}N_4O_6$	— 0,146	— 0,21 Volt
Tetraacetyl-lactoflavin	— 0,126	— 0,19 „
Lumi-lactoflavin $C_{13}H_{12}N_4O_2$	— 0,156	— 0,22 „
Monomethyl-lumilactoflavin	— 0,151	— 0,22 „
Dimethyl-lumilactoflavin	— 0,136	— 0,20 „
Abbau-Oxocarbonsäure $C_{12}H_{12}N_2O_3$	— 0,136	— 0,20 „

Bei längerer Belichtung mit einer starken elektrischen Glühbirne oder, rascher, bei Ultraviolettbestrahlung werden die Flavine unter starkem Ausbleichen in irreversibler Weise zerstört. Belichtet man nach O. Warburg und W. Christian⁶) in alkalischer Lösung, dann läßt sich, nach dem Ansäuern, mit Chloroform ein Farbstoff ausschütteln (Lumiflavin), der in Farbe und Spektrum (Abb. 1) dem ursprünglichen Flavin zum Verwech-

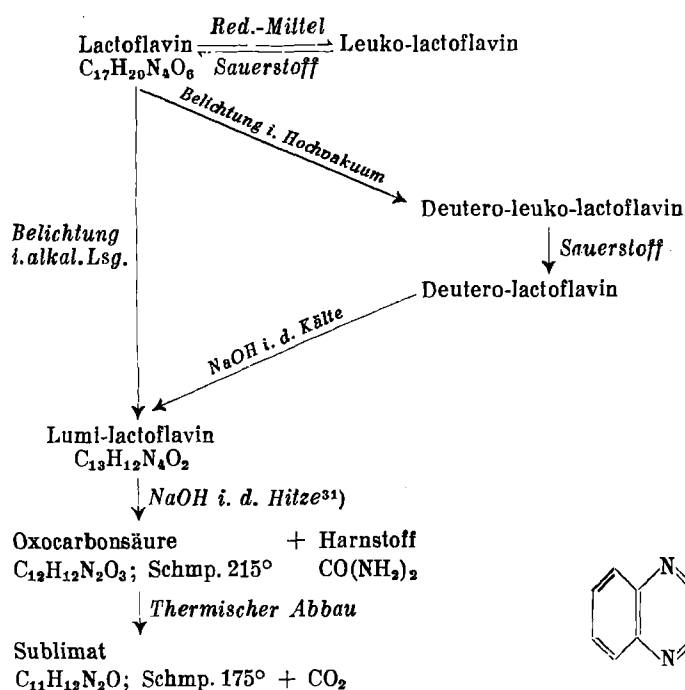
²⁹) K. G. Stern, Nature 132, 784 [1933]; 133, 178 [1934]. R. Bierich, A. Lang u. A. Rosenbohm, Naturwiss. 21, 496 [1933]; Ztschr. physiol. Chem. 223, 180 [1934].

³⁰) R. Kuhn u. Th. Wagner-Jauregg, Ber. Dtsch. chem. Ges. 67, 361 [1934]. Die Reduktion in mineral-saurer Lösung verläuft äußerlich ähnlich der des 3,6-Diamino-N-methyl-acridons, die zum Bis-trypaflavin führt. (P. Ehrlich u. L. Benda, Ber. Dtsch. chem. Ges. 46, 1931 [1913].) Das rote Reduktionsprodukt des Lactoflavins unterscheidet sich aber prinzipiell vom Bis-trypaflavin durch seine Unbeständigkeit in schwach saurer bzw. alkalischer Lösung: schon beim Abstumpfen der Salzsäure mit Na-Acetat kehrt, unter dem Einfluß des Luftsauerstoffs, die grüngelbe Farbe des Lactoflavins wieder.

^{30a}) R. Kuhn u. G. Moruzzi, Ber. Dtsch. chem. Ges. 67, im Druck [1934].

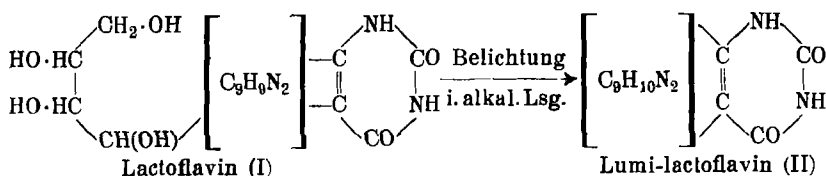
seln ähnlich ist. Die aus Hefe oder Milch gewonnenen Lumiflavine besitzen die gleiche Summenformel $C_{13}H_{12}N_4O_2$, schmelzen bei 330 bzw. 328° (korr., unter Zers.) und sind wahrscheinlich identisch. Belichtet man reines Lactoflavin in Wasser gelöst unter Ausschluß von Luft (Hochvakuum), dann hellt die gelbe Farbe stark auf, und es verschwindet die grüne Fluoreszenz. Beim Schütteln mit Luft kehrt die ursprüngliche Färbung und Fluoreszenz wieder; es wird aber dabei nicht Lactoflavin zurückgebildet. Die Lösung enthält nämlich einen neuen Farbstoff, Deutero-lactoflavin, der sich vom Lactoflavin dadurch unterscheidet, daß er durch Einwirkung von verd. Natronlauge im Dunkeln chloroformlöslich wird²⁰). Bei längerem Aufbewahren oder beim Belichten (an der Luft) von Deutero-lactoflavin-Lösungen erleidet dieser Farbstoff eine Veränderung, wobei die Eigenschaft, durch Einwirkung von Alkali chloroformlöslich zu werden, verlorengeht.

Chemische Konstitution. Die bisher erkannten chemischen Übergänge stellt folgende Übersicht dar:

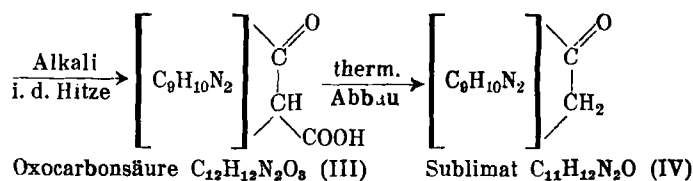


Die Abbau-Oxocarbonsäure $C_{12}H_{12}N_2O_3$ und das Sublimat $C_{11}H_{12}N_2O$ sind nur mehr schwach gelblich gefärbt.

Als vorläufige Konstitutionsformel wurde von R. Kuhn, H. Rudy und Th. Wagner-Jauregg²⁰) für Lactoflavin I vorgeschlagen. Die im obigen Schema angegebenen Abbaureaktionen würden sich danach folgenderweise formulieren lassen:

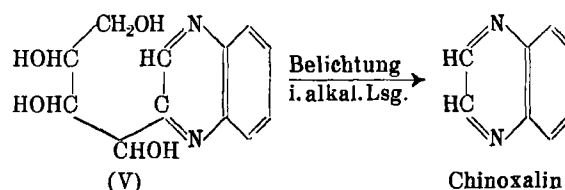


³¹) Der alkalische Abbau verläuft nicht einheitlich; neben der bicarbonatlöslichen Oxocarbonsäure $C_{12}H_{12}N_2O_3$ entsteht noch eine carbonatlösliche Substanz (R. Kuhn u. H. Rudy, Ber. Dtsch. chem. Ges. 67, 892 [1934]). Nach O. Warburg u. W. Christian (Biochem. Ztschr. 263, 228 [1933]) soll beim Barytabbau des Lumiflavins aus Hefe eine Verbindung $C_9H_{10}N_2O_2$ entstehen; siehe dagegen R. Kuhn u. H. Rudy, l. c.



Die hydroxylhaltige Seitenkette des Lactoflavins läßt seine Wasserlöslichkeit und die Bildung einer Tetraacetylverbindung verständlich erscheinen. Bei der Oxydation des Lactoflavins mit Bleitetraacetat nach Criegee werden 0,8 Mol Formaldehyd gebildet, woraus folgt, daß eine primäre Hydroxylgruppe in Nachbarschaft zu einem weiteren Hydroxyl vorliegt.

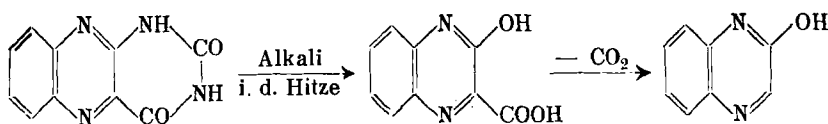
Für die photochemische Abspaltung der Seitenkette bei der Bildung des Lumiflavins kannte man bisher kein Analogon. R. Kuhn und F. Baer³²) konnten am einfacher gebauten Modell des 2-Tetraoxybutyl-chinoxalins (V) den völlig gleichen Verlauf der Lichteinwirkung in alkalischer Lösung zeigen:



Der in seiner Konstitution noch nicht aufgeklärte mittlere Teil $C_9H_{10}N_2$ des Lactoflavins besitzt jedenfalls an Kohlenstoff gebundene CH_3 -Gruppen, denn bei der Oxydation mit Chromsäure nach R. Kuhn und H. Roth³³) entsteht Essigsäure.

Aus dem Lumi-lactoflavin (II) konnten R. Kuhn und H. Rudy^{33a}) einen Mono- und einen Dimethylkörper darstellen. Die Methylreste sitzen darin an den Stickstoffatomen des Harnstoffrestes; beim alkalischen Abbau wird die gleiche Oxocarbonsäure $C_{12}H_{12}N_2O_3$ (III) wie aus dem unmethylierten Lumi-lactoflavin gebildet.

Die Abspaltung von Harnstoff aus dem Lumilactoflavin durch heißes Alkali läßt sich mit der Entstehung der 2-Oxy-chinoxalin-carbonsäure aus Alloxazin ($C_{10}H_6N_4O_2$) vergleichen:



Das Alloxazin zeigt auch bezüglich der Form seines Spektrums große Ähnlichkeit mit den Flavinen; allerdings sind die Banden gegen kürzere Wellenlängen verschoben (in 2 n NaOH etwa um 20 m μ gegen U.V.).

Wie viele natürliche Flavine kennt man? Aus Eiereiweiß haben R. Kuhn, P. György und Th. Wagner-Jauregg⁹) ein kristallisiertes Ovoflavin dargestellt, dessen Analysen auf die Summenformel $C_{17}H_{20}N_4O_6$ oder $C_{16}H_{20}N_4O_6$ passen und dessen Spektrum mit dem des Lactoflavins praktisch identisch ist (Abb. 1). Das Tetraacetat dieses Flavins schmilzt wie Lactoflavinacetat bei 242°, der Mischschmelzpunkt beider Verbindungen zeigt keine Depression. Dies spricht für eine Identität des aus Eiklar und aus Molken gewonnenen Farbstoffes. Auch das Lyochrom der Leber, das Hepaflavin, dürfte nach P. Karrer¹²) mit Lactoflavin identisch sein, desgleichen das Lactoflavin d von Ellinger und Koscharka⁶). Ob das

³²) Ber. Dtsch. chem. Ges. 67, 898 [1934].

³³) Ebenda 66, 1274 [1933].

^{33a}) Ebenda 67, 892 [1934].

selbe auch für das kürzlich von *W. Koschara*^{32a)} in kristallisierter Form erhaltene *Harn-Lyochrom*^{33b)} gilt, ist noch nicht sicher. Die farbschwachen *Lactoflavine* a, b und c⁶⁾ stellen wahrscheinlich keine einheitlichen Farbstoffe dar⁶⁾. Zweifellos sind die aus Hefe und Milch erhältlichen *Lumiflavine* dieselben. Die bisherigen Untersuchungen sprechen jedenfalls dafür, daß in Eiklar, Milch und Leber ein und dasselbe Flavin vorkommt. Biologische Beobachtungen am *Ovoflavin* (siehe unten) deuten darauf hin, daß daneben in geringerer Menge noch andere *Lyochromfarbstoffe* vorhanden sind. Für isomere Formen wären sterische Momente im Bau der zuckerähnlichen Seitenkette in Betracht zu ziehen, die mit ihren drei Asymmetriezentren die Möglichkeit zur Raumisomerie enthält. Durch Vergleich der optischen Aktivität der reinen Farbstoffe wird sich diese Frage näher prüfen lassen.

A. G. van Veen und *W. K. Mertens*³⁴⁾ haben zwei durch das *Bongkrek-Bakterium* erzeugte Giftstoffe isoliert, wovon der eine farblos, der andere eine intensiv gelbe, bei 172° schmelzende Substanz ist. *Bongkrek* ist ein aus Kokosnüssen dargestelltes, in Mitteljava häufig als Zuspense verwendetes Nahrungsmittel, welches zuweilen äußerst giftig werden kann. Die beiden holländischen Autoren vermuten auf Grund der Farbe, der schwachen, grünen Fluoreszenz, der Beständigkeit gegen Oxydationsmittel und der reversiblen Reduzierbarkeit, daß der erwähnte gelbe Giftstoff in die Klasse der *Lyochrome* gehört und bezeichnen ihn als „*Toxoflavin*“. Er besitzt die Summenformel $C_6H_6N_4O_2$, enthält eine Methylimid-Gruppe und ist somit isomer mit Methylxanthin. Ob zwischen dem *Toxoflavin* und den *Lyochromen* tatsächlich irgendwelche Beziehungen bestehen, wird erst durch weitere Untersuchungen entschieden werden können.

Biologische Bedeutung. Flavinpräparate verschiedenster Herkunft vermögen bei vitamin B_2 -frei ernährten Ratten Wachstum hervorzurufen. Einer Ratteneinheit (*Sherman-Bourquin*-Diät mit B_2 -Zulage) entspricht eine Tagesdosis von 7–10 γ reinstem, kristallisiertem *Lactoflavin*⁴¹⁾. Auch das *Lactoflavinacetat* besitzt Vitamin- B_2 -Wirkung (Einheit $\approx 20 \gamma$); die leichte Verseifbarkeit dieses Esters bei schwach alkalischer Reaktion läßt vermuten, daß er auch im Organismus hydrolytisch gespalten wird. Auch das gelbe *Warburgsche* Oxydationsferment ist in Mengen, die seinem Farbstoffgehalt entsprechen, als Vitamin B_2 wirksam. *Ovoflavin* ist dem *Lactoflavin* nicht gleichwertig; es vermag erst in höheren Dosen Wachstum an B_2 -frei ernährten Ratten hervorzurufen. Dies rührt offenbar daher, daß die kristallisierten *Ovoflavinpräparate* neben Vitamin B_2 (*Lactoflavin*) noch ein unwirksames oder weniger wirksames Flavin enthalten. Dem photochemischen Verhalten der Flavine entsprechend wird die Wirksamkeit von Vitamin B_2 -Lösungen bei längerem Bestrahlen mit sichtbarem Licht vernichtet^{6, 7)}. Vollkommen wirkungslos sind auch die *Lumiflavine*. *Deutero-lactoflavin* und das daraus bei längerem Aufbewahren entstehende Flavin (siehe oben) dürfte, nach vorläufigen Beobachtungen, viel weniger vitaminwirksam sein als *Lactoflavin*.

Die funktionelle Bedeutung des *Lactoflavins* als Vitamin B_2 ist wahrscheinlich die einer Vorstufe (Pro-

ferment) des gelben *Warburgschen* Oxydationsfermentes. Wie bereits erwähnt, ist in diesem Ferment ein Flavin gebunden an ein Protein (*Flavoprotein*). Es vermag nach *O. Warburg* und *W. Christian*⁵⁾ in Gegenwart eines weiteren Fermentes und eines Cofermentes Sauerstoff auf Hexosemonophosphorsäure zu übertragen^{34a)}. Die große Verbreitung der Flavoproteine läßt vermuten, daß das *Warburgsche* Oxydationssystem von allgemeinsten Bedeutung für den Zellstoffwechsel ist. In Form des Vitamins B_2 nimmt nun offenbar der tierische Organismus mit der vegetabilischen und animalischen Nahrung die Flavine zu sich, die er zum Aufbau des gelben Oxydationsfermentes benötigt. Da die Vitaminwirksamkeit anscheinend spezifisch auf das *Lactoflavin* beschränkt ist und beim *Lumiflavin* fehlt, spielt für die Bindung an die kolloide Trägersubstanz vielleicht die zuckerähnliche Seitenkette des *Lactoflavins* eine besondere Rolle.

Die sauerstoffübertragende Wirkung des Flavoproteins hängt innig mit dem reversiblen Redoxverhalten der Flavine zusammen. Im anaeroben Enzymversuch nach *Warburg* und *Christian* wird nämlich unter Dehydrierung der Hexose-monophosphorsäure die Flavinkomponente des gelben Oxydationsfermentes zur Leukoform reduziert; beim Schütteln mit Luft kehrt, unter Sauerstoffaufnahme, die gelbe Färbung wieder. Das Flavoprotein wirkt also als Wasserstoffakzeptor. Auch unter natürlichen Verhältnissen dürfte es in gleicher Funktion an der sauerstofflosen Atmung beteiligt sein. Die freien, ungebundenen Flavine und die *Lumiflavine* vermögen nicht als Sauerstoffüberträger, wohl aber als Wasserstoffakzeptoren bei enzymatischen Vorgängen mitzuwirken³⁵⁾; sehr wahrscheinlich ist diese Wirkungsweise gebunden an die gleichzeitige Anwesenheit des *Warburgschen* Systems des gelben Oxydationsfermentes³⁶⁾. Dieses Zusammenwirken von gebundenem und freiem Flavin hat vielleicht seine besondere Bedeutung; es können so in der Zelle in Gegenwart von sehr geringen Mengen des gelben Fermentes große Dehydrierungsleistungen durch die Mitwirkung des leicht diffundierbaren Flavins hervorgebracht werden.

In Tabelle 5 sind einige Unterscheidungsmerkmale der verschiedenen Formen der Flavine zusammengestellt.

Tabelle 5.

	Löslich in		Dialysierbarkeit	Wirksam als		
	H ₂ O	CHCl ₃		Vitamin B ₂	Sauerstoffüberträger	Wasserstoffakzeptor
Flavoprotein (gelb. Oxydationsferment, Flavinenzym) . . .	+	—	—	+	+	+
Flavin (Lyochrom)	+	—	+	+	—	+
Lumiflavin	+	+	+	—	—	+

[A. 60.]

^{32b)} Die Bezeichnung „Uroflavin“ trägt auch ein von *H. Reinwein* (Ztschr. ges. exp. Medizin 42, 228 [1924]) beschriebener wasserunlöslicher, pathologischer Harnfarbstoff.

³⁴⁾ Rec. Trav. chim. Pays-Bas 53, 257, 398 [1934].

^{34a)} Siehe dazu auch den Beitrag „Fermenthämone“ in der Reihe dieser Fortschrittsberichte II, Enzyme.

³⁵⁾ *Th. Wagner-Jauregg* u. *H. Ruska*, Ber. Dtsch. chem. Ges. 66, 1298 [1933].

³⁶⁾ *Th. Wagner-Jauregg*, *H. Rauen* u. *E. F. Möller*, Ztschr. physiol. Chem. 224, 67 [1934].