

Lactoflavin (Vitamin B₂)*).

Von Prof. Dr. RICHARD KUHN, Heidelberg.

Kaiser Wilhelm-Institut für medizinische Forschung, Institut für Chemie.

(Eingeg. 17. Dezember 1935.)

Inhalt: Isolierung, Wachstumswirkung. — Abbau, Vorstufe eines Ferments (Pro-Ferment). — Synthese des Lumiflavins. — Die hydroxylhaltige Seitenkette. — Synthese des Lactoflavins. — Zwischenprodukte, Borsäureverfahren. — Spezifität. — Flavinglucoside. — Phosphorsäureester. — Bios, Vitamin, Pro-Ferment, Co-Ferment, Ferment.

In der Milch, der einzigen Nahrung junger Säugetiere, sind unter normalen Umständen alle für das Wachstum erforderlichen Stoffe in reichlicher Menge vorhanden. Besondere Beachtung verdienen 2 Farbstoffe, die in der Milch vorkommen und als Vitamine erkannt wurden. Das Carotin, die Vorstufe des fettlöslichen A-Vitamins, geht beim Zentrifugieren der Milch in den Rahm (1) und bedingt die gelbe Farbe der Butter. Der andere Farbstoff ist wasserlöslich; er bleibt bei der Käsebereitung zum größten Teil in Lösung (2) und bedingt die schwach grünstichig gelbe Farbe der Molke.

A. Isolierung, Wachstumswirkung.

Vor 2½ Jahren haben wir (*Th. Wagner-Jauregg*) einen gelben, intensiv grün fluoreszierenden Farbstoff aus Molke in schön kristallisierter Form isoliert (3). Er hat die Zusammensetzung C₁₇H₂₀N₄O₆, Schmelzpunkt 292° (Zersetzung), $[\alpha]_D^{20} = -110^\circ$ (n₁₀ NaOH) und schmeckt stark bitter. Dieser Farbstoff hat den Namen Lactoflavin erhalten. Aus 5400 l Molke wurde damals 1 g gewonnen**), inzwischen haben wir mehr als die 15fache Menge Molke verarbeitet. Herr *Paul György*, mit dem wir diese Untersuchung in Angriff genommen hatten, hat gefunden (4), daß das Lactoflavin ein unentbehrlicher Bestandteil der Nahrung für junge Ratten ist. Füttert man diese mit einer Kost, die neben den fettlöslichen Vitaminen A und D nur das antineuritische Vitamin B₁ und einen Hefeextrakt, der künstlich von Flavin befreit wurde, enthält, so bleibt das Wachstum stehen. Gibt man 0,008 mg reines Lactoflavin je Tag und Tier hinzu, so erhält man eine Gewichtszunahme von 40 g in 30 Tagen. Wir bezeichnen das Lactoflavin als Vitamin B₂ und drücken damit aus, daß es sich um dasjenige Vitamin der B-Gruppe handelt, das nächst dem Vitamin B₁ (Aneurin) in reiner Form isoliert wurde. Das Lactoflavin hat aber, wie *P. György* (5) gezeigt hat, nichts zu tun mit der Heilung pellagraähnlicher Hauterkrankungen, die man zu einer Zeit, als es nur 2 Vitamine der B-Gruppe zu geben schien, auf B₂-Mangel zurückgeführt hat. Dem Antipellagra-Vitamin hat *P. György* (6) die Bezeichnung B₆ gegeben. Das Lactoflavin (Vitamin B₂) ist in erster Linie Wachstumsfaktor, nicht Hautfaktor.

B. Abbau, Vorstufe eines Ferments (Pro-Ferment).

Wegweisend für die Erkennung der biologischen Funktion und für die Konstitutionsaufklärung des neuen Vitamins war eine schon 1932 gemachte Beobachtung von *O. Warburg* (7), daß in der Hefe ein gelber Farbstoff, gebunden an einen kolloiden Träger, ein gelbes Ferment, vorkommt. Durch Einwirkung von Licht in alkalischer Lösung war es *O. Warburg* und *W. Christian* (8) gelungen, ein chloroformlösliches Abbauprodukt C₁₃H₁₂N₄O₂ zu gewinnen, das mit verdünntem Alkali in der Hitze Harnstoff abspaltet. Das von uns isolierte kristallisierte Vitamin verhielt sich bei der alkalischen Photolyse gleichartig. Auf Grund des weiteren Befundes, daß auch in tierischen Organen — sowie in der Hefe — das gelbe Vitamin hochmolekular gebunden

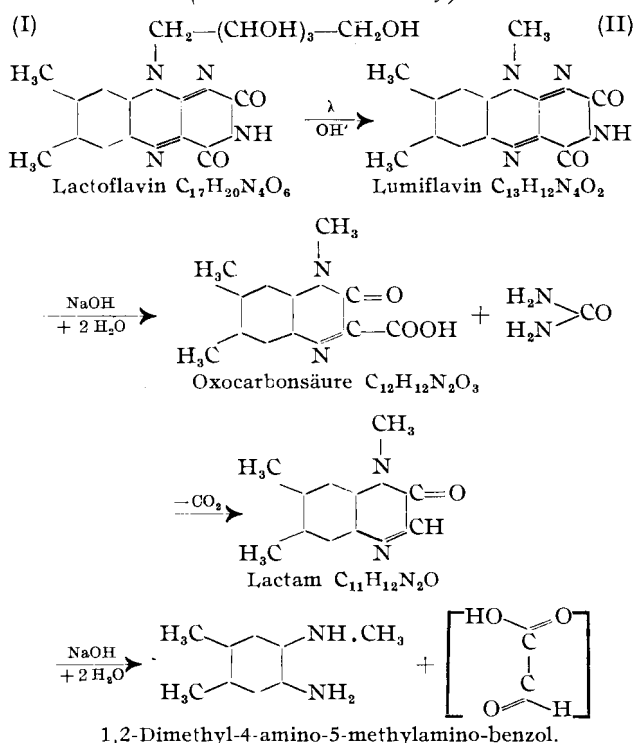
ist (9), kamen wir zu der Vorstellung (10), daß das Vitamin B₂ offenbar für die Synthese eines gelben Fermentes im Tierkörper benötigt wird, daß also die Farbstoffgruppe dieses Ferments vom Tier nicht aus anderweitigen Bestandteilen der Nahrung aufgebaut werden kann, sondern als solche mit der Nahrung aufgenommen werden muß.

Den Weg der Konstitutionsaufklärung, der uns vom Lactoflavin bis zu dem merkwürdigerweise noch unbekannten 1,2-Dimethyl-4-amino-5-methylamino-benzol geführt hat (11), zeigt Tabelle 1.

Tabelle 1.

Abbau des Lactoflavins.

(R. Kuhn und H. Rudy).



Die Identifizierung der Base C₉H₁₄N₂, von der wir zunächst nur 25 mg in Händen hatten, war durch einen glücklichen Zufall erleichtert. Sie gab mit FeCl₃ eine blaugrüne Farbreaktion! Aus dem Vergleich der Absorptionsspektren von Base und Salz und aus der Bruttogleichung der letzten Hydrolyse wußten wir, daß es sich um ein aromatisches o-Diamin handeln müsse. Diese geben aber alle braunrote FeCl₃-Reaktionen; nur wenn beide p-Stellungen besetzt sind, tritt, wie *E. Noetting* gefunden hatte, Blaufärbung ein. Damit schieden von 10 Isomeriemöglichkeiten 9 aus.

C. Synthese des Lumiflavins.

Bevor noch der systematische Konstitutionsbeweis, über den ich eben berichtet habe, zum Abschluß gekommen war, hatten wir auf eine große Ähnlichkeit der Flavine mit den von *O. Kühling* (12) entdeckten Alloxazinen hingewiesen und diese durch zahlreiche Vergleiche belegt (13). *K. G. Stern* und *E. R. Holiday* (14) haben daraufhin gefunden, daß man durch Einwirkung von schmelzenden Alkalialkylsulfaten auf

*) Teilweise vorgetragen vor der Fachgruppe für organische Chemie und Biochemie auf der 48. Hauptversammlung des V.d.Ch. zu Königsberg am 4. Juli 1935.

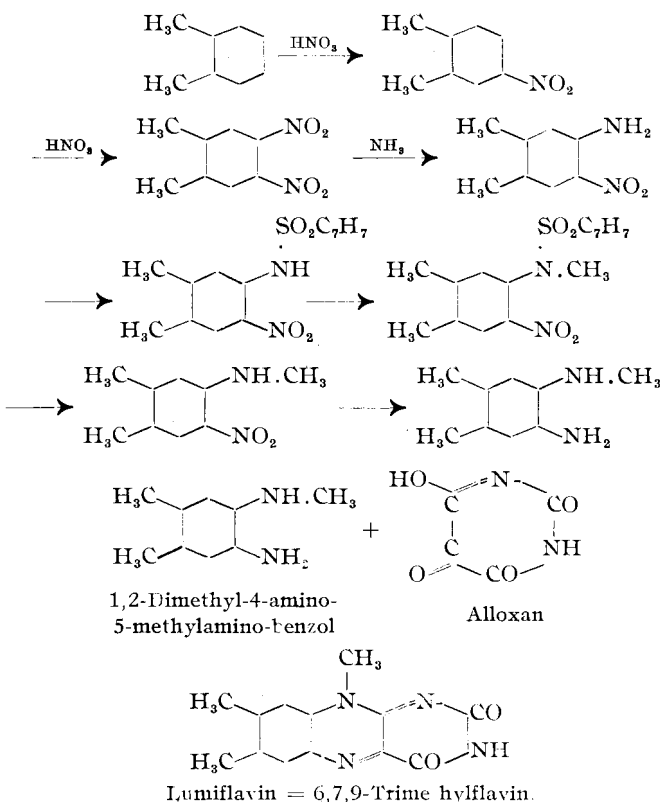
**) 1 l Molke enthält durchschnittlich 0,5 mg Lactoflavin.

Alloxazine in geringer Menge Verbindungen erhält, die alle wesentlichen Merkmale der Flavine zeigen. Wir selbst haben eine für die Konstitution beweisende Synthese aufgefunden, die schon bei gelinder Wärme in wäßriger Lösung verläuft und in den einfachsten Fällen ohne weiteres Flavinausbeuten von etwa 95% der Theorie liefert. Sie beruht auf der Kondensation von N-monosubstituierten aromatischen o-Diaminen mit Alloxan in saurer Lösung (*R. Kuhn und F. Weygand*) (15).

Die Synthese des Lumiflavins (16), die wir ausgeführt haben, ist aus Tabelle 2 ersichtlich.

Tabelle 2.

Synthese des Lumiflavins
(*R. Kuhn, K. Reinemund und F. Weygand*).



Aus 1 kg des Nitroxylidins kann man 1,15 kg Lumiflavin darstellen, wozu auf dem früheren Wege die Verarbeitung von 7 Millionen Liter Milch erforderlich gewesen wäre.

D. Die hydroxylhaltige Seitenkette.

Bei der Belichtung in alkalischer Lösung verliert das gelbe Vitamin C₁₇H₂₀N₄O₆ einen Rest C₄H₈O₄. Es handelt sich um eine nicht glucosidisch gebundene zuckerähnliche Seitenkette, deren Konstitutionsaufklärung mit *Th. Wagner-Jauregg* und *H. Rudy* wie folgt gelang:

1. Das Vitamin gibt eine Tetraacetylverbindung; Lumiflavin läßt sich nicht acetylieren. Die 4 Sauerstoffatome gehören somit Hydroxylgruppen an (17).
2. Die 4 Hydroxyle sind paarweise benachbart, da man eine Diacetonverbindung darstellen kann (18).
3. Mit Bleitetraacetat nach *R. Criegee* erhält man 0,8 Mol Formaldehyd (19).
4. Die Methylimidgruppe des Lumiflavins bildet sich erst bei der Belichtung (20). Das Vitamin selbst ist methylimidfrei.

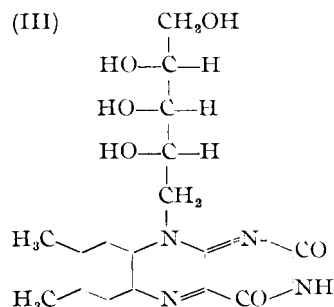
Aus diesen Feststellungen war zu schließen, daß eine normale Tetraoxybutylgruppe abgespalten wird, —CHOH.CHOH.CHOH.CH₂OH, und daß diese durch eine CH₂-Gruppe, die nach der Belichtung als Methylimid auftritt, an N gebunden ist.

E. Synthese des Lactoflavins.

Die Entscheidung zwischen den 8 Stereoisomeren, welche die Formel I zuläßt, ist durch Synthese erbracht worden. Wir haben Pentosamine mit 1,2-Dimethyl-4-nitrobenzolen, die in 5-Stellung reaktionsfähige Substituenten (Halogene, Nitro, -Toluolsulfo-) tragen, kondensiert. Die in Ausbeuten bis zu 65% der Theorie erhaltenen Nitraniline wurden reduziert und die Diamine der Kondensation mit Alloxan unterworfen.

Der Farbstoff C₁₇H₂₀N₄O₆ aus l-Arabinose (6,7-Dimethyl-9-l-araboflavin), den wir zuerst darstellten, zeigte bereits Wachstumswirkung an B₂-Tieren (21). Obwohl die Drehungswerte und die Schmelzpunkte sehr nahe liegen und letztere keine Depression geben, steht nach eingehendem Vergleich (18) die Verschiedenheit von Lactoflavin außer Frage. Der synthetische Farbstoff C₁₇H₂₀N₄O₆ aus d-Xylose (6,7-Dimethyl-9-d-xyloflavin), war nach Schmelzpunkt und Drehungsvermögen wieder äußerst ähnlich, aber im Tierversuch deutlich weniger wirksam. Da in beiden Fällen (l-Arabinose, d-Xylose) die dem Chromophor zunächst stehende Hydroxylgruppe die Richtung des Drehvermögens bestimmt, kam nur noch die Anordnung der l-Lyxose und der d-Ribose für das linksdrehende natürliche Vitamin in Frage. Wir haben, da die l-Lyxose in der Natur noch nicht aufgefunden wurde, die d-Ribose aber einen bekannten Baustein der Nucleoside darstellt, erwartet, daß das Lactoflavin stereochemisch der d-Ribose entsprechen wird (18).

Die Synthese des 6,7-Dimethyl-9-d-riboflavins, die etwa gleichzeitig in Zürich (22) mit natürlicher d-Ribose und in Heidelberg (23) mit synthetischer d-Ribose (Totalsynthese) ausgeführt wurde, hat diese Erwartung bestätigt.



Lactoflavin C₁₇H₂₀N₄O₆ (Vitamin B₂, 6,7-Dimethyl-9-d-riboflavin, 6,7-Dimethyl-9-[d-ribityl]-iso-alloxazin).

Tabelle 3.

Vergleich von natürlichem und synthetischem Lactoflavin (III).

Lactoflavin	synthetisch	natürlich
Schmp. (Zers.)	292°	292°
Schmp. d. Tetra-acetyl-lactofl.	242°	242°
[α] _D ²⁰ in n/20 NaOH.	— 110° ± 5°	— 110° ± 5°
[α] _D ²⁰ in n/20 NaOH + ^{ges} 2 Borax	+ 365° ± 10°	+ 360° ± 5°
10 γ je Tag und Ratte:		
mittl. Gewichtszunahme pro Tag	1,43 g	1,45 g

Die in Zürich beobachteten Schmelzpunkte sind 10° bzw. 4° niedriger, stimmen aber untereinander überein; ebenso die Tierversuche, die *H. v. Euler* (22) in Stockholm mit den Präparaten *P. Karrers* und *P. György* (24) in Cambridge mit den unseren zur Überprüfung der eigenen Befunde ausgeführt haben.

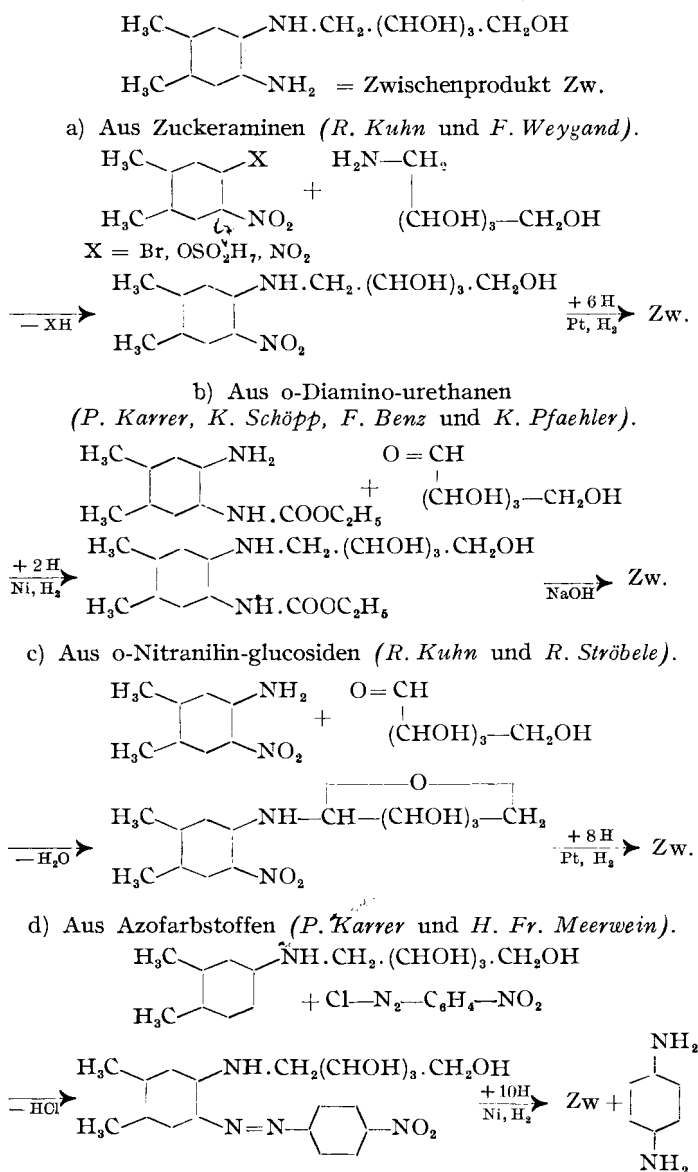
F. Zwischenprodukte, Borsäureverfahren.

N-substituierte Zuckeramine sind vor mehreren Jahren von *A. Skita* (25) durch katalytische Hydrierung von Pentosen + prim. Aminen, z. B. von Arabinose mit Cyclohexylamin leicht zugänglich gemacht worden. *P. Karrer* (26) hat ge

funden, daß sich die für unsere Flavinsynthese erforderlichen N-monosubstituierten o-Diamine in entsprechender Weise gewinnen lassen, wenn man die eine Aminogruppe durch die Carbäthoxygruppe schützt. Diese läßt sich im Gegensatz zur Acetylgruppe durch alkalische Verseifung nach der hydrierenden Kondensation wieder abspalten, freilich unter großen Verlusten.

Tabelle 4.

Synthesen von N-Tetraoxyamyl-o-phenylendiaminen



Die verlustreichste Stufe der Vitaminsynthese blieb in allen Fällen der letzte Schritt: die Kondensation mit Alloxan. Die Ausbeuten blieben trotz vieler Mühe unter 10% der Theorie. Eine systematische Untersuchung, die *A. H. Cook* (27) angestellt hat, ergab, daß die Ausbeuten in unerwartetem Maße von den Substituenten abhängen. Sie können unter gleichen äußeren Bedingungen nahezu 100%, aber auch praktisch 0% betragen.

Die Flavinsynthese liefert wunderbare Beispiele für den Einfluß von Substituenten auf die chemische Reaktionsfähigkeit. Auf eine theoretische Deutung der Befunde gehe ich hier nicht ein, ich will nur die praktische Frage der Synthese behandeln. Wir haben gefunden, daß man durch Zusatz von Borsäure, namentlich in Eisessig, die Ausbeuten an 6-Nitro-9-methylflavin nahezu theoretisch machen kann (27). Zufällig liegen die Verhältnisse bei den 6,7-Dimethyl-9-pentosylflavinen, zu denen das Lactoflavin gehört, genau so (28). Durch Zusatz von Borsäure haben wir

Ausbeuten von 95% der Theorie erreicht. Das Borsäureverfahren hat weiterhin die noch unbekannten Flavine, die in 9-Stellung aromatische Substituenten tragen, und viele andere in sehr guten Ausbeuten zugänglich gemacht. Die 9-Arylflavine sind äußerst beständige orangegelbe Farbstoffe, die ohne Anzeichen von Veränderung über 360° erhitzt werden können.

G. Spezifität (29).

Die Wachstumswirkung des Lactoflavins ist von geringen Änderungen der Konstitution und Konfiguration in hohem Maße abhängig. Bisher haben wir 27 Flavine in reinem Zustande synthetisch dargestellt. Bei der Prüfung im Tierversuch fanden wir:

1. Die NH-Gruppe in 3-Stellung muß frei sein. 3-Methyl-lactoflavin ist unwirksam.

2. Die beiden am Benzolkern haftenden Methylgruppen dürfen nicht weggelassen werden. 9-d-Ribitylflavin zeigt gar keine Wachstumswirkung.

3. Die Hydroxylgruppen der Seitenkette dürfen verestert werden. Das in Chloroform lösliche Tetraacetyl-lactoflavin ist nahezu ebenso wirksam wie das freie Vitamin. Dasselbe trifft für einen synthetischen Vitamin-B₂-Phosphorsäure (30) zu, deren Einheitlichkeit auf Grund der Synthese nicht feststeht, die aber völlig frei von unverestertem Lactoflavin erhalten wurde (31). Genau übereinstimmend mit Lactoflavin ist die Wachstumswirkung des Cytoflavs, des mit *H. Rudy* aus Herzmuskel isolierten natürlichen Flavinphosphorsäureesters (31). Die Paarung mit Phosphorsäure ist also für die Vitaminwirksamkeit belanglos.

4. Diacetonlactoflavin ist wirksam. Vermutlich werden die Hydroxyle der Seitenkette schon durch die Magensalzsäure freigelegt.

5. Flavinglucoside, namentlich auch das 6,7-Dimethyl-9-d-ribosidoflavin haben keine Vitaminwirkung.

6. Die im Benzolkern unsubstituierten (nicht methylierten) Flavine sind wirkungslos, mag sich die 9-ständige Seitenkette von der d-Glucose, 1-Arabinose, d-Arabinose, d-Xylose, d- oder 1-Ribose ableiten.

7. Von den 6,7-Dimethylflavinen zeigen die 9-1-Arabitlyl- und die 9-d-Xylitlylverbindung im Gegensatz zur 9-d-Arabitlyl- und 9-d-Sorbitlylverbindung Wachstumswirkung. Die Derivate der 1-Arabinose und d-Xylose wirken mitunter nur wenige Wochen (Gewichtszunahmen von durchschnittlich 30 g auf 60 g) mitunter nachhaltig (von 30 g auf 100 g). Die Einheitswirkung des Lactoflavins (40 g Zuwachs in 30 Tagen mit 8γ) konnte aber auch mit großen Mengen (150 γ je Tag) noch nie erreicht werden. Diese noch ungeklärten Tatsachen gestatten vorläufig nur den immerhin bemerkenswerten Schluß, daß man die Wirksamkeit gewisser Flavine nicht durch einen einfachen Zahlenfaktor zu derjenigen des natürlichen Vitamins in Beziehung setzen kann, wie es etwa bei Gluco-, Rhamno-ascorbinsäuren usw. möglich ist. Dies hängt offenbar mit der Paarung an Eiweiß (Fermentsynthese) im Tierkörper zusammen. Ohne jede Wachstumswirkung fanden wir 6,7-Dimethyl-9-d-glucoflavin, seine Penta-acetylverbindung und sein 3-Methylderivat.

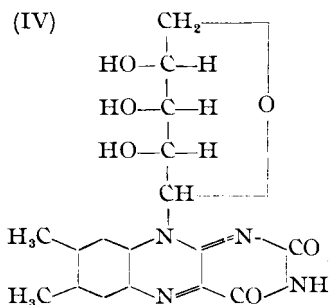
8. Unwirksam sind alle bisher geprüften Flavine, die in 9-Stellung Alkyl (Methyl, n-Amyl, n-Pentadecyl), Cycloalkyl (Cyclohexyl, Cyclopentadecyl), Aralkyl (Benzyl) und Aryl (Phenyl) tragen ebenso wie die in 3-Stellung methylierten Derivate. Hier ist keine Gelegenheit zur Bildung von Phosphorsäureestern und damit zur spezifischen Bindung an Eiweiß gegeben.

Alle Angaben (ausgenommen 5) gelten für die Ratte bei peroraler Verabreichung der Flavine. Die als unwirksam bezeichneten Präparate haben in Mengen von 50–100 γ

je Tag im Laufe von 3 Wochen keine Gewichtszunahme bewirkt. Größere Mengen sind bisher erst ausnahmsweise geprüft worden. Die unter 3. angeführten Ester können im Tierkörper Hydrolyse bzw. Umesterung erfahren und erst auf diesem Wege in Ferment übergehen. Subcutan (nicht peroral) wurden wegen ihrer außerordentlichen Säureempfindlichkeit die unter 5. genannten Flavinglucoside (Nucleoside) gegeben. Mehrere der unter 7. genannten Flavine sind auch von *P. Karrer* dargestellt und von *H. v. Euler* (32) im Tierversuch geprüft worden. Die Ergebnisse weichen in Einzelheiten von unseren ab. Mit den aus d-Arabinose dargestellten Farbstoffen haben wir z. B. nie auch nur die geringste Wachstumswirkung beobachtet.

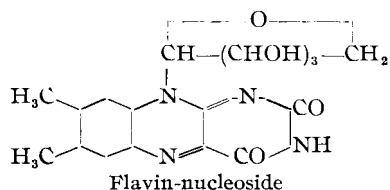
H. Flavinglucoside (33).

Eine an Stickstoff gebundene Pentitkette, wie sie im Lactoflavin vorliegt, ist bei anderen Naturprodukten noch nicht beobachtet worden. Es ist nicht ausgeschlossen, daß in den grünen Pflanzen das Vitamin durch Reduktion eines d-Ribosids gebildet wird, eines Nucleosids, in dem ein Pyrimidin- oder Purin-kern durch das 6,7-Dimethylflavin vertreten ist. Diese hypothetische Vorstufe, das 6,7-Dimethyl-9-d-ribosidoflavin (IV), C₁₇H₁₈N₄O₆, [α]_D²⁰ = +480° (Pyridin), ist nebst anderen Flavinglucosiden mit *R. Ströbele* synthetisch dargestellt worden. Es zeichnet sich durch großes Kristallisationsbestreben und außerordentliche Empfindlichkeit gegen Säuren aus; es wird auch von verd. Alkalien leicht gespalten. Die sehr ergiebige Synthese der Flavinglucoside macht von dem Kunstgriff Gebrauch, die Hydrierung der o-Nitranilinglucoside so zu leiten, daß nur NO₂ zu NH₂ reduziert wird. Die o-Phenylen-diaminglucoside werden mit Alloxan-borsäure kondensiert.

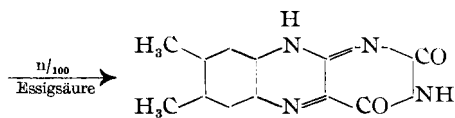


6,7-Dimethyl-9-d-ribosidoflavin C₁₇H₁₈N₄O₆
(glucosidische Vorstufe des Vitamins B₂, Flavin-nucleosid).

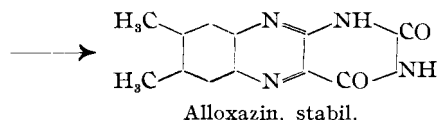
Die Tatsache, daß die neuen Farbstoffglucoside schon durch $n/100$ Essigsäure in kurzer Zeit hydrolysiert werden, weckte den Wunsch, die noch unbekannte Stammsubstanz des Vitamins, das 6,7-Dimethylflavin = 6,7-Dimethyl-isoalloxazin zu fassen. Wir konnten aber bei der Hydrolyse nur das bekannte stabile 6,7-Dimethylalloxazin isolieren.



Flavin-nucleoside



Stammsubstanz Flavin = Iso-alloxazin, nicht faßbar



Alloxazin, stabil.

J. Phosphorsäureester.

H. Theorell (34) ist es gelungen, das gelbe Ferment aus Hefe durch Kataphorese so weit zu reinigen, daß es kristallisiert. Das von ihm dargestellte Chromoprotein enthält etwa 0,45% Farbstoff (C₁₇H₂₀N₄O₆), was einem Molekulargewicht von etwa 80000 entspricht. Er konnte, ähnlich wie beim Hämoglobin, durch Dialyse gegen kalte verdünnte Salzsäure, die Farbstoffkomponente, die sich als Flavinphosphorsäureester erwies, abtrennen und diese mit dem farblosen, nicht dialysierten Eiweiß wieder kuppeln: er erhielt wieder gelbes Ferment mit der ursprünglichen katalytischen Wirksamkeit.

Die Vorstellung von *R. Willstätter* (35), daß ein Ferment aus einem kolloiden Träger und einer chemisch wirksamen Gruppe besteht, hat damit im vorliegenden Falle klare Gestalt angenommen. Der farblose kolloide Träger kann selbst schon als Ferment betrachtet werden, die thermostabile Flavinphosphorsäure als Co-Ferment. Es bildet sich also aus dem gelben Co-Ferment und dem farblosen Ferment ein neues Ferment: das gelbe. Diese Mannigfaltigkeit der Funktionen ist höchst bemerkenswert. Die folgende Tabelle gibt die wichtigsten unterscheidenden Merkmale für die verschiedenen Bindungsformen des Lactoflavins, die in der Natur angetroffen wurden, an:

Tabelle 5.

Eigenschaften der Flavine.

Konstitution	Eigenschaften	Farbe	Dial.	Kat.	CHCl ₃
F—R—Ph—Pr	Ferment	orange	—	+	—
F—R—Ph	Co-Ferment	gelb	+	+	—
F—R	Vitamin	gelb	+	—	—
F	H ₂ -Acceptor	gelb	+	—	+

F = Farbstoff-Komponente (Flavin); R = d-Ribitylrest; Ph = Phosphorsäure; Pr = Protein (Eiweiß); Dial. = Verhalten bei der Dialyse; Kat. = Verhalten bei der Kataphorese; CHCl₃ = Löslichkeit in Chloroform.

Mit der Milch, ob roh oder gekocht, nehmen wir freies Lactoflavin zu uns (36). In der Fleischbrühe, in gekochten Gemüsen usw. findet sich das Vitamin vorzugsweise als Phosphorsäureester. Soweit in der Rohkost das Vitamin an Eiweiß gebunden ist, wird dieses schon im Magen zum größten Teile abgespalten.

Die Flavinphosphorsäure aus dem gelben Ferment der Hefe ist vermutlich identisch mit dem 1932 von *J. Bonga* und *A. v. Szent-Györgyi* (37) im Herzmuskel aufgefundenen Cytoflav, an dem die ungarischen Forscher erstmals die durch O₂ reversible Bildung einer Leukoverbindung beobachteten, die später auch am gelben Ferment und am Lactoflavin erkannt wurde.

K. Bios, Vitamin, Pro-Ferment, Co-Ferment, Ferment.

Die Hefe ist, soviel wir wissen, in ihrem Wachstum nicht abhängig von der Zufuhr von Lactoflavin. Gewisse Milchsäurebakterien sind aber darauf angewiesen, wie *S. Orla-Jensen* (38), Kopenhagen, mit reinem Vitamin B₂, das wir ihm zur Verfügung stellten, gefunden hat. Das Lactoflavin hat für diese Bakterien eine ähnliche Bedeutung wie ein Biosfaktor für die Hefe. In den Milchsäurebakterien, die nach *O. Warburg* reichlich gelbes Ferment enthalten, ist die Bestimmung des Lactoflavins offenbar dieselbe wie bei der Hefe und beim Säugetier: durch Veresterung mit Phosphorsäure ein gelbes Co-Ferment (Cytoflav) zu bilden, das mit einem spezifischen farblosen Eiweißkörper weiter unter Bildung eines gelben Fermentes reagiert. In den Zellen wird nach *O. Warburg* das gelbe Ferment durch die reduzierte Form des von ihm entdeckten Co-

Fermentes zum Leukoferment hydriert, das mit Luft-sauerstoff neben H₂O₂ gelbes Ferment zurückbildet. Denselben Mechanismus hat *H. v. Euler* für die Reaktion des gelben Ferments mit der reduzierten Form der Co-zymase, die an der alkoholischen Gärung beteiligt ist, nachgewiesen. Ganz ähnlich wie bei der Dehydrierung von Glucose-phosphorsäure zu Phosphogluconsäure (*O. Warburg*) bei der alkoholischen Gärung und der Dehydrierung von Alkohol (*H. v. Euler*) dürfte das gelbe Ferment bei den von *Th. Wagner-Jauregg* aufgefundenen Dehydrierungen der Äpfelsäure, Citronensäure, Isocitronensäure und Glycerinphosphorsäure beteiligt sein, die durch gelbes Ferment katalysiert werden. Das an sehr enge konstitutive und konfigurative Grenzen gebundene Pro-Ferment Lactoflavin entfaltet also nach Übergang in das Ferment überraschend allgemeine, sehr wenig spezifische Wirkungen als Wasserstoffüberträger. Spezifisch sind die Dehydrasen („Zwischenfermente“), welche den Wasserstoff der organischen Zellsubstanzen im Sinne von *H. Wieland* aktivieren und damit die Nicotinsäureamidgruppen (39) der ihnen zugeordneten farblosen Co-Fermente beladen (*O. Warburg*). Die hydrierten Co-Fermente können aber den Wasserstoff nicht unmittelbar im Sinne *H. Wielands* an O₂ unter Bildung von Hydroperoxyd abgeben. Sie müssen vielmehr ihren Wasserstoff zunächst noch an das mit Eiweiß gepaarte gelbe Vitamin weitergeben. Erst die Leukoform des gelben Ferments reagiert mit O₂ unter Bildung von H₂O₂ und Rückbildung des gelben Ferments (*O. Warburg*).

Gemessen an der Mannigfaltigkeit seiner Wirkungen und an der Tiefe des Einblicks in seine Wirkungsweise übertrifft heute das Vitamin B₂ alle anderen Vitamine. In klinischer Hinsicht ist jedoch festzustellen, daß eine menschliche Avitaminose, die auf Mangel an Lactoflavin beruht, bisher noch nicht mit Sicherheit bekannt ist.

Unsere Untersuchungen sind in vielfältiger Weise gefördert worden vom Werk *Elberfeld* der *I.G.-Farbenindustrie A.-G.* Es ist mir ein aufrichtiges Bedürfnis, dem Direktor, Herrn Prof. Dr. *H. Hörlein*, hierfür den herzlichsten Dank auszusprechen. Auch dem Werk *Ludwigs-hafen* der *I.G.-Farbenindustrie* sind wir für Unterstützung zu Dank verpflichtet.

Die geschilderte Erschließung einer neuen Farbstoffklasse, zu der verschiedene biologisch wichtige Naturprodukte gehören, gründet sich auf die Kondensation von N-monosubstituierten aromatischen o-Diaminen mit Alloxan. Diese Kondensation hatte *O. Kühling* (40) bereits lange vor uns ausgeführt — aber in neutraler, alkoholischer Lösung. Dabei tritt nur 1 Mol Wasser aus. Aus den entstehenden Produkten läßt sich ein zweites Mol Wasser auch durch starke Säuren nicht mehr abspalten. Der entscheidende Schritt war — von Anfang an etwas Säure zuzugeben. Dies hätte die Entdeckung der Flavine schon vor 30 Jahren ermöglicht!

Die Anwendung von Borsäure-Eisessig, wenn andere Säuren praktisch versagen, erinnert an Entdeckungen, die *R. E. Schmidt* (41) in der Reihe des Anthrachinons gemacht hat. Die Borsäure, die dort für die verschiedensten Zwecke seit langem Anwendung findet, ist jetzt auch Hilfsmittel für die Synthese eines Vitamins geworden. [A. 139.]

Literatur.

- (1) Carotin ist ein „Lipochrom“; *C. Fr. W. Kruckenberg*, *Physiol. Studien* [2] 3 [1882]; Grundzüge einer vergleichenden Physiologie der Farbstoffe u. der Farben, Heidelberg 1884. — (2) Lactoflavin ist ein „Lyochrom“; *Ph. Ellinger* u. *W. Koschava*, *Ber. dtsch. chem. Ges.* 66, 315, 898, 1411 [1933]. — (3) *R. Kuhn*, *P. György* u. *Th. Wagner-Jauregg*, ebenda 66, 1034 [1933]; gereinigte Farbstoffpräparate aus Molke hatten bereits *A. W. Blyth*, *J. chem. Soc. London* 1879, 530; *B. Bleyer* und *O. Kallmann*, *Biochem. Z.* 153, 459 [1925]; 155, 54 [1925] und namentlich *Ph. Ellinger* und *W. Koschava*, *Ber. dtsch. chem. Ges.* 66, 315, 898, 1411 [1933] dargestellt. — (4) *R. Kuhn*, *P. György* und *Th. Wagner-Jauregg*, ebenda 66, 317 [1933]; *P. György*, *R. Kuhn* und *Th. Wagner-Jauregg*, *Naturwiss.* 21, 560 [1933]; *Klin. Wschr.* 12, 1241 [1933]. — (5) *P. György*, *Literatur* (4); *P. György*, *Biochemical J.* 29, 741, 760, 767 [1935]; *H. Chick*, *A. M. Copping* und *C. E. Edgar*, ebenda 29, 722 [1935]; *L. J. Harris*, ebenda 29, 776 [1935]. — (6) *P. György*, *Nature* 133, 498 [1934]. — (7) *O. Warburg* und *W. Christian*, *Naturwiss.* 20, 688 [1932]; *Biochem. Z.* 254, 438 [1932]. — (8) *Naturwiss.* 20, 980 [1932]; *Biochem. Z.* 257, 492 [1933]; 258, 496 [1933]; 263, 228 [1933]. — (9) *P. György*, *R. Kuhn* und *Th. Wagner-Jauregg*, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 223, 241 [1934]. — (10) *R. Kuhn*, *Naturwiss., Nachr. d. Kaiser-Wilhelm-Ges.* 2, Nr. 1/4 [1933]; „Über Flavine“, IX. Internat. Kongreß f. reine u. angewandte Chemie, Madrid 1934; *Bull. Soc. Chim. biol.* 17, 905 [1935]. — (11) *R. Kuhn*, *H. Rudy* und *Th. Wagner-Jauregg*, *Ber. dtsch. chem. Ges.* 66, 1950 [1933]; *R. Kuhn* und *H. Rudy*, ebenda 67, 892, 1125, 1298, 1770, 1936 [1934]. — (12) Ebenda 24, 2363 [1891]; 27, 2116 [1894]; 28, 1968 [1895]. — (13) Ebenda 66, 1577 [1933]; 66, 1950 [1933]; 67, 361, 888, 898 [1934]. — (14) Ebenda 67, 1104, 1442 [1934]. — (15) Ebenda 67, 1409, 1459, 1939, 1941 [1934]. — (16) *R. Kuhn*, *K. Reinemund* und *F. Weygand*, ebenda 67, 1460 [1934]; *R. Kuhn* und *K. Reinemund*, ebenda 67, 1932 [1934]; *R. Kuhn*, *H. Rudy* und *K. Reinemund*, ebenda 68, 170 [1935]. — (17) *R. Kuhn* und *Th. Wagner-Jauregg*, 66, 1577, 1950 [1933]. — (18) *R. Kuhn*, *H. Rudy* und *F. Weygand*, ebenda 68, 625 [1935]. — (19) *R. Kuhn*, *H. Rudy* und *Th. Wagner-Jauregg*, ebenda 66, 1950 [1933]. — (20) *R. Kuhn* und *H. Rudy*, ebenda 67, 1298 [1934]. — (21) *R. Kuhn* und *F. Weygand*, ebenda 67, 2084 [1934]. — (22) *P. Karrer*, *K. Schöpp* und *F. Benz*, *Helv. chim. Acta* 18, 426 [15. II. 1935]; *H. v. Euler*, *P. Karrer*, *M. Malmberg*, *K. Schöpp*, *F. Benz* und *B. Becker*, ebenda 18, 522 [1935]; *P. Karrer*, *B. Becker*, *F. Benz*, *P. Frei*, *H. Salomon* und *K. Schöpp*, ebenda 18, 1435 [1935]. — (23) *R. Kuhn*, *K. Reinemund*, *H. Kaltschmitt*, *R. Ströbele* und *H. Trischmann*, *Naturwiss.* 23, 260 [13. III. 1935]; *R. Kuhn*, *Bull. Soc. Chim. biol.* 17, 905 [1935]; *Chemiker-Ztg.* 59, 604 [1935]; *R. Kuhn*, *K. Reinemund*, *F. Weygand* und *R. Ströbele*, *Ber. dtsch. chem. Ges.* 68, 1765 [1935]. — (24) *Z. Vitaminforsch.* 4, 223 [1935]. — (25) *A. Skita* und *F. Keil*, *Ber. dtsch. chem. Ges.* 61, 1452, 1682 [1928]. — (26) *P. Karrer*, *K. Schöpp*, *F. Benz* und *K. Pfaeher*, ebenda 68, 216 [1935]; *Helv. chim. Acta* 18, 69 [1935]. — (27) *R. Kuhn* und *A. H. Cook*, unveröffentlicht. — (28) *R. Kuhn* und *F. Weygand*, *Ber. dtsch. chem. Ges.* 68, 1282 [1935]. — (29) Unveröffentlicht. — (30) *R. Kuhn* und *H. Rudy*, *Ber. dtsch. chem. Ges.* 68, 383 [1935]. — (31) *R. Kuhn* und *H. Rudy*, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* (im Druck). — (32) *H. v. Euler*, *P. Karrer* und *M. Malmberg*, *Helv. chim. Acta* 18, 1336 [1935]; vergl. ferner *Literatur* (22) und (26). — (33) *R. Kuhn* und *R. Ströbele*, unveröffentlicht. — (34) *Biochem. Z.* 272, 155 [1934]; 275, 37, 344, 466 [1934]; 278, 263 [1935]. — (35) *R. Willstätter*, *J. Graser* und *R. Kuhn*, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 123, 1 [1922], und zwar S. 45; *R. Willstätter* und *A. Pollinger*, ebenda 130, 281 [1923]; *R. Willstätter*, *Faraday-Vorlesung*, *Naturwiss.* 15, 585 [1927]. — (36) *R. Kuhn* und *H. Kaltschmitt*, *Ber. dtsch. chem. Ges.* 68, 386 [1935]. — (37) *Biochem. Z.* 246, 203 [1932]. — (38) *Nature* 135, 915 [1935]. — (39) Nicotinsäure-amid als Bestandteil des Co-Ferments aus Blutzellen: *O. Warburg* und *W. Christian*, *Biochem. Z.* 275, 464 [1935]; als Bestandteile der Co-Zymase aus Hefe: *H. v. Euler*, *H. Albers* und *F. Schlenk*, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 237, I [1935]. — (40) *Ber. dtsch. chem. Ges.* 39, 1324 [1906]. — (41) *R. E. Schmidt* und *L. Gattermann*, ebenda 29, 2934 [1896]; *O. Dimroth* und *Th. Faust*, ebenda 54, 3020 [1921].