

Der durch Verseifen mit alkoholischer Lauge unter Stickstoff erhaltene Alkohol C kristallisierte nach der Destillation i. Vak. bis -60° herab nicht.

Die übrigen 3 isomeren 1,4-Dimethyl-cyclohexanole-(2) wurden, nachdem sie durch fraktionierte Destillation bereits praktisch einheitlich erhalten worden waren¹¹⁾, über die Phthalate gereinigt; ihre physikalischen Konstanten wurden überprüft und ergänzt. Sie stimmen recht gut mit den früher⁹⁾ gefundenen überein, die an den nur durch fraktionierte Kristallisation der Phthalate getrennten Alkoholen festgestellt worden waren. Alkohol D schmilzt reinst bei $+18^{\circ}$, also wenig höher, als früher angegeben.

1,4 Dimethyl- cyclohexanol-(2)	d_4^{20}	d_4^{40}	n_D^{20}	n_D^{40}	MR_D (ber. 38.47)	η^{40}
A	—	0.8858	1.4558	1.4470	38.67	4.77
B	0.8981	0.8820	1.4542	—	38.67	10.26
C	0.9156	0.9013	1.4612	—	38.44	12.59
D	0.9203	0.9025	1.4629	—	38.36	13.05

cis- und trans-Dimethylcyclohexan

cis-Form: 10 g der Fraktion 2 aus Alkohol C in Substanz nahmen mit 1 g Platinmohr 2,2 l H_2 ($20^{\circ}/730$ Torr) auf, ber. 2.1 l. Das Reaktionsprodukt wurde durch Destillation an der Drehbandkolonne in 6 Fraktionen zerlegt, die mit Ausnahme der ersten bei $123.5^{\circ}/720$ Torr übergingen; ihre Brechungsindizes lagen zwischen 1.4278 und 1.4288. Fraktion 4, 4 ccm, mit n_D^{20} 1.4285, wurde als die reinste angesehen.

trans-Form: Wegen der geringen Menge wurde Fraktion 2 zusammen mit den Fraktionen 1 und 3, die noch Petroläther bzw. Alkohol B enthielten, insgesamt 11 g, in petrolätherischer Lösung hydriert. Es wurden 1.05 l H_2 aufgenommen, die 5 g Dimethylcyclohexen entsprechen. Bei der Destillation an der Drehbandkolonne unter 726 Torr wurden 8 Kohlenwasserstofffraktionen aufgefangen; bei den Fraktionen 6 und 7, zus. 1.1 g, war der Brechungsindex mit n_D^{20} 1.4208 konstant, bei 8 mit 1.4212 nur wenig höher.

THOMAS KAUFFMANN und KARL VOGT

Isolierung von D-Lactoflavin und Isoxanthopterin aus der Haut des Feuersalamanders (*Salamandra maculosa* Laur.)

Aus dem Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule Darmstadt

(Eingegangen am 11. Juni 1959)

Aus der Haut des Feuersalamanders wurden neben Guanin D-Lactoflavin und Isoxanthopterin in kristalliner Form isoliert. Das D-Lactoflavin (Vitamin B₂) bedingt zusammen mit wenig farbwirksamen Lipochromen die gelbe Warnfarbe des Feuersalamanders.

In der Haut von Amphibien wurden von verschiedenen Autoren¹⁾ chromatographisch eine Reihe im UV-Licht blau, gelb und rot fluoreszierender Pigmente nachgewiesen, von denen aber bisher noch keines rein dargestellt und analysiert wurde. Um

¹⁾ Siehe die Übersicht von I. ZIEGLER-GÜNDER, Biol. Rev. Cambridge philos. Soc. 31, 313 [1956].

die Bearbeitung dieser Substanzen auf eine sichere Grundlage zu stellen, versuchten wir, die fluoreszierenden Hautinhaltsstoffe des Feuersalamanders zu gewinnen. Es kam uns dabei zustatten, daß im hiesigen Institut infolge der Arbeiten über die Salamander-Giftstoffe Feuersalamander in größerer Zahl zur Verfügung standen.

Unser Interesse richtete sich aus folgenden Gründen zunächst auf das gelbgrün fluoreszierende Pigment des Feuersalamanders:

1. Diese Substanz bedingt nach unseren Beobachtungen neben weit weniger farbwirksamen Lipochromen die leuchtende Farbe²⁾ der gelben Flecken und mußte daher in relativ großer Menge in der Haut enthalten sein.

2. Von I. GÜNDER³⁾ wurde in der Haut des Feuersalamanders, des Grasfrosches und anderer Amphibien papierchromatographisch eine gelbgrün fluoreszierende Substanz nachgewiesen und als Lactoflavin angesprochen. Eine spätere, eingehende Untersuchung⁴⁾ der Oxydations- und Photolyse-Produkte des gelbgrün fluoreszierenden Pigments des Grasfrosches (*Rana temporaria*) ergab jedoch, daß nicht Lactoflavin, sondern ein Pteridin vorliegt, das wahrscheinlich mit dem gelben Pteridin aus *Drosophila*-Augen⁵⁾ identisch ist. Die Lactoflavin-Natur des im Feuersalamander und anderen Amphibien nachgewiesenen gelbgrün fluoreszierenden Pigments erschien danach zweifelhaft^{1,4)}.

1. ISOLIERUNG KRISTALLINER SALAMANDER-PIGMENTE

300 Häute von *Salamandra maculosa* wurden nacheinander bei Raumtemperatur mit Äther, 2 n wäßr. NH_3 /Methanol⁶⁾ (3:1) und 1.5 n wäßr. NaOH /Methanol⁶⁾ (1:1) extrahiert. Der Ätherextrakt war durch bisher nicht näher untersuchte Lipochrome (Carotinoide?) schwach gelbrot gefärbt und enthielt keine im UV-Licht fluoreszierenden Substanzen. Die ursprünglich leicht rotstichig gelben Hautstellen waren nach der Ätherextraktion rein zitronengelb. Der schwach gelbe NH_3 -Extrakt enthielt vier im UV-Licht fluoreszierende Substanzen, deren Fluoreszenzfarben und R_F -Werte (s. Abbild. 1) mit den von GÜNDER³⁾ in der Haut von *Salamandra salamandra*, *Salamandra atra* und anderen Amphibien nachgewiesenen und bei *Rana temporaria*⁴⁾ näher untersuchten vier fluoreszierenden Pigmenten übereinstimmen. Wir bezeichnen diese Substanzen vorläufig, wie in der Abbild. 1 angegeben, mit P_1 – P_4 . Die hellblau fluoreszierende Substanz P_4 geht wie das entsprechende Pigment von *Rana temporaria* beim Belichten sehr rasch in eine ebenfalls hellblau fluoreszierende Substanz über, bei der es sich nach den R_F -Werten um Pteridin-carbonsäure-(6) handeln könnte. Das gelbgrün fluoreszierende Pigment P_3 liegt im Vergleich zum NaOH -Extrakt nur in geringer Menge vor⁷⁾.

²⁾ Salamanderhäute, aus denen ohne vorherige Ätherextraktion das gelbgrün fluoreszierende Pigment mit verdünnter Natronlauge oder Salzsäure extrahiert wurde, waren trotz ihres durch nachträgliche Ätherextraktion nachweisbaren Lipochrom-Gehaltes an den ursprünglich gelben Hautstellen fast farblos.

³⁾ Z. vergleich. Physiol. 36, 78 [1954].

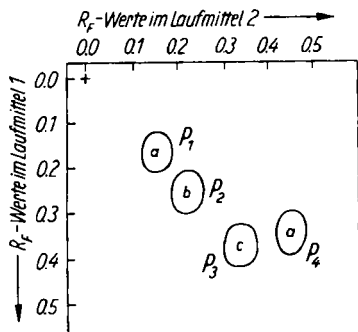
⁴⁾ I. ZIEGLER-GÜNDER, Z. Naturforsch. 11b, 493 [1956].

⁵⁾ H. S. FORREST und H. K. MITCHELL, J. Amer. chem. Soc. 76, 5656, 5658 [1954].

⁶⁾ Der Methanolzusatz verhindert, daß bei der Extraktion Schleime entstehen.

⁷⁾ Da bei der früheren Untersuchung³⁾ der Salamanderpigmente nur mit Ammoniak extrahiert wurde, konnte wohl nur ein Teil dieser Substanz erfaßt werden.

Bei der Extraktion mit methanolischer NaOH wurden die melaninfreien, nach der NH_3 -Extraktion immer noch gelben Hautstellen innerhalb weniger Minuten farblos und durchsichtig. Der entstandene tiefgelbe *NaOH-Extrakt* enthielt nur kleine Mengen der hellblau bzw. violettblau fluoreszierenden Pigmente P_1 , P_2 und P_4 , dagegen sehr viel des gelben, gelbgrün fluoreszierenden Pigments P_3 . Die Farbe der gelben Salamanderflecken wird somit wohl in erster Linie durch die Substanz P_3 verursacht.



Abbild. 1. Papierchromatogramm der im UV-Licht fluoreszierenden, mit Ammoniak oder Natronlauge extrahierbaren Hautpigmente des Feuersalamanders. Laufmittel 1: n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5); Laufmittel 2: Äthanol/n-Butanol/konz. NH_3 /Wasser (50:15:10:25). Fluoreszenzfarben: a = hellblau; b = violettblau; c = gelbgrün

Die Auftrennung der NH_3 -Fraktion, in der die blau fluoreszierenden Salamanderpigmente angereichert sind, ist im präparativen Maßstab noch nicht gelungen, da bei der Fraktionierung durch Craig-Verteilung stets Emulsionsbildung eintrat. Dagegen konnten aus der NaOH-Fraktion, wie im Versuchsteil beschrieben, durch fraktionierte Kristallisation und Craig-Verteilung folgende Substanzen in kristallisierter Form gewonnen werden:

1. 23.5 mg des gelben, gelbgrün fluoreszierenden, in Nadeln kristallisierten Pigments P_3 , das durch Analyse, IR- und UV-Spektrum, Drehwert, R_F -Werte und Farbreaktion nach R. KUHN und H. KALTSCHMITT⁸⁾ sowie durch Analyse, IR-Spektrum (s. Abbild. 2), UV-Spektrum und Schmelzpunkt (Misch-Schmp. mit authent. Vergleichssubstanz) der Tetraacetyl-Verbindung eindeutig als *D-Lactoflavin* identifiziert wurde.

2. 3.1 mg des violettblau fluoreszierenden, in Nadeln kristallisierten Pigments P_2 , bei dem es sich nach den Analysenwerten, dem UV-Spektrum, den R_F -Werten, der Fluoreszenzfarbe und der Lichtbeständigkeit um *Isoxanthopterin* handelt⁹⁾.

3. 1.19 g *Guanin*, das durch die Analyse und das IR-Spektrum des Hydrochlorids sowie durch seine R_F -Werte charakterisiert wurde.

2. BINDUNG DES LACTOFLAVINS IN DER HAUT DES FEUERSALAMANDERS

Während freies Lactoflavin in $2n$ NH_3 leicht löslich ist, geht bei der Behandlung von Salamanderhäuten mit $2n$ NH_3 nur ein kleiner Teil des enthaltenen Lactoflavins

⁸⁾ Ber. dtsch. chem. Ges. **68**, 128 [1935].

⁹⁾ Das IR-Spektrum zeigte kleine Abweichungen vom IR-Spektrum eines synthetischen Isoxanthopterin-Präparates¹⁰⁾. Diese beruhen vermutlich auf einer Verunreinigung des isolierten Isoxanthopterins, das wegen der geringen Menge nicht weiter gereinigt werden konnte. Wir hoffen, aus der an Isoxanthopterin reicheren NH_3 -Fraktion ein ganz reines Präparat erhalten zu können.

¹⁰⁾ Herrn Prof. Dr. R. TSCHESCHE danke ich für die Überlassung von Isoxanthopterin.

in Lösung, auch wenn getrocknete, pulverisierte und mit Äther von Lipiden befreite Häute extrahiert werden. Außerdem ist das Lactoflavin der Salamanderhaut im Gegensatz zur freien Substanz gegen Belichtung sehr beständig. Es dürfte daher nicht in freier Form, sondern gebunden vorliegen.

Der Gedanke an ein Lactoflavinoprotein ist naheliegend. Aus folgenden Gründen muß aber auch eine Bindung durch Einschluß in festes Guanin in Betracht gezogen werden:

1. Das Lactoflavin befindet sich beim erwachsenen Tier nur in den festes Guanin enthaltenden Hautzellen (Guanophoren)³⁾.

2. Beim Neutralisieren einer sauren oder alkalischen lactoflavinhaltigen Guaninlösung wird das Lactoflavin vom ausfallenden Guanin mitgerissen, wobei leuchtend gelbe amorphe oder kristalline Niederschläge entstehen¹¹⁾, in denen das Lactoflavin gegen Belichtung sehr beständig ist. Infolge der Unlöslichkeit des Guanins in Ammoniak kann aus diesen Misch- oder Einschluß-Verbindungen das Lactoflavin wie aus der Salamanderhaut mit Ammoniak nur sehr langsam und unvollständig extrahiert werden, während es mit verdünnter Natronlauge oder verdünnter Salzsäure infolge der Auflösung des Guanins rasch in Lösung geht.

Wir danken Herrn Prof. Dr. Dr. C. SCHÖPF, der seinerseits das verwendete Material mit Unterstützung der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT beschaffen konnte, für die Überlassung von Feuersalamandern.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

1. *Ätherextrakt*: 300 getrocknete, von Bindegewebe sorgfältig befreite Häute von *Salamandra maculosa* wurden zur Extraktion von Lipoiden 3 Tage unter 10 l Äther aufbewahrt, wobei sich der Äther bräunlich bis rötlich-gelb färbte. Bei erneuter 2 tägiger Extraktion mit frischem Äther färbte sich das Lösungsmittel nur noch sehr schwach gelb. In den stark eingegengten vereinigten Ätherlösungen konnten papierchromatographisch keine im UV-Licht fluoreszierenden Substanzen nachgewiesen werden. Beim vollständigen Abdampfen des Äthers i. Vak. hinterblieben 8.2 g eines fischartig riechenden schmierigen Rückstandes, der noch nicht näher untersucht wurde. Nach der Ätherextraktion waren die zunächst schwach rotstichig gelben Hautstellen rein gelb.

2. *NH₃-Extrakt*: Die mit Äther extrahierten Häute¹²⁾ wurden 3 Tage mit insgesamt 20 l 2*n* wäbr. NH₃/Methanol (3:1) extrahiert, wobei mehrfach durchgeschüttelt und das Lösungsmittel 2mal erneuert wurde¹³⁾. Nach der NH₃-Extraktion waren die melaninfreien Hautstellen noch gelb. Die abgegossenen Lösungen waren schwach gelb gefärbt. Sie wurden vereinigt und im Vak. unter Stickstoff bei einer Badtemp. von 25° auf 200 ccm eingeeengt,

¹¹⁾ Auch Guanin-hydrochlorid kristallisiert aus wäßrigen, Lactoflavin enthaltenden Lösungen in intensiv gelben, lactoflavinhaltigen Kristallen.

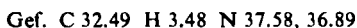
¹²⁾ Bei einer späteren Aufarbeitung wurden nicht die abgezogenen Häute, sondern ganze Tiere mit Äther, Ammoniak und verd. NaOH extrahiert. Die hierbei erhaltenen Ammoniak- und Natronlauge-Auszüge enthielten im wesentlichen nur die fluoreszierenden Substanzen, die auch in den entsprechenden Extrakten abgezogener Häute nachgewiesen wurden, und waren im Vergleich zu diesen Extrakten kaum stärker durch Eiweiß verunreinigt.

¹³⁾ Wegen der Lichtempfindlichkeit der fluoreszierenden Salamanderpigmente wurde die Extraktion und Aufarbeitung dieser Substanzen bei schwachem Rotlicht durchgeführt.

wobei sich farbloses Eiweiß abschied, das abfiltriert wurde. Das braune Konzentrat wurde zur Entfernung von Lipoiden 3 mal ausgeäthert. Zur Trennung der Schichten mußte jeweils zentrifugiert werden. Um restliches Eiweiß und andere emulsionsfördernde Verbindungen zu beseitigen, wurde die i. Vak. von Äther befreite Lösung durch eine Cellulosepulver-Säule ($\varnothing = 5$ cm, $h = 35$ cm, Whatman-Cellulosepulver „Standard Grade“) filtriert, worauf mit $2n$ NH_3 gewaschen wurde, bis die im UV-Licht fluoreszierenden Substanzen aus der Säule gelaufen waren. Die abgelaufenen Lösungen wurden i. Vak. zur Trockne eingedampft. Es wurden 0.8 g eines gelbbraunen amorphen Rückstands erhalten, der nach den Ergebnissen papierchromatographischer Untersuchungen neben wenig Guanin 4 im UV-Licht fluoreszierende Substanzen (R_F -Werte in 2 Laufmitteln: siehe Abbild. 1; R_F -Werte in 3proz. Ammoniumchlorid-Lösung: P_1 0.17; P_2 0.33; P_3 0.30; P_4 0.51; Whatman Papier Nr. 1) enthielt. Das gelbgrün fluoreszierende Pigment P_3 (s. Abbild. 1) lag im Vergleich zum NaOH-Extrakt nur in geringer Menge vor. Der Nachweis des Guanins erfolgte durch Papierchromatographie in den Laufmitteln n -Butanol/Eisessig/ H_2O (4:1:5; R_F 0.25¹⁴⁾) und Äthanol/ n -Butanol/konz. $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ (50:15:10:25; R_F 0.34¹⁴⁾) und Besprühen der Chromatogramme mit einer Lösung von 0.1 g diazotierter Sulfanilsäure in 100 ccm 10-proz. Na_2CO_3 -Lösung¹⁵⁾. Versuche zur präparativen Trennung der im NH_3 -Extrakt enthaltenen Substanzen durch Craig-Verteilung scheiterten bisher am Auftreten stabiler Emulsionen.

3. *NaOH-Extrakt*: Die mit verd. NH_3 extrahierten Häute wurden unter vorsichtigem Rühren¹⁶⁾ 10 Min. bei Raumtemp. mit 9 l 1.5 n wäbr. NaOH/Methanol (1:1) extrahiert, wobei die gelben und undurchsichtigen Hautstellen farblos und durchsichtig wurden. Die abgegossene, intensiv gelbe Lösung wurde sofort mit konz. Essigsäure auf p_H 6.8 eingestellt und, wie beim NH_3 -Extrakt beschrieben, auf 160 ccm eingengt. Es bildete sich unter Abscheidung von Natriumacetat, Eiweiß und einer wasserunlöslichen gelbbraunen Kristallmasse eine tiefbraune Lösung, in der papierchromatographisch nur geringe Mengen fluoreszierender Substanzen nachgewiesen werden konnten, so daß sich die Aufarbeitung nicht lohnte. Der Niederschlag wurde abgenutscht und durch mehrmaliges Aufschlännen mit Wasser von Eiweiß und Natriumacetat befreit. Fettartige Verunreinigungen wurden durch Waschen mit Aceton und Äther beseitigt. Es blieben 2.2 g eines in $2n$ NH_3 schwerlöslichen, in verd. Natronlauge oder verd. Salzsäure dagegen leichtlöslichen gelbbraunen Pulvers zurück, das im folgenden als „Guanin-Lactoflavin-Fraktion“ bezeichnet wird.

Abtrennung von Guanin durch fraktionierte Kristallisation: 2.1 g des gelbbraunen Pulvers wurden bei 40° mit 80 ccm $n/3$ HCl digeriert, wobei alles bis auf einen geringen, im UV-Licht nicht fluoreszierenden, schwarzen Rückstand in Lösung ging. Beim Einengen der Lösung im Vak. auf 20 ccm schied sich lactoflavinhaltiges Guanin-hydrochlorid in schönen, gelben Nadeln ab. Durch mehrmaliges fraktioniertes Umkristallisieren aus $2n$ HCl konnten daraus 1.46 g farblose Nadeln erhalten werden, die durch Analyse, IR-Spektrum und Papierchromatographie (R_F -Werte s. Abschn. 2) als *Guanin-hydrochlorid* identifiziert wurden.



Die vereinigten Guanin-hydrochlorid-Mutterlaugen (55 ccm) wurden zur Beseitigung emulsionsfördernder Verunreinigungen durch eine Cellulosepulversäule ($\varnothing = 4$ cm, $h = 30$ cm, Whatman-Cellulosepulver „Standard Grade“) filtriert, worauf die im UV-Licht fluoreszierenden Substanzen mit 0.1 n HCl ausgewaschen wurden. Die aus der Säule gelaufene

¹⁴⁾ Subst. als Hydrochlorid aufgetragen.

¹⁵⁾ Nach D. L. WOODHOUSE, *Biochem. J.* **44**, 185 [1949].

¹⁶⁾ Beim Schütteln oder starken Rühren löst sich eine zähe Schleimschicht von den Häuten ab.

Lösung enthielt neben Guanin hauptsächlich das gelbgrün fluoreszierende Pigment P_3 (s. Abbild. 1). Von den blau fluoreszierenden Substanzen war nur die Verbindung P_2 in nennenswerten Mengen vorhanden.

Craig-Verteilung: Die aus der Säule gelaufene gelbe Lösung (250 ccm) wurde im Vak. auf 150 ccm eingengt und in die ersten 6 Röhrchen einer vollautomatischen Craig-Apparatur (System F. A. v. METZSCH¹⁷⁾; 50 ccm untere Phase/Röhrchen) eingefüllt. Die Verteilung erfolgte mit dem System n -Butanol/ n /₅₀ HCl im Dunkeln oder bei schwachem Rotlicht. Nach 340 Verteilungsstufen waren das gelbe, gelbgrün fluoreszierende Pigment P_3 und die im UV-Licht violettblau fluoreszierende Substanz P_2 in den Röhrchen 120–165 bzw. 70–92 enthalten. Das Guanin befand sich, wie aus der papierchromatographischen Untersuchung einer Probe jedes fünften Röhrchens hervorging, in den Röhrchen 15–55. Die substanzhaltigen Lösungen wurden entsprechend den angegebenen Grenzen zusammengefaßt und, wie unten beschrieben, zur Trockne eingedampft.

Identifizierung des gelbgrün fluoreszierenden Pigments (P_3) mit D-Lactoflavin: Die Lösungen der Röhrchen 120–165 der Craig-Verteilung wurden zusammengefaßt. Nach der Trennung der beiden Phasen wurde die wäßrige zur Extraktion des gelben Pigments P_3 6mal mit n -Butanol ausgeschüttelt. Die wäßr. Phase war danach fast farblos und wurde daher verworfen. Die vereinigten Butanolphasen wurden bei Raumtemp. und Lichtausschluß i. Vak. unter Stickstoff zur Trockne eingedampft, wobei ein gelbroter kristalliner Rückstand (46 mg) erhalten wurde, der durch eine geringe Menge fettartiger Substanzen verunreinigt war. Waschen des getrockneten Rückstandes mit Äther und 3maliges Umkristallisieren aus kochender 2*n* Essigsäure ergab 23.5 mg orangegelbe Nadeln, die sich beim Erhitzen im Kupferblock (zugeschmolzenes Röhrchen) etwa bei 240° dunkel färbten und sich bei 280° unter Sintern zersetzten. In neutraler und saurer Lösung zeigte die chromatographisch einheitliche Substanz kein meßbares Drehvermögen, in n /₁₀ NaOH: $[\alpha]_D^{21}$: -112° ($c = 0.38$).

$C_{17}H_{20}N_4O_6$ (376.4) Ber. C 54.13 H 5.32 N 14.88 O 25.40

Gef. C 54.36, 53.98 H 5.38, 5.13 N 14.57 O 25.39

Drehwert¹⁸⁾ und Analysenwerte passen auf D-Lactoflavin, mit dem das gelbgrün fluoreszierende Salamanderpigment auch in den R_F -Werten übereinstimmt (Mischchromatogramme mit einer authent. Vergleichssubstanz). Auch die UV-Spektren der in n /₁₀ HCl und n /₁₀ NaOH gelösten Substanz stimmten mit den entsprechenden von R. KUHN und Mitarbb.¹⁹⁾ gemessenen Spektren von D-Lactoflavin überein. Bei der Reduktion mit Zinn in 10-proz. HCl trat wie beim Lactoflavin⁸⁾ zunächst eine rote Zwischenverbindung auf, die bei weiterer Reduktion farblos wurde. Da das IR-Spektrum (in KBr) des gelben Salamanderpigments einige kleine Abweichungen vom IR-Spektrum eines synthet.²⁰⁾, durch Umkristallisieren aus 2*n* Essigsäure gereinigten D-Lactoflavins aufwies, wurden 14.6 mg des aus Salamanderhäuten isolierten Lactoflavins nach R. KUHN und Th. WAGNER-JAUREGG^{21,22)} acetyliert. Reinigung der Acetylverbindung durch Chromatographie an Al_2O_3 (Essigester/Methanol [20:1]) und Umkristallisieren aus Äthanol/Wasser (1:1) ergab 8.4 mg gelbe Nadeln vom konst. Schmp. 236–237°. Die Substanz erwies sich durch Misch-Schmelzpunkt und IR-Spektrum (Abbild. 2) identisch mit Tetraacetyl-D-lactoflavin, das nach R. KUHN^{21,22)} aus

¹⁷⁾ Chemie-Ing.-Techn. 25, 66 [1953].

¹⁸⁾ R. KUHN und H. RUDY, Ber. dtsch. chem. Ges. 68, 169 [1935].

¹⁹⁾ R. KUHN, P. GYÖRGY und Th. WAGNER-JAUREGG, Ber. dtsch. chem. Ges. 66, 1034 [1933].

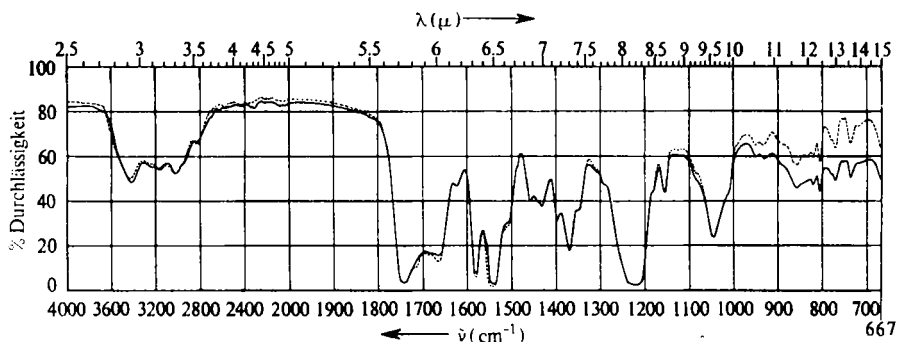
²⁰⁾ Fa. E. MERCK, Darmstadt.

²¹⁾ Ber. dtsch. chem. Ges. 67, 361 [1934].

²²⁾ Statt 2 Stdn. wurde 14 Stdn. mit Acetanhydrid in Pyridin umgesetzt.

synthet. D-Lactoflavin²⁰⁾ gewonnen wurde. Die Analysenwerte stimmen erwartungsgemäß auf Tetraacetyl-lactoflavin.

$C_{25}H_{28}N_4O_{10}$ (544.5) Ber. C 55.15 H 5.20 N 10.30 Gef. C 54.82 H 5.15 N 10.56



Abbild. 2. IR-Spektren der Tetraacetylverbindung des D-Lactoflavins aus der Haut von *Salamandra maculosa* und der Tetraacetylverbindung von synthet. D-Lactoflavin²⁰⁾ (gestrichelte Kurve), aufgenommen in KBr

Charakterisierung des violettblau fluoreszierenden Pigments (P_2) als Isoxanthopterin: Die Lösungen der Röhren 70–92 der Craig-Verteilung wurden zusammengefaßt. Nach Trennung der beiden Phasen wurde die wäßrige zur Extraktion des violettblau fluoreszierenden Pigments 5mal mit *n*-Butanol ausgeschüttelt. Die wäßr. Phase fluoreszierte nach der Extraktion nur noch schwach und wurde daher verworfen. Beim Eindampfen der vereinigten Butanolphasen bei Raumtemp. und Lichtausschluß im Vak. unter Stickstoff und Waschen des Rückstandes mit wenig Aceton und Äther wurden 9.8 mg eines grauweißen amorphen Pulvers erhalten, aus dessen warmer wäßriger Lösung sich auf Zusatz von $2n\ NH_3$ bei $p_H\ 7$ Kristalle abschieden. Nach Umkristallisieren aus Wasser wurden 3.1 mg Nadeln erhalten, die sich bei etwa 310° unter Sintern zersetzten und papierchromatographisch einheitlich waren. Die UV-Spektren (Subst. in $n/_{10}$ NaOH und in $n/_{10}$ HCl) deckten sich mit den entsprechenden in der Lit.²³⁾ angegebenen Spektren von Isoxanthopterin. Auch die Analysenwerte, die R_F -Werte (s. Abbild. 1; Mischchromatographie mit synthet. Isoxanthopterin), die Fluoreszenzfarbe und das IR-Spektrum (s. Anm. 9) sprechen für das Vorliegen von Isoxanthopterin.

$C_6H_5N_5O_2$ (179.1) Ber. C 40.22 H 2.81 Gef. C 39.93 H 3.09

Isolierung des durch Craig-Verteilung abgetrennten Guanins: Beim Eindampfen der Lösungen aus den Röhren 15–55 der Craig-Verteilung bei Raumtemp. im Vak. wurden 210 mg eines amorphen grauen Rückstandes erhalten. Waschen mit Aceton und Äther und 2maliges Umkristallisieren aus $2n\ HCl$ ergab 126 mg Nadeln, bei denen es sich nach dem IR-Spektrum und den R_F -Werten um Guanin-hydrochlorid handelt.

4. Messung der Spektren: Die Messung der UV-Spektren erfolgte beim Lactoflavin mit einem Unicam-Sp. 500 Spektrophotometer, beim Tetraacetyl-lactoflavin und beim Isoxanthopterin dagegen mit einem Perkin-Elmer-Spectrocord, Modell 4000. Die IR-Spektren wurden mit Perkin-Elmer Spektrophotometer, Modell 21, an KBr-Preßlingen gemessen.

²³⁾ M. VISCONTINI, M. SCHOELLER, E. LOESER, P. KARRER und E. HADORN, *Helv. chim. Acta* **38**, 397 [1955].