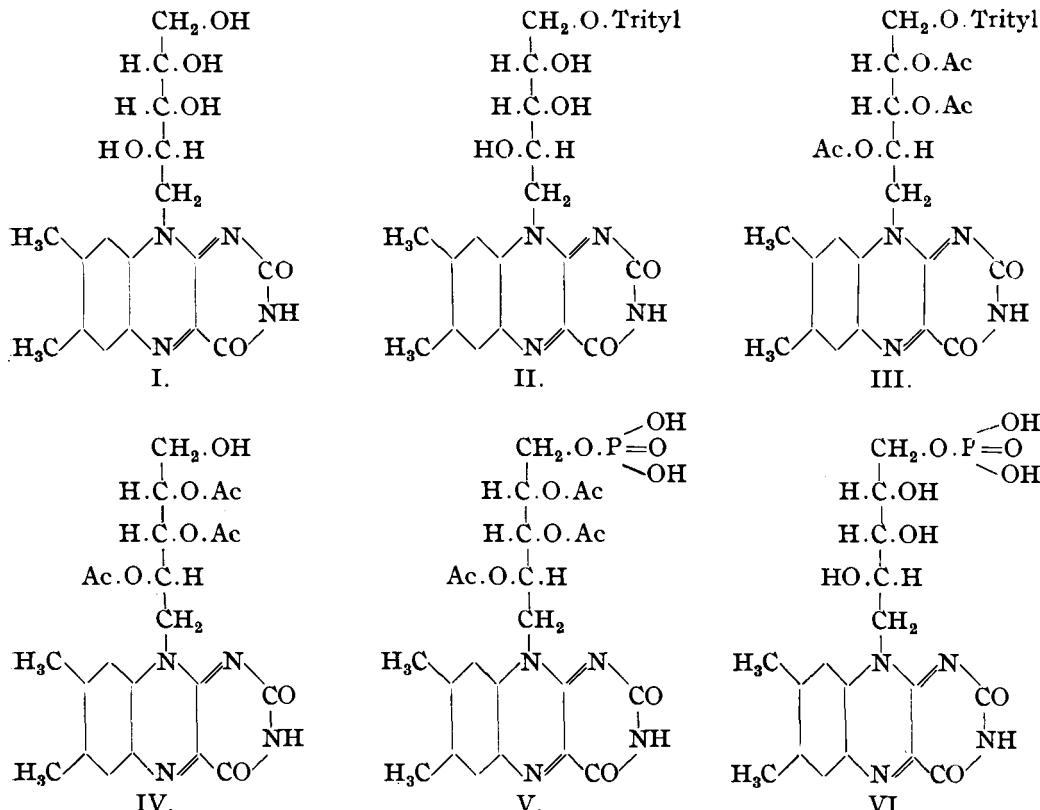


**372. Richard Kuhn, Hermann Rudy und Friedrich Weygand:**  
**Über die Bildung eines künstlichen Ferments aus 6.7-Dimethyl-9-*l*-araboflavin-5'-phosphorsäure.**

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizin. Forschung, Heidelberg, Institut für Chemie.]  
 (Eingegangen am 4. August 1936.)

Entsprechend der Synthese der Lactoflavin-5'-phosphorsäure<sup>1)</sup>, die sich als prosthetische Gruppe des natürlichen gelben Ferments erwiesen hat<sup>2)</sup>, haben wir das 6.7-Dimethyl-9-*l*-araboflavin<sup>3)</sup> (I) über die Zwischenstufen II—V in die 6.7-Dimethyl-9-*l*-araboflavin-5'-phosphorsäure (VI) verwandelt. Diese künstliche Flavin-phosphorsäure reagiert wie die natürliche mit dem nach H. Theorell<sup>4)</sup> gewonnenen kolloiden Träger des gelben Ferments unter Bildung eines nicht fluoreszierenden, nicht dialysierbaren gelben Chromoproteids von hoher katalytischer Wirksamkeit, das sich durch verd. Säuren wieder in seine Komponenten zerlegen lässt. Die Übertragung des Verfahrens auf weitere synthetische Flavine, die an B<sub>2</sub>-frei ernährten Ratten Wachstumswirkung zeigen, dürfte die Darstellung einer ganzen Anzahl von künstlichen Fermenten ermöglichen. Wird die kata-



<sup>1)</sup> R. Kuhn, H. Rudy u. F. Weygand, B. **69**, 1543 [1936].

<sup>2)</sup> R. Kuhn u. H. Rudy, B. **69**, 1974 [1936].

<sup>3)</sup> R. Kuhn u. F. Weygand, B. **67**, 1939, 2084 [1934]; **68**, 1282 [1935].

<sup>4)</sup> Biochem. Ztschr. **278**, 263 [1935].

lytische Wirksamkeit dieser Fermente, gemessen an der O<sub>2</sub>-Übertragung in vitro, dieselben Abstufungen zeigen wie die Wachstumswirkung der zugrundeliegenden Flavine, die wir im Tierversuch gefunden haben?

### Beschreibung der Versuche.

0.1 g 6.7-Dimethyl-9-*l*-araboflavin (I) wird in 15 ccm scharf getrocknetem Pyridin suspendiert und mit 0.5 g Tritylchlorid solange zum Sieden erhitzt, bis alles Flavin in Lösung gegangen ist, was durchschnittlich 5 Min. dauert. Nach dem Erkalten gießt man in 200 ccm Wasser, schüttelt gut durch und entzieht dem Wasser das Trityl-flavin sowie das Tritanol mit 100, 80 und 50 ccm Essigester. Die mit Natriumsulfat getrocknete Essigester-Lösung wird im Vak. fast zur Trockne verdampft und mit heißem Benzin (Sdp. 120—180°) versetzt. Man saugt die blaßgelbe Fällung ab, suspendiert sie in etwa 10 ccm Essigester und fügt diesem in der Siedehitze solange tropfenweise Pyridin zu, bis alles in Lösung gegangen ist. Dann versetzt man bis zur bleibenden Trübung mit heißem Benzin und läßt erkalten. Nach Wiederholung des Umkristallisierens, in der beschriebenen Weise, schmilzt das 5'-Trityl-6.7-dimethyl-9-*l*-araboflavin (II) bei 262—263° (k. Th., Zers.). Es stellt unter dem Mikroskop sternförmig angeordnete gelbe Prismen dar.

4.090 mg Sbst. (bei 100°, 0.01 mm getr.): 10.47 mg CO<sub>2</sub>, 2.095 mg H<sub>2</sub>O. — 4.970 mg Sbst.: 0.391 ccm N (752 mm, 23°).

C<sub>38</sub>H<sub>34</sub>O<sub>6</sub>N<sub>4</sub> (618.3). Ber. C 69.87, H 5.54, N 9.06.

Gef. „, 69.81, „, 5.73, „, 8.98.

Die Löslichkeitseigenschaften sind denen des 5'-Trityl-lactoflavins sehr ähnlich.

0.05 g 5'-Trityl-6.7-dimethyl-9-*l*-araboflavin werden in 15 ccm Pyridin gelöst, mit 3 ccm Essigsäure-anhydrid versetzt und 4 Stdn. auf 40—45° erhitzt. Nach dem Erkalten gießt man in 300 ccm Wasser und schüttelt den Farbstoff mit 80, 50 und 30 ccm Essigester aus, trocknet mit Natriumsulfat und verdampft im Vak. zur Trockne. Nach 2-maliger Kristallisation aus Essigester-Pyridin + Benzin stellt das 2'.3'.4'-Triacetyl-5'-trityl-6.7-dimethyl-9-*l*-araboflavin (III) gelbe, sternförmig angeordnete, feine Prismen dar. Schmp. 240° (k. Th., Zers.).

4.333 mg Sbst. (bei 100°, 0.01 mm getr.): 10.725 mg CO<sub>2</sub>, 2.175 mg H<sub>2</sub>O. — 5.374 mg Sbst.: 0.363 ccm N (751 mm, 28°).

C<sub>42</sub>H<sub>40</sub>O<sub>9</sub>N<sub>4</sub> (744.3). Ber. C 67.71, H 5.41, N 7.52.

Gef. „, 67.51, „, 5.62, „, 7.57.

Die Triacetyl-trityl-Verbindung läßt sich zu 6.7-Dimethyl-9-*l*-araboflavin verseifen, wenn man mit verd. Essigsäure kocht und mit verd. Natronlauge in der Kälte kurz stehen läßt. Die Abspaltung von Trityl und Acetyl kann auch in umgekehrter Reihenfolge vorgenommen werden.

0.1 g 2'.3'.4'-Triacetyl-5'-trityl-6.7-dimethyl-9-*l*-araboflavin wird in 20 ccm 80-proz. Essigsäure eingetragen und solange zum Sieden erhitzt, bis eine in Wasser gegossene, mit 2-*n*.Natronlauge alkalisch gemachte und nach 2 Min. mit Essigsäure wieder angesäuerte sowie mit einigen Tropfen Pyridin versetzte Probe keinen Farbstoff beim Durchschütteln an Essigester mehr abgibt. Nach dem Verdünnen mit 200 ccm Wasser filtriert man vom Tritanol ab, engt im Vakuum ein und kristallisiert aus Essigester sowie aus ganz verd. Essigsäure mehrfach um. Man erhält so das 2'.3'.4'-Tri-

acetyl-6.7-dimethyl-9-*l*-araboflavin (IV) in morgensternförmig angeordneten, schönen gelben Nadeln vom Schmp. 209° (k. Th., Zers.).

1.464 mg Sbst. (100%, 0.01 mm getr.): 0.143 ccm N (747 mm, 23°).

$C_{35}H_{26}O_9N_4$  (502.2). Ber. N 11.15. Gef. N 11.07.

Die Löslichkeitseigenschaften der Triacetyl-Verbindung sind denen des 2'.3'.4'-Triacetyl-lactoflavins ähnlich.

0.05 g 2'.3'.4'-Triacetyl-6.7-dimethyl-9-*l*-araboflavin wurden in 100 ccm trockenem Pyridin heiß gelöst und nach dem Abkühlen auf 20° mit einer Lösung von 0.5 g Phosphoroxychlorid in 30 ccm Pyridin versetzt. Die Reinigung des erhaltenen Flavin-phosphorsäure-esters durch Adsorption an Frankonit KI, die Abspaltung der Acetylgruppen durch *n*/4-Natronlauge in der Kälte und die weitere Reinigung der 6.7-Dimethyl-9-*l*-araboflavin-5'-phosphorsäure (VI) über das Silber- und Calciumsalz wurden wie bei der Synthese der Lactoflavin-5'-phosphorsäure vorgenommen. Das Natriumsalz diente zu den Kupplungs-Versuchen mit dem kolloiden Träger, wobei es stets im Überschuß (etwa 100%) angewandt wurde. Auch bei den Vergleichsversuchen mit freien Flavinen und mit Lactoflavin-5'-phosphorsäure war etwa doppelt so viel Farbstoff vorhanden, als die angewandte Menge des kolloiden Trägers zu binden vermochte.

#### Methylenblau-Entfärbung.

Je 0.50 ccm Methylenblau 1 : 5000, 0.10 ccm  $m/2$ -Phosphat von  $pH = 7.0$ , 0.30 ccm  $m/50$ -Neuberg-Ester (Kaliumsalz), 0.20 ccm Co-Ferment aus Pferdeblut, 0.50 ccm Zwischenferment aus Löwenbräu-Hefe. 37.5°.

Je 0.50 ccm kolloider Träger	entfärbt nach
0.10 ccm Wasser	39 Min.
0.10 ccm 6.7-Dimethyl-9- <i>d</i> -ribo-flavin-5'-phosphorsäure	1 Min.
0.10 ccm 6.7-Dimethyl-9- <i>l</i> -araboflavin-5'-phosphorsäure	3 $\frac{1}{2}$ Min.

#### Sauerstoffaufnahme.

Je 1 ccm  $m/10$ -Robison-Ester, 0.20 ccm  $m/2$ -Phosphat von  $pH = 7.0$ , 0.50 ccm Co-Ferment aus Pferdeblut, 0.50 ccm Zwischenferment aus Löwenbräu-Hefe. Im Anhang 0.50 ccm kolloider Träger + 0.10 ccm Flavin bzw. Flavinphosphorsäure (etwa 100% Überschuß) + 0.20 ccm Wasser. Im Einsatz: 0.20 ccm 2-*n*. Kalilauge. Reiner Sauerstoff; 37.5°.

cmm Sauerstoff

Zeit (Min.)	Träger ohne Flavin	6.7-Dimethyl- 9- <i>d</i> -ribo- flavin	6.7-Dimethyl- 9- <i>l</i> -araboflavin	6.7-Dimethyl- 9- <i>d</i> -ribo-flavin- 5'-phosphors.	6.7-Dimethyl-9- <i>l</i> -araboflavin- 5'-phosphors.
		[nach Abzug des vom Träger aufgenommenen $O_2$ aus Spalte 2]			
5	—	0.54	3.5	22.6	15.0
10	1.7	4.8	6.9	45.1	26.7
15	3.4	5.7	8.0	60.7	37.2
20	5.2	7.1	10.5	76.4	45.2
30	8.7	5.7	10.5	104.2	58.7
40	13.9	8.2	14.1	130.4	75.2
50	19.1	8.9	12.6	154.7	87.9
60	22.5	9.1	13.5	177.2	102.6
70	26.1	9.5	16.1	187.5	113.8

Die nach der Methylenblau-Methode und die manometrisch gefundenen Werte zeigen, daß die katalytische Wirksamkeit des künstlichen „*l*-Araboflavin-Ferments“ geringer aber von gleicher Größenordnung wie die des natürlichen „*d*-Ribo-Ferments“ ist.

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