

wandt<sup>12)</sup>. Wir<sup>13)</sup> haben vor kurzem darauf hingewiesen, daß die Diamylose sich in Tetraamylose zurückverwandelt, wenn sie nicht durch die Gegenwart einer Mindestmenge von z. B. Alkohol (von etwa 2 %, bezogen auf die Diamylose), mit dem sie eine Molekülverbindung bildet, stabilisiert wird. Bei dem Vergleich von Diamylose und Tetraamylose wurde von Ulmann keine Rücksicht darauf genommen, daß bei der isothermen Destillation der Alkohol mitüberdestilliert, wodurch sich entsprechend unseren Angaben die Diamylose in Tetraamylose verwandeln muß. Zu einem Vergleich der Molekulargröße von Dianylose und Tetraamylose erscheint uns die angewandte Methode deshalb ungeeignet.

Ferner findet sich in dieser Arbeit die Angabe, daß durch eine  $p_H$ -Verschiebung nach 8—8.5 der osmotische Druck mit der Zeit einem Endwert zustrebt, der nahezu der Umwandlung der Tetraamylose in Diamylose entspricht. In der Diskussion der Versuchs-Ergebnisse findet sich darauf die folgende Bemerkung: „Die Versuche von H. Pringsheim, die für manche Präparate zu Molekulargewichten einer Diamylose geführt haben, werden durch die Annahme verständlich, daß hierbei in schwach alkalischem Medium gearbeitet wurde, . . .“. Hierzu ist i. zu bemerken, daß nicht manche, sondern alle Präparate der Diamylose zu entsprechenden Molekulargewichten geführt haben. Ferner konnten wir die Umwandlung der Tetraamylose in Diamylose durch die  $p_H$ -Verschiebung in das alkalische Gebiet in kryoskopischen Versuchen nicht bestätigen. Wir ermittelten zuerst den Gefrierpunkt unseres Wassers, setzten dann  $n/500\text{-NH}_3$  bis zum Erreichen von  $p_H = 8.4$  hinzu und fanden danach keine Gefrierpunkts-Änderung. In diesem schwach alkalischen Wasser wurde die Molekulargewichts-Bestimmung der Tetraamylose und zum Vergleich die von Rohrzucker durchgeführt:

	g Subst.	g Wasser	Konzentrat. in %	$\Delta$	Mol.-Gew.
Tetraamylose ..	0.1695	15	1.13	0.032	656
Rohrzucker ....	0.1587	15	1.06	0.054	364

Eine Umwandlung der Tetraamylose in Diamylose fand auch bei langem Stehen im alkalischen Medium nicht statt, da der Gefrierpunkt sich innerhalb von 2 Tagen nicht geändert hatte. Das Diamylose-Problem ist also durch die Ulmannsche Annahme noch nicht geklärt.

## 274. Theodor Wagner-Jauregg und Helmut Ruska: Flavine als biologische Wasserstoff-Acceptoren.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizin. Forschung, Heidelberg, Institut für Chemie und Institut für Pathologie.]

(Eingegangen am 2. August 1933.)

Im Tier- und Pflanzenreich kommen weitverbreitet wasser-lösliche, gelbe, intensiv gelb-grün fluoreszierende Farbstoffe vor, die als Flavine<sup>1)</sup>, und im Gegensatz zu den Lipochromen auch als Lyochrome<sup>2)</sup> bezeichnet werden. Diese Farbstoffe liegen teils in freier, dialysabler Form vor, wie in der Kuhmilch, teils sind sie, wie in der Hefe und der Leber, an hochmole-

<sup>12)</sup> Ulmann, Biochem. Ztschr. **251**, 458 [1932].

<sup>13)</sup> B. **64**, 2117 [1931], **65**, 1870 [1932].

<sup>1)</sup> R. Kuhn, P. György u. Th. Wagner-Jauregg, B. **66**, 317 [1933].

<sup>2)</sup> Ph. Ellinger u. W. Koschara, B. **66**, 315 [1933].

kulare Träger gebunden (Flavo-polysaccharide, Flavo-proteine). Die prosthetische Gruppe des gelben, eisen-freien Oxydations-Fermentes, welches O. Warburg und W. Christian aus Hefe isoliert<sup>3)</sup>, und O. Warburg und F. Negelein im *Bacillus Delbrücki* nachgewiesen haben<sup>4)</sup>, ist ein Flavin. Dieses Ferment bewirkt, in Gemeinschaft mit einem anderen farblosen Ferment und einem Co-Ferment, die Dehydrierung von Hexose-monophosphorsäure. In Abwesenheit von Sauerstoff erfolgt die Oxydation dieses Substrates unter gleichzeitiger Reduktion der Flavin-Komponente zur Leukoform. Es erhebt sich die Frage, ob auch die freien, thermostabilen Flavine, von denen das Ovo-flavin und das Lacto-flavin in kristallisierter Form vorliegen<sup>5)</sup>, bei enzymatischen Prozessen als Wasserstoff-Acceptoren fungieren können<sup>6)</sup>. Die folgenden Beobachtungen zeigen, daß dies in der Tat der Fall ist.

Läßt man Flavin-Lösungen mit Hefe, zerkleinertem Muskel oder mit Organbrei von Leber, Niere, Herz und Gehirn im Vakuum stehen, so findet — besonders bei Zusatz von Substraten wie Milchsäure, Bernsteinsäure, Brenztraubensäure, Citronensäure und Aldehyden — nach einiger Zeit Entfärbung statt. Die grün-gelbe Farbe kehrt beim Schütteln mit Luft wieder, verschwindet abermals nach Entfernung des Sauerstoffs usw. Einige Beispiele sind in Tabelle I zusammengestellt.

Tabelle I.

Alle Versuche bei 37° in evakuierten Thunberg-Röhrchen. Je 0.3 ccm  $m/_{10}$ -Phosphat-Puffer vom  $p_{\text{H}} = 7.6$ . Als Flavin-Lösung wurde ein Präparat aus Rinderleber, durch Adsorption an Fullererde und an Frankonit gereinigt<sup>7)</sup>, verwendet; Farbstoff-Konzentrat. = 0.04 % (colorimetr. bestimmt); davon je 0.6 ccm.

Organ	Substrat	Entfärbungszeit in Stdn. <sup>8)</sup>
0.2 g Ratten-Leber	1 ccm Wasser .....	5 $\frac{1}{2}$
0.2 g „ „	1 „ $m/_{10}$ -milchsaures Na .....	1
0.2 g „ „	1 „ $m/_{10}$ -brenztraubensaur. Na.	$\frac{3}{4}$
0.2 g „ „	1 „ $m/_{10}$ -bernsteinsaur. Na ....	$\frac{1}{2}$
0.2 g Ratten-Herz	1 ccm Wasser .....	>15
0.2 g „ „	1 „ $m/_{10}$ -brenztraubensaur. Na.	>15
0.2 g „ „	1 „ $m/_{10}$ -bernsteinsaur. Na ....	>15
0.2 g „ „	1 „ $m/_{10}$ -milchsaure. Na .....	1 $\frac{3}{4}$
0.2 g Ratten-Gehirn	1 ccm Wasser .....	>15
0.2 g „ „	1 „ $m/_{10}$ -bernsteinsaur. Na ....	>15
0.2 g „ „	1 „ $m/_{10}$ -milchsaure. Na .....	>15
0.2 g „ „	1 „ $m/_{10}$ -brenztraubensaur. Na.	2 $\frac{3}{4}$

<sup>3)</sup> Naturwiss. **20**, 980 [1932]; Biochem. Ztschr. **254**, 438 [1932].

<sup>4)</sup> Biochem. Ztschr. **262**, 237 [1933].

<sup>5)</sup> R. Kuhn, P. György u. Th. Wagner-Jauregg, B. **66**, 576, 1034 [1933].

<sup>6)</sup> Th. Wagner-Jauregg, Mitteil. Kaiser-Wilhelm-Gesellsch. **2**, 13 [1933] und Arch. Pharmaz. **271**, 381 [1933]; s. a. I. Banga u. A. Szent-Györgyi (Cytoflav); Biochem. Ztschr. **246**, 212 [1932]; P. Karrer u. H. von Euler, Ark. Kemi **11** B, No. 16, 1 [1933], haben später ähnliche Vorstellungen angedeutet.

<sup>7)</sup> P. György, R. Kuhn u. Th. Wagner-Jauregg, Ztschr. physiol. Chem. (im Druck).

<sup>8)</sup> Trotz der braunroten Farbe der Lösungen ist die Entfärbung des Flavins deutlich erkennbar.

In Tabelle II sind gleichartige Versuche mit zwei verschiedenen Bäcker-Hefen bei wechselndem  $p_H$  angeführt.

Tabelle II.

Alle Versuche in evakuierten Thunberg-Röhrchen bei 37°. Je 0.5 ccm einer wäßrigen Hefe-Suspension 1 : 1 + 1 ccm Glykokoll- bzw. Phosphat-Puffer + 0.5 ccm Flavin-Lösg. + 0.5 ccm  $m/10$ -brenztraubensaur. Na.

	$p_H$ des Puffers	Flavin-Konzentrat aus	Entfärbungs- Zeit
Branntwein-Preßhefe „Edelweiß“ <sup>9)</sup> ..	3.7	Ei-Albumin <sup>11)</sup>	> 15 Stdn.
	7.1	„	> 15 „
	12.7	„	3 „
Pfälzische Brauntwein-Preßhefe <sup>10)</sup> ...	3.7	Rinder-Herz <sup>12)</sup>	25 Min.
	7.1	„	25 „
	12.7	„	10 „

Diese Versuche zeigen, daß in biologischen Systemen eine Hydrierung von Flavinen unter gleichzeitiger Dehydrierung geeigneter Substrate stattfindet. Da die Leuko-flavine durch Sauerstoff wieder zu den Flavinen dehydriert werden, kommt diesen Farbstoffen die Bedeutung biologischer Sauerstoff-Überträger zu. Trifft die Annahme zu, daß das Vitamin B<sub>2</sub> ein Flavin ist<sup>13)</sup>, so wird man in diesem Vitamin nicht nur die Vorstufe von Oxydations-Fermenten, also ein Pro-ferment<sup>14)</sup>, zu erblicken haben. Nach den hier mitgeteilten Beobachtungen kommt überdies eine unmittelbare Beteiligung an Oxydations-Vorgängen in den Zellen durch das Vitamin B<sub>2</sub> als solches in Betracht.

Der Flavin hydrierende Enzym-Komplex läßt sich aus zerkleinerter Rinder-Leber durch Schütteln mit Wasser herauslösen. Aus diesen Extrakten kann man durch Zusatz von saurem Glykokoll-Puffer ( $p_H = 3.7$ ) oder von gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung Begleit-Substanzen ausfällen, ohne daß die Wirksamkeit verloren geht. Auch durch Dialyse<sup>15)</sup> läßt sich die Enzym-Lösung reinigen. Unreine Flavin-Lösungen werden von diesen dialysierten Enzym-Präparaten im Vakuum auch ohne Zusatz von Substanzen entfärbt, nicht dagegen reine Flavine; vermutlich enthalten die rohen Flavin-Konzentrate noch Substanzen, die als Wasserstoff-Donatoren oder als Co-Fermente wirken. Die Beeinflussung der Entfärbungszeiten durch Zusatz verschiedener Substrate zeigt Tabelle III.

<sup>9)</sup> Firma Lindenmeyer & Co., Heilbronn a/N.

<sup>10)</sup> Spritfabrik, Ludwigshafen/Rh.

<sup>11)</sup> Darstellung siehe Fußnote 5.

<sup>12)</sup> Dargestellt nach P. György, R. Kuhn u. Th. Wagner-Jauregg, Ztschr. physiol. Chem. (im Druck).

<sup>13)</sup> Fußnote 1 u. 5; zusammenfassend: P. György, R. Kuhn u. Th. Wagner-Jauregg, Klin. Wochenschr. (im Druck).

<sup>14)</sup> Fußnote 5, u. zw. S. 1037.

<sup>15)</sup> Dabei tritt eine starke Ausflockung auf, die durch Zentrifugieren entfernt wird. Die dialysierten Lösungen sind klar und dunkel rotbraun gefärbt.

Tabelle III.

Je 0.5 ccm 24 Stdn. gegen fließendes Wasser dialysierter, wäßriger Rinderleber-Extrakt (1:1) + 0.1 ccm Lactoflavin-Konzentrat (Farbstoff-Konzentration = 0.095 %, colorimetr. bestimmt) + 1 ccm  $m/15$ -Phosphat-Puffer  $p_H = 5.9$ . Temp. =  $37^\circ$ .

Substrat	Entfärbungs-Zeit in Min.
1 ccm Wasser .....	180
1 „ $m/2$ -milchsaure Na .....	90
1 „ $m/5$ -citronensaure Na .....	120
0.5 ccm Traubenzucker, 50-proz. ....	90
0.5 „ hexose-monophosphorsaur. K, 0.25-molar ....	30
0.5 „ Cystein-HCl, 2-proz. ....	> 400

Auffallend ist die kurze Entfärbungszeit in Gegenwart der Hexose-monophosphorsäure (Robison-Ester), des Substrates des gelben Warburgschen Oxydations-Fermentes. Cystein scheint einen hemmenden Einfluß auszuüben.

Mit Phosphat-Puffer ( $p_H = 7.4$ ) bereitete Hefe-Extrakte, Hefe-Autolysate und Hefe-Preßsäfte vermögen Flavin-Lösungen in Gegenwart von Milchsäure nicht zu entfärben, dagegen besitzen die ungelösten Hefe-Rückstände diese Wirkung noch. Die unwirksamen Hefe-Extrakte entfärben Flavine erst bei längerem Stehen in Abwesenheit von Toluol, vermutlich infolge Bakterien-Wirkung. Der Farbstoff wird dabei ebenfalls hydriert, nicht zerstört, denn beim Schütteln mit Luft kehrt die ursprüngliche Farbe wieder. Ungeeignet zur Reduktion von Flavinen ist frische Milch, auch in Gegenwart von Substraten der Schardinger-Reaktion (Hypo-xanthin und Aldehyden); dagegen entfärbt geronnene Milch sehr rasch, schon ohne Zusatz von Wasserstoff-Donatoren (Bakterien?).

Die enzymatische Flavin-Reduktion durch Leber-Extrakte kann mittels Blausäure gehemmt werden<sup>16)</sup> (Tabelle IV).

Tabelle IV.

Alle Versuche in evakuierten Thunberg-Röhrchen bei  $37^\circ$ . Je 2 ccm, durch Fällung mit Glykokoll-Puffer ( $p_H = 3.7$ ) gereinigter Leber-Extrakt + 1 ccm Flavin-Lösg. aus Rinderherz<sup>12)</sup> + 0.1 ccm  $m/5$ -Natriumsuccinat.

HCN-Konzentration <sup>17)</sup>	Entfärbungs-Zeit in Min.
0 .....	60
$m/6000$ .....	90
$m/1200$ .....	135
$m/600$ .....	360

Dasselbe war der Fall in den Versuchen mit geronnener Milch, dagegen nicht bei Verwendung einer Frischhefe-Suspension als Enzym-Material ( $m/600$ -HCN). Kohlenoxyd vergiftet die Dehydrierung durch Leber-Extrakt nicht.

<sup>16)</sup> Die Entfärbung von Methylenblau wurde im Kontrollversuch durch HCN nicht beeinflusst.

<sup>17)</sup> Die KCN-Lösung wurde mit HCl gegen Lackmus neutralisiert.

Wir wissen, daß Methylenblau bei enzymatischen Dehydrierungen unter anaeroben Bedingungen vielfach die Rolle des Sauerstoffs zu ersetzen vermag. Die hier mitgeteilten Versuche lassen es möglich erscheinen, daß Flavine im lebenden Gewebe gewissermaßen als „Methylenblau der Zelle“ fungieren. Im Modellversuch ist allerdings das Methylenblau den Flavinen als Wasserstoff-Acceptor überlegen. Beispielsweise wurde in einigen der oben erwähnten Versuchs-Ansätze, in denen Flavine nicht entfärbt wurden, Methylenblau gut reduziert. Auch in Versuchen mit dialysierter Milchsäure-Dehydrase aus Hefe, wobei durch Luft-Sauerstoff in Gegenwart von Methylenblau Dehydrierung von Milchsäure erfolgt<sup>18)</sup>, blieb diese Wirkung bei Ersatz des Methylenblaus durch Flavine aus. Die Sauerstoff-Aufnahme, welche Bernsteinsäure in Gegenwart von gewaschenem Muskel zeigt, ist durch Blausäure hemmbar; A. Fleisch<sup>19)</sup> beobachtete, daß Methylenblau-Zusatz die aerobe Dehydrierung wieder herstellt. Wir überzeugten uns davon, daß auch in diesem Falle die von uns untersuchten Flavine (Ovo-flavin, Lacto-flavin) das Methylenblau nicht zu ersetzen im Stande sind. Verschiedene natürliche Farbstoffe, z. B. Pyro-cyanin, Echinochrom, Halachrom u. a., vermögen, wie E. A. H. Friedheim und L. Michaelis<sup>20)</sup> gezeigt haben, ebenso wie das Methylenblau, die Atmung lebender Zellen erheblich zu steigern. Hr. N. Brookens war so freundlich, im Institut von Hrn. Prof. O. Meyerhof die Wirkung gereinigter Ovoflavin-Lösungen auf die Atmung kernloser Erythrocyten zu untersuchen, konnte aber keine gesteigerte Aufnahme von Sauerstoff feststellen.

Den HHrn. E. F. Möller und G. Walter danken wir für Mithilfe bei den Versuchen.

## 275. Ernst Bergmann und Heinz Hillemann: $\gamma$ -Methyl-1,2-cyclopenteno-phenanthren.

[Aus d. Chem. Institut d. Universität Berlin.]

(Eingegangen am 2. August 1933.)

I. In der Frage nach der Konstitution der Sterine, Gallensäuren und verwandten Substanzen ist in der neuesten Zeit besonders der Bau von Ring IV Gegenstand der Diskussion geworden. Spezielles Interesse bietet in dieser Hinsicht ein Kohlenwasserstoff  $C_{18}H_{16}$  (Schmp. 124–125°), den O. Diels<sup>1)</sup> bei seiner Dehydrierung von Cholesterylchlorid mittels Selens gefaßt hat. Von Ruzicka<sup>2)</sup>, der sich kürzlich eingehend mit der gleichen Dehydrierung beschäftigte, wird das Auftreten einer Kohlenwasserstoff-Fraktion vom genannten Schmelzpunkt bestätigt, doch nimmt Ruzicka an, daß es sich hierbei nicht um ein einheitliches chemisches Individuum handelt und 1,2-Cyclopenteno-phenanthren,  $C_{17}H_{14}$ , wesentlicher Be-

<sup>18)</sup> F. Bernheim, Biochem. Journ. **22**, 1178 [1928].

<sup>19)</sup> Biochem. Journ. **18**, 294 [1924].

<sup>20)</sup> Literatur-Angaben s. bei K. G. Stern, Naturwiss. **21**, 350 [1933].

<sup>1)</sup> Diels u. Gädke, B. **60**, 140 [1927]; Diels, Gädke u. Körding, A. **459**, 1 [1927]; Diels, B. **66**, 1122 [1933].

<sup>2)</sup> Ruzicka u. Mitarbeiter, Helv. chim. Acta **16**, 216, 812 [1933].