

von 7 g [1-Äthyl-propyl]-amin (aus Diäthylketon und Ammoniak nach Mignonac<sup>12)</sup>), 7 g Methyl-äthyl-keton und 50 ccm einer 1-proz. kolloiden Platin-Lösung dargestellt. Erhalten: 7 g sekundäre Base vom Sdp. 150—152°.

$C_9H_{21}N$ . Ber. C 75.5, H 14.7, N 9.8. Gef. C 75.7, H 14.6, N 10.0.

Pikrolonat: Schmp. 187—188° (aus Alkohol).

Ber. C 56.0, H 7.1, N 17.2. Gef. C 56.2, H 7.2, N 17.3.

## 294. Philipp Ellinger und Walter Koschara: Über eine neue Gruppe tierischer Farbstoffe (Lyochrome) (III. Mitteil.).

(Eingegangen am 28. August 1933.)

Die Lyochrome<sup>1)</sup> sind ausgezeichnet durch ihre Wasser-Löslichkeit und ihre gelbgrüne Fluorescenz in der Nähe des Neutralpunktes, eine Fluorescenz, die durch starke Alkalien und Säuren ausgelöscht wird. In der reversiblen Reduktion der neuen Naturfarbstoffe (z. B. mit Natrium-hyposulfit) zu Leuko-verbindungen, die schon durch Luft-Sauerstoff glatt wieder zum Farbstoff dehydriert werden, ist ein weiteres charakteristisches Merkmal gegeben.

Wir finden, daß auch Schwefelwasserstoff in soda-alkalischer Lösung die Lyochrome reduktiv entfärbt. Beim Schütteln mit Luft kehren Farbe und Fluorescenz schnell zurück. Diese Beobachtung ergab sich bei der näheren Untersuchung einer neuen Adsorptionsmethode für die Lyochrome, bei der Bleisulfid im status nascendi zur Anwendung gelangte. Unter geeigneten Bedingungen ist die Adsorptionskraft des Bleisulfids gegenüber den Lyochromen etwa 200-mal stärker als die der Fuller-Erde. Die Leuko-verbindungen der Farbstoffe werden auch nicht spurenweise adsorbiert. Im Gegensatz zur Tierkohle verändert das oberflächen-aktive Bleisulfid die Lyochrome nicht.

Wir haben in unserer II. Mitteilung drei Flavine aus Molke beschrieben: Lacto-flavin a, b und c. Sie sind von uns als die schwerst löslichen Vertreter der Lyochrome aus der Molke erhalten worden in dem Bemühen, die wasser-löslichen, fluoreszierenden Farbstoffe der Molke einigermaßen quantitativ zu erfassen. Man gewinnt sie, indem man aus einem in Eisessig gelösten Farbstoff-Konzentrat durch vorsichtige Aceton-Fällung Ballaststoffe entfernt. Die positive Murexid-Probe der bisher beschriebenen Lacto-flavine weist auf eine Puringruppe in ihrem Molekül hin. Wir stellen fest, daß beim Erhitzen von Lacto-flavin b über 60° zum Teil eine Spaltung eintritt in einen nahezu farblosen, in Wasser außerordentlich schwer löslichen Körper von Purin-Charakter und einen in Wasser leicht löslichen Farbstoff. Der Farbstoff besitzt alle Lyochrom-Eigenschaften. Die exakte Darstellung dieser Spaltung bleibt einer weiteren Mitteilung vorbehalten. Unser Interesse richtete sich in erster Linie auf den Farbstoff-Anteil dieser Spaltung. Da bei der schwierigen Material-Beschaffung eine Darstellung des Farbstoffes durch Spaltung der reinen Lacto-flavine a, b und c vorläufig wenig Aussicht auf Erfolg bot, haben wir uns den Mutter-

<sup>1)</sup> Ph. Ellinger u. W. Koschara, B. 66, 315, 808 [1933].

laugen der Roh-Krystallivate von Lacto-flavin a--c zugewandt. In ihnen mußte der Farbstoff-Spaltling unserer Purin-Farbstoff-Verbindungen enthalten sein, sei es, daß er im Laufe der Aufarbeitung abgespalten wurde, sei es, daß er als solcher in der Molke vorhanden war.

Die Reinigung der Mutterlaugen unserer Roh-Krystallivate ist bereits in unserer II. Mitteilung kurz geschildert. Mit Hilfe dieses Reinigungsverfahrens und einer anschließenden Fällung mit Goldchlorid<sup>2)</sup> haben wir einen weiteren krystallisierten Farbstoff der Molke gewonnen, den wir vorläufig Lacto-flavin d nennen. Lacto-flavin d krystallisiert in rotgelben bis rotbraunen Nadeln und ist in Wasser leichter löslich als die bisher beschriebenen Molken-Farbstoffe. Seine Farbkraft beträgt ein Mehrfaches der der Lacto-flavine a--c. Der neue Farbstoff schmilzt unter vollkommener Zersetzung bei 270--273° (unkorr., schnelles Erhitzen). Seine Analysenwerte stimmen am besten für die Formeln  $C_{16}H_{20}O_6N_4$  oder  $C_{17}H_{20}O_7N_4$ . Schmelzpunkt, größere Wasser-Löslichkeit und Zusammensetzung unterscheiden Lacto-flavin d scharf von den Lacto-flavinen a, b und c. Die Murexid-Probe mit dem neuen Farbstoff fällt negativ aus<sup>3)</sup>.

Die rotgelb gefärbten, wäßrigen Lösungen von Lacto-flavin d verblassen beim Kochen mit Alkali bis zu einem schwach gelben Farbton, ohne daß bei dieser Operation Ammoniak nachzuweisen ist. Bei der Oxydation von Lacto-flavin d mit Chromsäure in schwefelsaurer Lösung entstehen auf 1 Mol. Farbstoff 8 Mol. Kohlensäure und nur  $\frac{1}{2}$  Mol. Ammoniak. Unter den Oxydationsprodukten findet sich ferner eine äther-lösliche, stickstofffreie, gelbe Substanz, die aus Alkohol in Nadeln krystallisiert.

Bei unseren Isolierungsversuchen haben wir neben Lacto-flavin d einen krystallisierten Farbstoff gewonnen, der in mikroskopischen Bröckchen ausfällt. Sein Stickstoff-Gehalt beträgt 24 %. Er lieferte eine positive Murexid-Reaktion nur mit Chlorat-Salzsäure, nicht mit Salpetersäure. Damit ist die erzwungene Murexid-Probe, die wir in der II. Mitteilung von einem amorphen Farbstoff-Gemisch beschrieben haben, auf ein krystallisiertes Farbstoff-Präparat zurückgeführt. Schwerlöslichkeit und fehlender Schmelzpunkt nähern den Farbstoff den Lacto-flavinen a--c.

O. Warburg und W. Christian<sup>4)</sup> können aus den Lyochromen der Hefe durch Belichten ihrer alkalischen Lösungen ein Spaltprodukt krystallisiert gewinnen, das durch seine Chloroform-Löslichkeit ausgezeichnet ist und auf Grund dieser Eigenschaft leicht rein dargestellt werden kann. Die gleiche Photoreaktion hat uns aus einer Roh-Lactoflavin-Lösung ebenfalls einen krystallisierten, chloroform-löslichen Farbstoff geliefert. Er wird in rotgelben, wattigen Nadelchen erhalten, läßt sich aus sehr viel heißem Wasser umkrystallisieren, ist unvollkommen löslich in Ammoniak, spielernd löslich

<sup>2)</sup> Wir haben uns vergewissert, daß unsere Bedenken gegen die Einwirkung von Schwefelwasserstoff auf die Lyochrome (vergl. II. Mitteil.) insofern nicht zu Recht bestehen, als die in Chloroform löslichen Produkte, die bei dieser Behandlung entstehen, nur zu einem minimalen Betrag gebildet werden.

<sup>3)</sup> Inzwischen haben auch R. Kuhn, P. György u. Th. Wagner-Jauregg (B. **66**, 1034 [1933]) sich der Molke als bequemes Ausgangsmaterial zur Darstellung von Lyochromen bedient. Sie gewinnen aus Molke unter Verzicht auf alle schwer löslichen Lyochrome durch extreme Aceton-Fällung ein krystallisiertes Farbstoff-Präparat, das nach den mitgeteilten Daten mit Lacto-flavin d identisch zu sein scheint.

<sup>4)</sup> Naturwiss. **20**, 980 [1932]; Biochem. Ztschr. **257**, 492 [1933].

in verd. Natronlauge und schmilzt unt. Zers. bei  $315-317^{\circ}$  (unkorr.). Die Analyse weist ihm die Formel  $C_{14}H_{14}O_2N_4$  zu. Nach diesen Angaben sind die Licht-Spaltlinge der Hefe-Lyochrome und der Molken-Farbstoffe zumindest sehr nahe verwandt, wenn nicht identisch.

### Beschreibung der Versuche.

1) Adsorption der Lyochrome an Bleisulfid: Wir wenden das neue Adsorptionsverfahren bei Farbstoff-Konzentraten an, die in der früher beschriebenen Weise aus Molke durch Adsorption der Farbstoffe an Fuller-Erde und Elution mit Pyridin gewonnen würden. 2 l Farbstoff-Konzentrat, erhalten aus 100 l Molke, werden mit 300 g Natriumacetat verrührt<sup>5)</sup>. Fällung abschleudern und Zentrifugat mit 200 ccm einer 10-proz. Bleiessig-Lösung versetzen<sup>6)</sup>. Einleiten von Schwefelwasserstoff. Wie immer bei der Verarbeitung von Lyochromen ist auch hier auf Licht-Ausschluß zu achten. Der Niederschlag von Bleisulfid wird mit Wasser gewaschen und mit einem Gemisch von 30 Tln. Wasser und 70 Tln. Pyridin eluiert. Auch Alkohol ohne Pyridin zeigt einen, wenn auch geringen, Elutions-Effekt.

2) Isolierung von Lacto-flavin d: Die Roh-Krystallivate von Lacto-flavin a-c sind aus Eisessig-Alkohol-Lösung erhalten worden. Die Mutterlaugen der Roh-Krystallivate verarbeitet man zur Gewinnung von Lacto-flavin d wie folgt: Aus einem Ansatz mit 1000 l Molke liegen 300 ccm Mutterlauge vor. Eingießen in 3 l Äther. Ausgefallenes braunrotes Harz lösen in 200 ccm Wasser. Ausschütteln der wäßrigen Lösung mit Chloroform. Nur bei Farbstoff-Lösungen, die längere Zeit gestanden haben, gehen bei dieser Behandlung dunkle Schmieren in das Chloroform. Immer aber fallen mit Chloroform braungelbe, phosphatid-ähnliche Schmieren aus, die keine Lyochrome enthalten. Die von den Verunreinigungen befreite, wäßrige Lösung wird im Vakuum eingetrocknet und der Rückstand mit trocknem Pyridin ausgezogen. Pyridin-Lösung einengen und ihren Rückstand in 50 ccm Wasser aufnehmen. In dieser wäßrigen Lösung, die frei ist von Kreatinin, fällt mit 10 ccm einer 10-proz. Goldchlorid-Lösung ein braungelber, flockiger Niederschlag, der gewaschen und mit Schwefelwasserstoff zerlegt wird<sup>7)</sup>. Aus dem Filtrat von Goldsulfid krystallisiert nach dem Einengen zunächst ein Farbstoff mit einem Stickstoff-Gehalt von 24 % in mikroskopisch kleinen Bröckchen und einer durch Chlorat-Salzsäure zu erzwingenden Mutexid-Probe. Seine Mutterlauge liefert bei weiterem Einengen Lacto-flavin d in dottergelben, mikroskopischen Nadeln. Besonders schön und rein krystallisiert der neue Farbstoff aus dem heißen wäßrigen Extrakt des bei der Zersetzung des Goldsalzes entstandenen Goldsulfids. Er erscheint hier in makroskopischen, derben, tiefroten Stäben, die einheitlich aussehen. Ausbeute insgesamt 32 mg. Der Farbstoff zersetzt sich bei  $270-273^{\circ}$  und hält diesen Schmelzpunkt auch nach 2-mal wiederholtem Umkrystallisieren aus Wasser.

<sup>5)</sup> In mineralsaurer Lösung werden die Farbstoffe nicht adsorbiert, in stark alkalischen Lösungen reduziert.

<sup>6)</sup> Von anderen Schwermetallsulfiden (Silber, Kupfer, Eisen, Zink, Quecksilber, Antimon und Wismut) erreicht keines die Adsorptionskraft des Bleisulfids.

<sup>7)</sup> Auch die Fällung mit Silbernitrat, die R. Kuhn, P. György u. Th. Wagner-Jauregg bei der Darstellung des Ovoflavins anwenden (B. **66**, 576 [1933]), ist brauchbar.

Dabei wandeln sich die tiefroten Stäbe zu dottergelben Nadeln, die teilweise zu Nadel-Rosetten gehäuft sind.

Analysen (Weiler, Charlottenburg): Die Substanz wird bei  $70^{\circ}$  im Vakuum getrocknet. — 2.068 mg Sbst.: 3.995 mg  $\text{CO}_2$ , 1.080 mg  $\text{H}_2\text{O}$ . — 2.099 mg Sbst.: 4.060 mg  $\text{CO}_2$ , 1.070 mg  $\text{H}_2\text{O}$ . — 2.194 mg Sbst.: 0.278 ccm N ( $23^{1/2}^{\circ}$ , 749 mm). — 2.047 mg Sbst.: 0.260 ccm N ( $23^{\circ}$ , 749 mm).

Ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{O}_6\text{N}_4$	.. 52.7,	.. 5.5,	.. 15.4.
$\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_7\text{N}_4$	.. 52.0,	.. 5.1,	.. 14.2.
$\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_7\text{N}_4$	.. 53.4,	.. 4.9,	.. 13.8.
Gef.	.. 52.69, 52.75,	.. 5.84, 5.70,	.. 14.38, 14.43.

3) Darstellung des Licht-Spaltlings der Molken-Lyochrome: Dieser Farbstoff-Abkömmling ist der am leichtesten zugängliche Körper der Lacto-flavin-Reihe. Farbstoff-Konzentrate, wie sie in den eingegangten Pyridin-Eluaten vorliegen, werden mit Natronlauge deutlich lackmusalkalisch gemacht. 2 Stdn. im Sonnenlicht stehen lassen. Mit Schwefelsäure schwach<sup>8)</sup> kongo-sauer machen und mit Chloroform ausschütteln. Farbstoff aus dem Chloroform in verd. Natronlauge schütteln. Wäßrige Lösung mit Schwefelsäure ansäuern und zur Entfernung von Fetten und Fettsäuren mit Äther extrahieren. Farbstoff abermals in Chloroform schütteln. Chloroform-Rückstand aus heißem Wasser umkristallisieren<sup>9)</sup>. Schöne Nadelchen, meist in Form von Doppelfächern<sup>10)</sup>. Der Farbstoff schmilzt unt. Zers. bei  $315-317^{\circ}$  (unkorr.).

Analysen (Weiler, Charlottenburg). Die Substanz wurde bei  $70^{\circ}$  im Vakuum getrocknet. — 2.241 mg Sbst.: 5.070 mg  $\text{CO}_2$ , 1.050 mg  $\text{H}_2\text{O}$ , 0.011 mg Asche. — 2.306 mg Sbst.: 5.240 mg  $\text{CO}_2$ , 1.070 mg Wasser, 0.018 mg Asche. — 2.069 mg Sbst.: 0.367 ccm N ( $22^{1/2}^{\circ}$ , 751 mm). — 2.132 mg Sbst.: 0.385 ccm N ( $23^{\circ}$ , 751 mm).

$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_2\text{N}_4$ .	Ber. C 62.2,	H 5.2,	N 20.7.
Gef.	.. 61.70, 61.97,	.. 5.24, 5.19,	.. 20.25, 20.58.

Wir danken der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft bestens für die Gewährung eines Forschungs-Stipendiums an den einen von uns.

Düsseldorf, 26. August 1933.

<sup>8)</sup> Schwach basische Eigenschaften des Farbstoffs drücken sich darin aus, daß er aus stark schwefelsauren Lösungen durch Chloroform nicht auszuschütteln ist.

<sup>9)</sup> Bei dieser Arbeitsweise haben wir keinen Anhaltspunkt dafür gewinnen können, daß mehr als ein Licht-Spaltling auftritt.

<sup>10)</sup> s. Krystallbild bei O. Warburg u. W. Christian, Naturwiss. **20**, 980 [1933].