

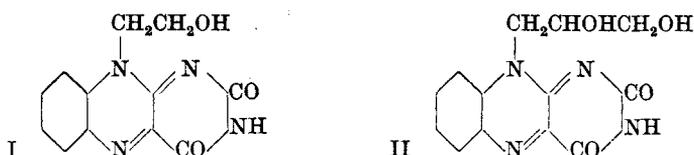
29. Über den Lichtabbau der Flavine

von P. Karrer, T. Köbner, H. Salomón und F. Zehender.

(1. II. 35.)

An den synthetischen Flavinen, die in der am N-Atom 9 befindlichen Seitenkette freie Hydroxylgruppen enthalten, haben wir früher¹⁾ festgestellt, dass sie bei der Belichtung in neutraler oder schwach saurer Lösung dem Lumichromabbau unterliegen, der zu Alloxazin bzw. dessen im Benzolkern methylosubstituierten Derivaten führt; in alkalischem Medium baut Licht diese Verbindungen teils zu 9-Methyl-iso-alloxazin ab; hier spielt sich somit neben dem Lumichrom- auch der *Warburg'sche* Lumiflavinabbau ab.

Wir haben nunmehr untersucht, welchen Verlauf die Photolyse bei Abwesenheit von Sauerstoff nimmt. Es wurden zuerst Lösungen von Oxy-äthyl-iso-alloxazin I und solche von 2',3'-Dioxy-propyl-iso-alloxazin II



im Vakuum und in reinem Stickstoff belichtet. Bei den Vakuumversuchen waren die Versuchsgefäße auf 0,2 mm Druck ausgepumpt worden; in den Versuchen in Stickstoffatmosphäre haben wir durch die Reaktionslösungen zwecks Austreiben der gelösten Luft längere Zeit reinen Stickstoff geleitet und die Gefäße im Stickstoffstrom zugeschmolzen. In den Ampullen befanden sich gesättigte wässrige oder methylalkoholische Lösungen der Flavine. Da die Löslichkeit beider Flavine (I und II) in den genannten Solventien bei Zimmertemperatur gering ist, so betrug die zu jedem Belichtungsversuch verwendeten Farbstoffmengen nur ca. 8—10 mg.

Die Lösungen entfärbten sich nach 10- bis 24-stündiger Belichtung mit einer 200 Watt-Lampe. Nach dem Öffnen der Gefäße und Einströmen der Luft kehrte eine sehr schwache gelbliche Farbe mit deutlicher Fluoreszenz zurück; es waren also Spuren von Leukoverbindungen vorhanden gewesen, die durch den Luftsauerstoff zu Farbstoffen zurückoxydiert wurden. Deren Menge war indessen äusserst gering. Als einziges definiertes Reaktionsprodukt liess sich aus allen belichteten Lösungen Alloxazin abscheiden, während 9-

¹⁾ Helv. 17, 1165 (1934).

Methyl-iso-alloxazin fehlte. Unter den anaeroben Bedingungen war somit in beträchtlichem Mass die Lumichromspaltung der Flavine vor sich gegangen.

Dieses Ergebnis war für uns überraschend, da Lactoflavin bei Ausschluss von Luftsauerstoff in ein neues Pigment bzw. sein Leukoderivat, das Leukodeuteroflavin, übergehen soll¹⁾. Das Deuteroflavin oder seine Leukoverbindung sind allerdings nie isoliert worden. Auf ihre Existenz wurde lediglich aus dem Umstand geschlossen, dass die im Vakuum belichteten Lösungen nach alkalischer Verseifung im Dunkeln an Chloroform einen gelben Farbstoff (Deuteroflavin) abgeben, was Lactoflavinlösungen nicht tun.

Wenn man wässrige oder methylalkoholische Lösungen von analysenreinem Lactoflavin, die in 40 cm³ Lösungsmittel ca. 15 mg Lactoflavin enthalten, mit der elektrischen Lampe oder im Sonnenlicht unter Ausschluss von Sauerstoff (im Vakuum oder reinen Stickstoff) belichtet, so erfolgt allmähliche Farbaufhellung, die sich in unseren Versuchen aber nie bis zur völligen Farblosigkeit fortsetzte; in einzelnen Röhren schied sich schon während der Belichtung eine geringe Menge eines schwerlöslichen Niederschlags aus.

Nach dem Öffnen der Röhren und Einströmen von Luft wurden die belichteten Lösungen wieder etwas gelber und nahmen die für Flavine charakteristische gelbgrüne Fluorescenz an. In dieser Hinsicht können wir die Angaben von *Kuhn, Rudy* und *Wagner-Jauregg*²⁾ bestätigen; es trifft auch zu, dass nach dem Verseifen solcher Lösungen mit verdünnter, kalter Natronlauge im Dunkeln der wieder angesäuerten Lösung durch Chloroform etwas Farbstoff entzogen wird. Dessen Menge ist aber äusserst gering, und seine Reinigung und Darstellung in präparativem Masstab würde bedeutende Mengen von Lactoflavin erfordern. Neben diesem chloroformlöslichen Pigment bleiben auch nach mehrmaliger alkalischer Verseifung grössere Mengen gelber Farbstoffe in der wässrigen Schicht, die mit Chloroform nicht mehr ausgezogen werden können. Bei allen diesen anaeroben Bestrahlungsversuchen beobachteten wir neben den erwähnten gelben Pigmenten relativ bedeutende Mengen Lumichrom; es ist das einzige Bestrahlungsprodukt, welches wir aus solchen Ansätzen bisher rein isolieren konnten. Die Ausbeuten aus 15 mg Lumiflavin waren etwa 2,5—5 mg. Das Lumichrom lässt sich leicht abscheiden, wenn man die bestrahlten Lösungen im Dunkeln zur Trockene verdampft, den Rückstand mit wenig heissem Wasser auslaugt, das Ungelöste abfiltriert und aus Methanol umkrystallisiert.

Die beschriebenen Beobachtungen beweisen, dass die Photolyse der Flavine auch unter Sauerstoffausschluss ein komplizierter Vor-

¹⁾ *R. Kuhn, Rudy* und *Wagner-Jauregg*, B. **66**, 1950 (1933).

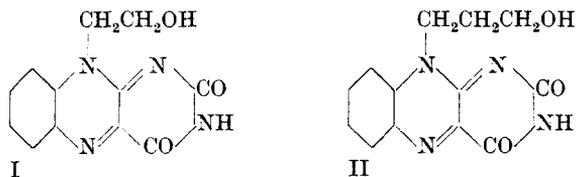
²⁾ *R. Kuhn, Rudy* und *Wagner-Jauregg*, B. **66**, 1950 (1933).

gang ist, der nicht einheitlich verläuft und zu verschiedenen Abbauprodukten führt.

W. Koschara¹⁾ ist der Auffassung, dass der Lichtabbau der Flavine mit Dehydrierungsvorgängen einsetzt. Mit dieser Ansicht stimmt unsere Beobachtung²⁾ überein, dass nur solche Flavine, die in der Seitenkette freie OH-Gruppen enthalten, in neutraler oder schwach saurer Lösung von Licht leicht abgebaut werden, während z. B. Lumiflavin und Lactoflavin-acetat, bei denen diese Voraussetzung fehlt, auch nach tagelanger Belichtung unverändert zurückgewonnen werden. Die Oxydation bzw. Dehydrierung der Flavine setzt offenbar an solchen freien OH-Gruppen ein; durch die Lichtempfindlichkeit des Oxyäthyl-isoalloxazin (I) wird bewiesen, dass schon eine freie OH-Gruppe in der Seitenkette, sofern sie sich in 2'-Stellung befindet, ausreicht, das Pigment für die Photolyse geeignet zu machen.

Beim Lichtabbau der Flavine unter Sauerstoffausschluss dürfte das für die Dehydrierung notwendige Oxydationsmittel durch das Flavin selbst geliefert werden. D. h. wir nehmen an, dass durch Cannizzaro'sche Reaktion Leukoverbindung und Dehydrierungsprodukt nebeneinander entstehen, wobei letzteres in der für die Flavinphotolyse charakteristischen Weise in verschiedene Abbauprodukte zerfällt. Dass Leukoverbindungen von Flavinfarbstoffen nach der Belichtung unter Sauerstoffausschluss in den Reaktionslösungen tatsächlich vorhanden sind, fand bereits Erwähnung.

Die Frage, an welchem C-Atom der Seitenkette des Flavins der primäre Dehydrierungsvorgang einsetzt, lässt sich voraussichtlich am ehesten durch Vergleich geeigneter synthetischer Produkte entscheiden. Wir haben daher als Ergänzung der früher gewonnenen künstlichen Flavine nun ein solches hergestellt, welches in 2'-Stellung der Seitenkette unsubstituiert ist, dagegen am C-Atom 3' eine Hydroxylgruppe trägt (II):

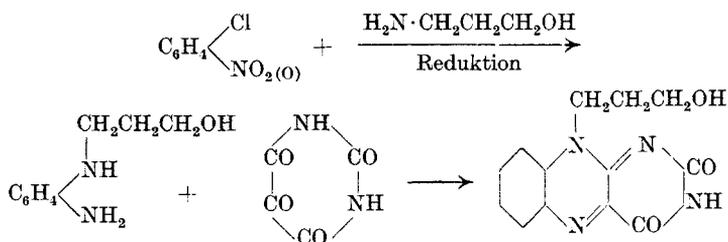


Die Verbindung wurde auf dem früher für andere Flavine mit hydroxylhaltigen Seitenketten als zweckmässig befundenen Weg bereitet³⁾:

¹⁾ Z. physiol. Ch. **229**, 103 (1934).

²⁾ Helv. **17**, 1165 (1934).

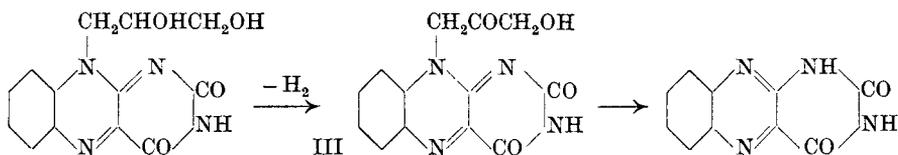
³⁾ P. Karrer, Salomon, Schöpp und Schlittler, Helv. **17**, 1165 (1934).



Dieses 9-[3'-Oxy-propyl]-iso-alloxazin krystallisiert aus Wasser in spindel- oder stäbchenförmigen Nadelchen, die teils zu Zwillingen und Nadelbüscheln verwachsen sind. In Farbe, Löslichkeit und der gelbgrünen Fluorescenz schliesst es sich den übrigen Flavinen an. Der Zersetzungspunkt liegt bei ca. 297° (Schwarzfärbung).

Lösungen des 9-[3'-Oxy-propyl]-iso-alloxazins in 75-proz. wässrigem Methanol wurden durch Sonnen- und durch diffuses Tageslicht belichtet, wobei wir als Vergleichslösungen auch solche von 9-[2'-Oxy-äthyl]-iso-alloxazin (I) mitbestrahlten. Die letzteren Lösungen waren nach kurzer Zeit (1 Tag) völlig farblos geworden; am Boden hatten sich Krystalle von Alloxazin abgeschieden und durch Verdampfen der Flüssigkeit liess sich noch mehr von diesem Spaltprodukt isolieren. Die Lösungen des 9-[3'-Oxy-propyl]-iso-alloxazins sahen dagegen selbst nach 14-tägiger Belichtung, die während der gegenwärtigen Wintermonate allerdings nicht sehr intensiv war, unverändert aus; daraus konnte kein Alloxazin, dagegen ein neuer Flavinfarbstoff (vgl. unten) isoliert werden.

Aus den geschilderten Versuchen scheint hervorzugehen, dass der Lumichromabbau der Flavine mit hydroxylhaltiger Seitenkette, der sich in neutraler Lösung abspielt, in erster Linie durch die in 2'-Stellung der Seitenkette stehende OH-Gruppe bedingt ist. Man wird anzunehmen haben, dass an dieser Stelle der primäre Dehydrierungsvorgang einsetzt, vielleicht unter Bildung einer Carbonylgruppe. Das so gebildete Zwischenprodukt III würde dann im Sinn des Lumichromabbaus weiter zerfallen:



Wir sind damit beschäftigt, diese Hypothese an Hand eines weiteren Versuchsmaterials zu prüfen.

Andere Verhältnisse liegen in alkalischem Medium vor. Hier wird 9-[3'-Oxypropyl]-iso-alloxazin durch das Licht rasch zu Alloxazin abgebaut. Man ersieht daraus, dass der Mechanismus der Photolyse der Flavine in neutraler und in alkalischer Lösung ein anderer ist.

Es wird die Aufgabe sein, durch Modellversuche die konstitutionellen Bedingungen zu ermitteln, die notwendig sind, damit sich der Lumichrom- und Lumiflavinabbau in alkalischem Medium abspielt.

Der oben erwähnte neue Flavinfarbstoff, der sich aus 9-[3'-Oxypropyl]-iso-alloxazin bei der Belichtung in 75-proz. Methanol bildet, krystallisiert aus Wasser in feinen Nadelchen. Seine Eigenschaften sowie die Ergebnisse der Analyse machen es wahrscheinlich, dass in ihm die durch Oxydation entstandene Iso-alloxazin-9-propionsäure vorliegt. Doch muss zuerst die Synthese der Verbindung die Bestätigung dieser Auffassung bringen.

Da nach der vorliegenden und den früheren Mitteilungen Lumichrom bei allen bisher untersuchten Photolysen des Lactoflavins als ein typisches, leicht isolierbares Reaktionsprodukt auftritt, möchten wir seine Eigenschaften und Reindarstellung noch etwas genauer beschreiben, als dies früher geschehen.

100 mg mehrfach umkrystallisiertes Lactoflavin werden in 40 cm³ heissem Wasser gelöst und noch warm mit 160 cm³ Methanol versetzt. Unter diesen Umständen bleibt das Flavin auch nach Abkühlen der Flüssigkeit in Lösung. Diese wird in dem früher erwähnten Belichtungsgefäss¹⁾ dem Sonnenlicht ausgesetzt. Je nach der Intensität der Strahlung bleichen solche Lösungen schon in 2—3 Stunden oder bei bedecktem Himmel innerhalb einiger Tage aus. Zum Schluss erscheint die Flüssigkeit strohgelb bis nahezu farblos. Beim Schütteln mit Luft tritt aber in der Regel wieder eine etwas stärkere Färbung mit geringer Fluoreszenz auf. Die Lösung wird jetzt unter vermindertem Druck vom grössten Teil des Methanols befreit. Die noch warme wässrige Flüssigkeit trübt sich dabei und scheidet beim Abkühlen einen pulverigen, fast farblosen Niederschlag von rohem Lumichrom aus, den man nach mehrstündigem Stehen absaugt. Das konzentrierte Filtrat sieht meistens gelb bis gelbbraun aus und enthält offenbar noch verschiedene schwerer trennbare Körper; unter diesen ist Lumichrom höchstens in Spuren vorhanden, ebenso unverändertes Lactoflavin. Die Ausbeute an Roh-Lumichrom schwankt zwischen 30 und 45% der Theorie. Die Verbindung ist auch schon ziemlich rein, die Kohlenstoff- und Stickstoffwerte liegen nur ca. 0,6—0,7% unterhalb der Theorie. Zur völligen Reinigung zieht man das Rohprodukt wiederholt mit siedendem Chloroform aus, bis fast der gesamte Rückstand gelöst ist. Die filtrierte Chloroformlösungen sehen mit Ausnahme des ersten Auszugs farblos aus. Beim Abkühlen scheidet sich das Lumichrom daraus in äusserst feinen, fast farblosen Nadelchen ab, die Krystall-Chloroform enthalten. Sie werden abgenutzt, mit Chloroform gewaschen und

¹⁾ Helv. 17, 1519 (1934).

erscheinen dann schwach gelblich mit starkem Glanz. Zur weiteren Reinigung haben wir die Substanz auch noch aus anderen Lösungsmitteln, wie Äthanol, Methanol oder Gemischen von Chloroform und Äthylalkohol oder Pyridin und Alkohol umkrystallisiert. Wie früher erwähnt¹⁾, krystallisiert sie häufig mit Lösungsmitteln, so z. B. aus Methylalkohol mit 1 Mol Krystall-Methanol.

Lumichrom ist durch seine Schwerlöslichkeit in den meisten organischen Solventien ausgezeichnet. In reinem Zustande ist es selbst in kochendem Wasser fast unlöslich; aber auch aus sehr unreinen Gemischen lässt es sich leicht abtrennen, nachdem es einmal in festem Zustande abgeschieden war, da es sich in Wasser kaum wieder in Lösung bringen lässt. Es löst sich leicht in verdünnten Alkalien und wird aus diesen Lösungen durch Essigsäure wieder abgeschieden.

Lumichrom verhält sich in bezug auf Löslichkeit also sehr verschieden vom Lumiflavin und die Trennung der beiden Verbindungen ist eine sehr leicht auszuführende Operation. Es ist daher nicht verständlich, dass von anderer Seite²⁾ monatelang offenbar mit Lumiflavinpräparaten gearbeitet worden ist, die erhebliche Mengen Lumichrom enthielten, und dass die Anwesenheit der letzteren Verbindung übersehen worden ist.

Dass Lumichrom auch unter den Bedingungen der alkalischen Photolyse neben Lumiflavin immer aus Lactoflavin gebildet wird, haben wir schon früher mitgeteilt. Analysenreine Lactoflavinpräparate, in alkalischer Lösung belichtet, zeigen die Lumichrombildung gewöhnlich schon beim Ansäuern der Lösung an, da sich die Hauptmenge des gebildeten Lumichroms sofort in fester Form abscheidet und beim Ausschütteln der Lösung mit Chloroform Veranlassung zu Emulsionsbildung sein kann. Das bei solchen alkalischen Photolysen gebildete Lumichrom wird am besten nach Ansäuern der Lösung und einigem Stehen der Flüssigkeit abgenutscht; der Rest lässt sich nach dem Eindampfen des Chloroformextraktes und Digerieren des Trockenrückstands mit Chloroform als in Chloroform schwerlöslicher Rückstand gewinnen; Lumiflavin wird dabei von Chloroform wieder leicht aufgenommen.

Selbstverständlich sind alle unsere Versuche stets mit mehrfach umkrystallisiertem, analysenreinem Lactoflavin ausgeführt worden, so dass die beobachtete Menge Lumichrom wirklich aus dem Lactoflavin stammt. Die Vermutung³⁾, dass ein Teil der gefundenen Menge direkt aus der Molke kommen könnte, ist daher unrichtig⁴⁾.

¹⁾ Helv. 17, 1010, 1518 (1934).

²⁾ R. Kuhn und Mitarbeiter, B. 68, 170 (1934).

³⁾ R. Kuhn, Rudy und Reinemund, B. 68, 172 (1934).

⁴⁾ Auf die Polemik R. Kuhn's gegen den einen von uns (B. 68, 172 (1934)) zurückzukommen, verbietet uns die unsachliche Art, in der sie geführt wurde.

Experimentelles.

Darstellung des 9-[3'-Oxypropyl]-iso-alloxazins.

1-Aminopropanol-3.

Nach *Gabriel* und *Weiner*¹⁾ wurde durch Kondensation von Trimethylenbromid und Phtalimidkalium das γ -Brompropyl-phtalimid dargestellt und dieses mit Schwefelsäure im Autoklaven bei 200° gespalten. Aus 133 g Trimethylenbromid und 51 g Phtalimidkalium erhielt man 50 g Propyl-phtalimid, daraus 4,5 g (32% der Theorie) 1-Aminopropanol. Sdp. _{16 mm} 82°.

N-[3-Oxy-propyl]-o-nitranilin.

4,5 g 1-Amino-propanol-3 wurden mit 18 g o-Nitrochlorbenzol in 30 cm³ Pyridin gelöst und die Mischung während 5 Stunden im Ölbad bei schwachem Sieden gehalten. Dann haben wir das Pyridin und das unverbrauchte o-Nitrochlorbenzol durch Destillation mit Wasserdampf entfernt. Die stark gelb gefärbte Lösung wurde mit Äther extrahiert, der Äther abgedampft, worauf ein Öl zurückblieb, das nach einiger Zeit zu krystallisieren anfang. Die Krystalle löste man in Essigester und fügte Petroläther hinzu, worauf nach kurzer Zeit das N-[3-Oxy-propyl]-o-nitranilin auskrystallisierte. Nach zweimaliger Krystallisation wurden 2,5 g in Form orangeroter Krystalle vom Smp. 65° erhalten.

4,068 mg Subst. gaben 8,255 mg CO₂ und 2,225 mg H₂O
 3,845 mg Subst. gaben 0,476 cm³ N₂ (16°, 732 mm)
 C₉H₁₂O₃N₂ Ber. C 55,08 H 6,16 N 14,28%
 Gef. „ 55,34 „ 6,07 „ 14,06%

9-[3'-Oxy-propyl]-iso-alloxazin.

2,5 g N-[3-Oxy-propyl]-o-nitranilin, in reinem Alkohol gelöst, wurden mit Platin und Wasserstoff reduziert (Aufnahme 0,91 L H₂). Nach dem Ansäuern mit der berechneten Menge verdünnter Salzsäure haben wir die Lösung vom Katalysator abfiltriert, in eine heisse wässrige Lösung von 2,73 g Alloxan-tetrahydrat gegossen und die Menge einige Minuten zum Sieden erhitzt. Nach dem Erkalten nutschte man den entstandenen Niederschlag ab und wusch ihn mit Aceton und Petroläther. Aus der Mutterlauge liess sich nach dem Abdestillieren des Alkohols eine weitere Menge Substanz gewinnen. Das Rohprodukt wurde unter Zusatz von wenig Tierkohle aus kochendem Wasser umkrystallisiert und dabei in braungelben Nadeln erhalten, die sich bei 297° unter Dunkelfärbung zersetzen. Ausbeute 1,2 g.

4,020 mg Subst. gaben 8,390 mg CO₂ und 1,565 mg H₂O
 C₁₃H₁₂O₃N₄ Ber. C 57,33 H 4,44%
 Gef. „ 56,93 „ 4,35%

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

¹⁾ B. 21, 2672 (1888).