

Halochromie. Die Substanz schmeckt im ersten Augenblitze schwach süßlich, dann äußerst brennend (viel stärker als die *o*-Verbindung). Das Einatmen des Staubes verursacht schwachen Nießreiz. In kleinen Mengen läßt sich die Verbindung unter  $10^{-3}$  mm unzersetzt sublimieren, wenn die Temperatur  $100^{\circ}$  nicht überschreitet. Die Sublimation gelingt nicht so leicht wie bei der *o*-Verbindung.

Der Justus-Liebig-Gesellschaft danken wir für die Gewährung eines Stipendiums.

**358. Richard Kuhn und Hermann Rudy:  
Katalytische Wirkung der Lactoflavin-5'-phosphorsäure; Synthese  
des gelben Ferments.**

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizin. Forschung, Heidelberg, Institut für Chemie.]  
(Eingegangen am 22. Juli 1936.)

Die ausgehend von synthetischem Lactoflavin<sup>1)</sup> über die 5'-Trityl-2'.3'.4'-Triacetyl-5'-trityl- und 2'.3'.4'-Triacetyl-Verbindung gewonnene Lactoflavin-5'-phosphorsäure<sup>2)</sup> reagiert bei neutraler Reaktion mit dem nach H. Theorell<sup>3)</sup> dargestellten kolloiden Träger des gelben Ferments von O. Warburg und W. Christian<sup>4)</sup> unter Bildung eines nicht fluoreszierenden, nicht dialysierbaren Chromoproteids, das sich wie das natürlich vorkommende Ferment durch verd. Säure wieder in seine Komponenten zerlegen läßt.

Die Verbindung der Lactoflavin-5'-phosphorsäure mit dem kolloiden Träger vermag in den von O. Warburg und W. Christian angegebenen Systemen Neuberg-Ester sowie Robison-Ester katalytisch zu oxydieren. Die Reaktionsgeschwindigkeiten haben wir sowohl nach T. Thunbergs Methode (Entfärbung von Methylenblau) wie manometrisch nach O. Warburg (Sauerstoff-Verbrauch) gemessen. Zum Vergleich diente das aus demselben kolloiden Träger und der natürlichen Flavinphosphorsäure nach H. Theorell unter genau gleichen Bedingungen dargestellte Chromoproteid, welches wie Theorell gezeigt hat und wir bestätigen können, mit dem natürlichen gelben Ferment identisch ist.

Das Ergebnis des Vergleichs ist, daß aus der natürlichen Flavinphosphorsäure und der synthetischen Lactoflavin-5'-phosphorsäure durch Kupplung mit dem kolloiden Träger Verbindungen entstehen, deren katalytische Wirksamkeiten unter allen geprüften Bedingungen quantitativ übereinstimmen.

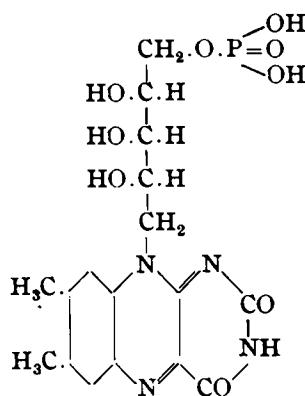
<sup>1)</sup> Aus 1,2-Dimethyl-4,5-dinitro-benzol; R. Kuhn, H. Rudy u. F. Weygand, B. **68**, 625 [1935]; B. **68**, 1765 [1935].

<sup>2)</sup> R. Kuhn, H. Rudy u. F. Weygand, B. **69**, 1543 [1936].

<sup>3)</sup> Biochem. Ztschr. **278**, 263 [1935].

<sup>4)</sup> Naturwiss. **20**, 688, 980 [1932]; Biochem. Ztschr. **254**, 438 [1932]; **257**, 492 [1933].

Für die prosthetische Gruppe des gelben Ferments ist damit auf dem Wege der vollständigen Synthese die Konstitution und Konfiguration der 6,7-Dimethyl-9-d-ribityl-iso-alloxazin-5'-phosphorsäure (Lactoflavin-5'-phosphorsäure) erwiesen. Die Vorstellung<sup>5)</sup>, daß ein Ferment aus einem kolloiden Träger und einer chemisch wirksamen aktiven Gruppe besteht, erfährt im vorliegenden Falle durch die Totalsynthese der wirksamen Gruppe, die sich mit dem kolloiden Träger zum natürlichen Ferment vereinigt, eine entscheidende Bestätigung. Die sehr spezifische Art dieser Vereinigung kommt, wie bereits ausgeführt wurde<sup>6)</sup>, dadurch zustande, daß neben dem Phosphorsäure-Rest in 5'-Stellung auch noch der Flavinkern, insbesondere die NH-Gruppe in 3-Stellung, an der Bindung des kolloiden Trägers beteiligt ist. Die Annahme<sup>7)</sup>, daß aus dem Lactoflavin im Tierkörper das gelbe Ferment gebildet wird und die Wirkungsweise des Vitamins auf diejenige des Ferments hinausläuft, erscheint gesichert, da es möglich ist, diese bisher nur *in vivo* nachgewiesene Umwandlung auch *in vitro* zu verwirklichen.



### Beschreibung der Versuche.

Das zur Darstellung des kolloiden Trägers benötigte gelbe Ferment wurde aus Hefe der Löwenbrauerei München gewonnen. Es wurde zunächst nach O. Warburg und W. Christian, dann durch Kataphorese (2-mal) nach H. Theorell und schließlich durch Adsorption an Aluminiumhydroxyd  $\beta$  nach R. Willstätter und H. Kraut, Elution mit  $n/10$ -Dinatriumphosphat und Dialyse gegen dest. Wasser im Eisschrank gereinigt. Die zur Spaltung mit  $n/50$ -Salzsäure bei  $0-2^\circ$  verwendete Ferment-Lösung enthielt in 1 ccm 4.40 mg Trockensubstanz und 12.3  $\gamma$  Lactoflavin (colorimetrisch mit dem Stufenphotometer bestimmt). Unter Zugrundelegung des von H. Theorell angenommenen Molekulargewichts von 70000 betrug somit der Reinheitsgrad des Ferments 50%.  $[\alpha]_D^{20} = (-0.42 \times 100) : (0.80 \times 2) = -26^\circ$  (Wasser).

Die von einer geringen Flockung durch Zentrifugieren befreite, gegen Lackmus neutrale, klare und farblose Lösung des kolloiden Trägers wurde mit einem geringen Überschuß der Natriumsalze der Flavinhosphorsäuren, die ebenfalls neutral gegen Lackmus waren, versetzt. Solange noch das Protein im Überschuß war, trat Kupplung unter Verlust der Fluorescenz ein. Der Überschuß an Flavinhosphorsäure wurde durch Dialyse (Cuprophan) im Eisschrank entfernt. In den erhaltenen synthetischen Ferment-Lösungen wurde der Gehalt an gebundenem Flavin, der den folgenden Angaben zu-

<sup>5)</sup> R. Willstätter, J. Graser u. R. Kuhn, Ztschr. physiol. Chem. **128**, 1 [1922]; R. Willstätter u. A. Pollinger, ebenda **130**, 281 [1923]; R. Willstätter, Faraday-Vorlesung, Naturwiss. **15**, 585 [1927].

<sup>6)</sup> R. Kuhn u. P. Boulanger, B. **69**, 1557 [1936]; H. Rudy, Naturwiss. **24**, 497 [1936].

<sup>7)</sup> R. Kuhn, P. György u. Th. Wagner-Jauregg, B. **66**, 1034 [1933].

grundeliegt, stufenphotometrisch aus dem Anstieg der Fluorescenz bei der Spaltung mit verd. Essigsäure in der Wärme ermittelt.

„Natürliches Ferment“ bedeutet das Kupplungsprodukt der aus dem gelben Ferment nach H. Theorell abgespaltenen Flavinphosphorsäure mit dem kolloiden Träger, „synthetisches Ferment“ das Kupplungsprodukt des Trägers mit der synthetischen Lactoflavin-5'-phosphorsäure.

### Geschwindigkeit der Methylenblau-Reduktion.

Je 0.50 ccm Methylenblau 1:5000 + 0.10 ccm  $m_{1/2}$ -Phosphat-Gemisch pH = 7.0 + 0.10 ccm Co-Ferment aus Pferdeblut + 0.30 ccm  $m_{1/50}$ -Neuberg-Ester + 0.50 ccm Zwischenferment aus Löwenbräu-Hefe. 37.5°.

	Entfärbungszeiten
1 ccm Wasser .....	>30 Min.
1 ccm synthetisches Ferment (aus 5'-Phosphorsäure) .....	7 Min.
1 ccm natürliches Ferment .....	$7\frac{1}{2}$ Min.

Mit je 0.10 ccm einer anderen Co-Ferment-Lösung aus Pferdeblut ergaben sich folgende Entfärbungszeiten:

1 ccm kolloider Träger .....	>25 Min.
1 ccm Wasser .....	>25 Min.
1 ccm synthetisches Ferment (aus 5'-Phosphorsäure) .....	4 Min.
1 ccm natürliches Ferment .....	4 Min.

Eine weitere Versuchsreihe ergab für Ferment-Lösungen mit je 0.52 γ Lactoflavin in 1 ccm bei Anwendung von 0.20 ccm Co-Ferment (alles übrige wie oben):

1 ccm kolloider Träger .....	20 Min.
0.8 ccm Wasser + 0.2 ccm gelbes Ferment (2 γ Lactoflavin in 1 ccm, ungespalten natürlich, Überschuß) .....	1 Min.
1 ccm synthetisches Ferment (aus 5'-Phosphorsäure) .....	1.5 Min.
1 ccm natürliches Ferment .....	1.4 Min.

### Geschwindigkeit der O<sub>2</sub>-Aufnahme.

Um etwaige Unterschiede im Wirkungsvermögen der Fermente sicher erkennen zu können, war es notwendig, unter solchen Bedingungen zu messen, unter denen die Reaktionsgeschwindigkeit der angewandten Menge an gelbem Ferment annähernd proportional ist. Dies trifft nach den folgenden Zahlen unter den eingehaltenen Bedingungen unterhalb von 2 γ Lactoflavin in 1 ccm Ferment-Lösung zu

Die Sauerstoffaufnahme wurde manometrisch nach O. Warburg und W. Christian gemessen. Temperatur 37.5°. Im Gefäß: 1 ccm  $m_{1/10}$ -Robison-Ester (K-Salz), 0.5 ccm Zwischenferment aus Löwenbräu-Hefe, 0.5 ccm Co-Ferment aus Pferdeblut, 0.2 ccm  $m_{1/2}$ -Phosphatmischung pH = 7.0. Im Einsatz: 0.2 ccm 2-n. KOH. Im Anhang: 0.8 ccm Ferment-Lösung bzw. kolloider Träger. Reiner Sauerstoff.

### Sauerstoffaufnahme (cmm)

nach	0.4 γ Flavin	natürliches gelbes Ferment (ungespalten)		
		0.8 γ Flavin	1.6 γ Flavin	3.2 γ Flavin
10 Min.	15	29	60	82.5
20 Min.	26	50	121	142
30 Min.	33	69	174	185

nach	kolloider Träger allein	Sauerstoffaufnahme (cmm)		
		natürliches Ferment	synthetisches Ferment aus 5'-Phosphorsäure (nach Abzug des vom Träger aufgenommenen O <sub>2</sub> , für je 1 γ Lactoflavin in 1 ccm Ferment-Lösung)	31
10 Min.	9.8	30		31
20 Min.	19.6	60		60
30 Min.	28.6	81		81
40 Min.	35.2	114		106
55 Min.	53.1	149		152

Die vor 1½ Jahren aus natürlichem, freiem Lactoflavin und Phosphor-oxychlorid dargestellte Lactoflavin-phosphorsäure<sup>8)</sup> besteht überwiegend aus Lactoflavin-5'-phosphorsäure. Sie kuppelt demgemäß, wie schon damals mitgeteilt wurde, mit dem kolloiden Träger unter Bildung von gelbem Ferment, was H. Theorell<sup>9)</sup> zu Unrecht angezweifelt hat. Die durch Phosphorylierung von freiem Lactoflavin erhältlichen Lactoflavin-phosphorsäure-Präparate enthalten allerdings auch Phosphorsäure-ester, die zur Kupplung mit dem kolloiden Träger nicht befähigt sind. Mißt man daher die Geschwindigkeit der O<sub>2</sub>-Aufnahme bei Anwesenheit äquivalenter oder überschüssiger Mengen des kolloiden Trägers, so ist die katalytische Wirkung solcher Präparate z. B. 35% kleiner als die der Lactoflavin-5'-phosphorsäure. Nimmt man aber einen Unterschuß an kolloidem Träger und entfernt man die nicht kupplenden inaktiven Phosphorsäure-ester durch Dialyse, so erhält man ein gelbes Ferment, das innerhalb der Fehlergrenzen dieselbe Wirksamkeit wie das natürliche besitzt. Es gelingt somit durch diese „biologische Reinigung“ inaktive Phosphorsäure-ester des Lactoflavins zu entfernen, wovon wir auch bei der synthetischen 5'-Phosphorsäure zur Abtrennung geringer Mengen von Begleitstoffen Gebrauch gemacht haben.

Den Herren H. Stocker, K. Breitwieser und H. W. Rzeppa danken wir für ihre ausgezeichnete Unterstützung.

### 359. Kurt Brass und Erich Clar: Über das Perylen-tribromid. Erwiderung auf Bemerkungen von A. Zinke und A. Pongratz.

[Aus d. Institut für organ.-chem. Technologie d. Deutschen Techn. Hochschule Prag u. d. Clarschen Privatlaborat., Herrnskrtschen in Böhmen.]

(Eingegangen am 22. Juli 1936.)

In einer kürzlich erschienenen Mitteilung befassen sich A. Zinke und A. Pongratz<sup>1)</sup> mit dem von uns bei milder Einwirkung von Brom auf Perylen erhaltenen tieffarbigen Perylen-tribromid<sup>2)</sup>. Die Verfasser glauben auf Grund ihrer Analysen den Beweis erbracht zu haben, daß diese Verbindung ein normales Additionsprodukt, und zwar ein Perylen-tetrabromid ist oder ein Perbromid.

Im Hinblick auf die in Frage stehende Konstante der Zusammensetzung unseres Perylen-tribromides wäre es notwendig gewesen, wenn Zinke und

<sup>8)</sup> R. Kuhn u. H. Rudy, B. 68, 383 [1935].

<sup>9)</sup> I. c., S. 266/267.

<sup>1)</sup> B. 69, 1591 [1936].

<sup>2)</sup> K. Brass u. E. Clar, B. 65, 1660 [1932].