

Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft

72. Jahrg. Nr. 5. — Abteilung B (Abhandlungen), S. 933–1126 — 10. Mai

158. Hermann Rudy und Otto Majer: 9-Phenyl- und 9-Cyclohexyl-8-aza-flavin.

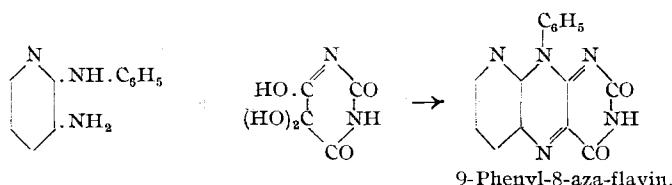
[Aus d. Chem. Laborat. d. Universität Erlangen.]

(Eingegangen am 29. März 1939.)

In Fortführung der vor einiger Zeit begonnenen Untersuchungsreihe über Azaflavine¹⁾ berichten wir nunmehr über zwei weitere Vertreter, nämlich das 9-Phenyl- und das 9-Cyclohexyl-8-aza-flavin. Beide wurden nach dem von R. Kuhn und Mitarbeitern bei den Flavinen der Benzolreihe angewandten Verfahren durch Kondensation von Alloxan mit dem entsprechenden 2,3-Diamino-pyridin dargestellt. Das dazu benötigte 2-Anilino-3-amino-pyridin war bereits von O. v. Schick h, A. Binz und A. Schulz²⁾ dargestellt worden. Das 2-Cyclohexylamino-3-amino-pyridin läßt sich, wie wir gefunden haben, nach dem gleichen Verfahren bequem und mit guter Ausbeute darstellen, indem man 2-Chlor-3-amino-pyridin mit Cyclohexylamin umsetzt.

9-Phenyl-8-aza-flavin.

Ähnlich dem 9-Phenyl-flavin³⁾ entsteht auch das 9-Phenyl-8-aza-flavin mit guter Ausbeute nur auf Zusatz von Borsäure, während Zinkchlorid als Kondensationsmittel keinen Einfluß hat. Die Reaktion verläuft folgendermaßen:



9-Phenyl-8-aza-flavin ist sehr unbeständig. Beim Erhitzen in essigsaurer Lösung unter Lichtausschluß wird es innerhalb kurzer Zeit zerstört und verträgt auch trocknes Erhitzen auf 100° nicht. Es nimmt bezüglich der Beständigkeit also eine Sonderstellung ein, da die

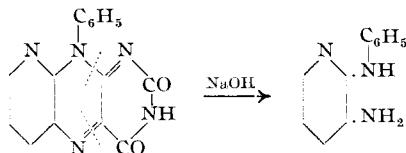
¹⁾ H. Rudy u. O. Majer, B. 71, 1243 [1938].

²⁾ B. 69, 2593 [1936].

³⁾ R. Kuhn u. F. Weygand, B. 68, 1282 [1935].

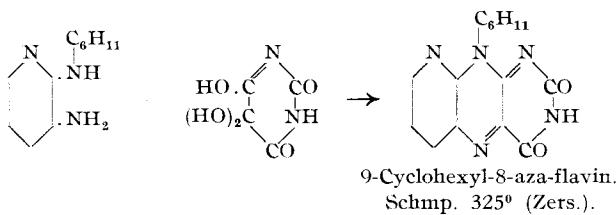
Flavine, einschließlich der bis jetzt bekannten Azaflavine, unter diesen Bedingungen nicht merklich angegriffen werden.

Auch gegen Lauge ist es empfindlicher als die übrigen Flavine und geht leicht in 2-Anilino-3-amino-pyridin über:



9-Cyclohexyl-8-aza-flavin.

2-Cyclohexylamino-3-amino-pyridin zeichnet sich durch die besondere Leichtigkeit aus, mit der es in Cyclohexyl-azaflavin übergeht; denn es kondensiert bereits in siedendem Eisessig ohne Kondensationsmittel zu mehr als 70%, so daß auch Zusatz von Borsäure keine wesentliche Verbesserung mehr bedeutet. Es erinnert in dieser Beziehung an das N-Methyl-o-phenylen-diamin, das in salzsaurer Lösung ebenfalls sehr leicht und mit fast theoretischer Ausbeute zum 9-Methyl-flavin kondensiert.



Das Cyclohexyl-azaflavin krystallisiert in schönen orangefarbenen Nadeln, die sich zwischen 320° und 325° unter Aufschäumen zersetzen und in Wasser oder verd. Essigsäure mit gelber Farbe und grüner Fluorescenz lösen. Gegen Mineralsäuren und Oxydationsmittel ist es weitgehend beständig, durch Lauge wird es abgebaut. Es ist dem 9-Propyl-8-aza-flavin sehr ähnlich.

Lichtabbau: Es wurde schon früher erwähnt, daß Lösungen des 9-Propyl-8-aza-flavins im diffusen Tageslicht unter Bildung eines blau fluoreszierenden Körpers zersetzt werden. Beim Cyclohexyl-azaflavin hat sich nunmehr ergeben, daß die Reaktion ziemlich kompliziert verläuft. Im sichtbaren Licht findet unter Luftausschluß zwar Zersetzung statt, man kann aber keinen blau fluoreszierenden Körper beobachten. Dieser entsteht vielmehr erst beim Belichten unter Luftzutritt. Es liegt demnach eine Folgereaktion aus Photolyse und Oxydation vor. Beim Bestrahlen durch unfiltriertes Licht des Quecksilberlichtbogens im Quarzgefäß tritt auch unter Luftausschluß eine blaugrün fluoreszierende Verbindung auf; hier scheint eines der Spaltprodukte als Oxydationsmittel zu wirken.

Die chromatographische Aufarbeitung der mit einer 200-Watt-Lampe unter Luftzutritt erhaltenen Reaktionsprodukte ergab, daß neben unverändertem Flavin etwa 5 Photolysenprodukte vorliegen, die wir durch ihre Haftfestigkeit am Adsorbens und ihre Fluorescenz gekennzeichnet haben.

Näher untersucht wurde die am schwächsten adsorbierte Verbindung. Sie fällt besonders durch die in neutraler oder essigsaurer Lösung am Tageslicht sichtbare, blaugrüne Fluoreszenz auf, die vor der Quarzlampe auf Zugabe von Natronlauge in ein leuchtendes Gelb umschlägt. Auch das Adsorbat in der Säule fluoresciert vor der Quarzlampe leuchtend gelb. Die Verbindung besitzt einen recht hohen Schmelzpunkt (350—355°) und hat etwa die Zusammensetzung ($C_9H_7O_2N_3$)_n. Daraus ersieht man, daß die durch das Licht eingeleitete Reaktion ziemlich tiefgreifend ist.

Über die Struktur der Verbindung können wir infolge der geringen Ausbeute noch nichts aussagen, zumal die Reaktionsmöglichkeiten im Azaflavin-Molekül ziemlich zahlreich sind. Wenn auch das Pyridin selbst nur von ultraviolettem Licht zerstört wird (H. Freytag⁴), so ist im Azaflavin infolge Sensibilisierung selbstverständlich auch eine Photolyse des Pyridinkerns durch sichtbares Licht möglich.

Fr. cand. chem. E. Deimler, Chem. Laborat. d. Universität Erlangen, danken wir vielmals für die Ausführung der Mikro-C,H-Bestimmungen.

Beschreibung der Versuche.

9-Phenyl-8-aza-flavin.

Das benötigte 2-Anilino-3-amino-pyridin wurde nach O. v. Schickh (a. a. O.) gewonnen. Zur Ergänzung der Vorschrift sei erwähnt, daß es durch Destillation bei 1 mm und Umkristallisieren aus Benzol vollkommen farblos erhalten wird (Schmp. 143°)⁵.

In eine heiße Lösung von 10 g Borsäure in Eisessig gibt man zuerst 20 g Alloxan, dann eine heiße Lösung von 5 g 2-Anilino-3-amino-pyridin in wenig Eisessig und erhitzt eine Min. zum Sieden. Nach kurzem Stehenlassen scheiden sich gelbe Krystalle ab. Umkristallisieren aus Eisessig unter Zusatz von Wasser ergibt rhombische Blättchen in einer Ausbeute von 5.23 g (66.5% d. Th.).

Zur Analyse wird mehrmals vorsichtig aus Eisessig- und Ameisensäure-Wasser umkristallisiert und 2—3 Stdn. bei 80°/1 mm getrocknet. Zers.-Pkt. 335—340° (völlige Schwärzung; Vorheizen auf 310°)⁵.

4.436 mg Sbst.: 9.751 mg CO₂, 1.395 mg H₂O. — 1.625 mg Sbst.: 0.344 ccm N (19°, 729 mm).

$C_{15}H_9O_2N_5$ (291.28). Ber. C 61.85, H 3.12, N 24.05.

$C_{15}H_{11}O_3N_5$ (309.30) Ber. „ 58.24, „ 3.56, „ 22.65.

Gef. „ 60.63, „ 3.60, „ 23.74.

Zinkchlorid, das bei der Darstellung des Propyl-flavins¹) zusätzlich verwendet wurde, ist hier nicht nötig. Doch muß bei der Kondensation unter Wasserausschluß gearbeitet werden, da sonst keine glatte Flavinbildung stattfindet. Das Flavin bildet sich auch in mineralsaurer und essigsaurer Lösung ohne Borsäure, aber in schlechterer Ausbeute.

9-Phenyl-8-aza-flavin ist in Wasser, Alkohol, Methanol schwer, in Pyridin, Eisessig, Ameisensäure mäßig gut löslich. Es fluoresciert in essigsaurer oder neutraler Lösung am Tageslicht sowie vor der Quarzlampe nur schwach, in fester Form zeigt es vor der Quarzlampe orangegelbe Fluoreszenz.

⁴⁾ B. 69, 32 [1936] u. früher.

⁵⁾ Abgekürztes Thermometer, Kupferblock.

Beständigkeit: Beim Erhitzen der Krystalle über 100° beginnt bereits Zersetzung unter Rotfärbung. Das rote Produkt ist in Eisessig schwerer löslich als das Ausgangsmaterial. Kocht man eine Eisessiglösung des Flavins im Dunkeln unter Rückfluß, so tritt bereits nach 30 Min. deutlich Dunkelfärbung ein, die im Verlauf von 2 Stdn. in Rot umschlägt, ein Vorgang, der beim Propyl-azaflavin auch nach mehrstündigem Kochen nicht eintritt. Wegen dieser Unbeständigkeit konnte kein völlig reines Produkt erhalten werden. Aus dem gleichen Grund ist auch die Extinktion im Stufenphotometer kein Anhaltspunkt für den Reinheitsgrad, da sie mit zunehmender Zersetzung des Flavins steigt.

Konz. Salzsäure und Salpetersäure lösen gelb, konz. Schwefelsäure löst rotbraun. Kurzes Kochen in salzsaurer Lösung zerstört das Flavin kaum. Auch gegen Bromwasser, Wasserstoffperoxyd, nascierendes Chlor ($\text{HCl} + \text{H}_2\text{O}_2$) zeigt sich das Flavin bei kurzer Einwirkungsdauer ziemlich beständig. Gegen Lauge ist es weitaus empfindlicher als das Propylflavin und wird bereits durch gelindes Erwärmen in $\frac{1}{2}\text{-}n$. Natronlauge zerstört.

Spaltung durch Alkali: 2-Anilino-3-amino-pyridin. 200 mg Flavin werden in 10 ccm 15-proz. Natronlauge solange erhitzt, bis alles gelöst und in der braunen Lösung eine weiße Fällung entstanden ist, was einige Minuten in Anspruch nimmt. Nach dem Abkühlen wird das gebildete Amin abfiltriert. Ausb. 80 mg (63% d. Th.). Umkristallisieren aus Benzol: farblose Krystalle. Schmp. 142—143°. Mischschmp. mit synthetischem 2-Anilino-3-amino-pyridin 142—143°.

Eine Zwischenstufe zu fassen gelang auch unter gelinderen Abbaubedingungen nicht.

2-Cyclohexylamino-3-amino-pyridin.

3 g 2-Chlor-3-amino-pyridin werden mit 9 g Amino-cyclohexan (Schuchardt, puriss.) im Bombenrohr 20 Stdn. auf 200—210° erhitzt. Den gelbbraunen Krystallbrei schüttelt man mit 15-proz. Natronlauge durch und äthert die Base aus. Nach Abdampfen des Äthers wird im Vak. destilliert. Als Vorlauf erhält man das überschüssige Amino-cyclohexan. Das Reaktionsprodukt geht bei 190—204°/20 mm über. Ausb. 3 g (67% d. Th.). Durch Umkristallisieren aus Ligroin wird die Base in farblosen, mikroskopischen Stäbchen erhalten. Schmp. 119°.

Zur Analyse wurde die destillierte und einmal umkristallisierte Substanz nochmals destilliert (Sdp.₁₂ 190°).

4.559 mg Sbst.: 11.472 mg CO_2 , 3.532 mg H_2O . — 2.822 mg Sbst.: 0.564 ccm N (22°, 724 mm).

$\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{N}_3$ (191.27). Ber. C 69.07, H 8.96, N 22.06.
Gef. „ 68.63, „ 8.67, „ 22.03.

Die Base ist in reinem Zustand sehr beständig.

Vor der Quarzlampe zeigt die essigsäure Lösung blaue Fluorescenz, die bei Zugabe von Mineralsäure bestehen bleibt oder, falls sehr verdünnte Essigsäurelösung vorliegt, verstärkt wird. Bei Zugabe von Alkali verschwindet die Fluorescenz. (Das gleiche Verhalten zeigt das 2-Anilino-3-amino-pyridin.) Es fluoresciert demnach nur das Kation. Pikrat: 300 mg 2-Cyclohexylamino-3-amino-pyridin werden in Äther gelöst und mit

einem Überschuß von absolutem alkoholischem Pikrinsäurelösung vereinigt. Nach weiterer Ätherzugabe scheiden sich grobe orangefarbene Krystalle ab. Ausb. 550 mg. Die Reinigung des Pikrats erfolgt durch Umkristallisieren aus absolutem Alkohol. Schmp. 210° (unter Schwärzung).

4.851 mg Sbst.: 0.825 ccm N (24°, 745 mm).

$C_{17}H_{20}O_7N_6$ (420.38). Ber. N 20.00.

$C_{23}H_{23}O_1N_9$ (649.49). „, 19.41. Gef. N 19.16.

Nach dem gefundenen N-Wert liegt anscheinend eine Verbindung von 1 Mol. Base und 2 Mol. Pikrinsäure vor.

9-Cyclohexyl-8-aza-flavin.

Zu einer siedenden Lösung von 2 g Alloxan in etwa 150 ccm Eisessig gibt man 500 mg 2-Cyclohexylamino-3-amino-pyridin und kocht das Reaktionsgemisch weitere 3 Min. auf. Hierauf fällt man das Kondensationsprodukt durch Zusatz von Wasser aus (kleine, gelbe Nadeln). Ausb. 540 mg (70% d. Th.).

Zur Analyse wird 5-mal aus Eisessig-Wasser umkristallisiert. Dabei fraktioniert man durch entsprechende Wasserzugabe und verwendet jeweils die mittlere Fraktion (diese zeigt den höchsten Extinktionswert). Das Flavin wird 2 Stdn. bei 100°/1 mm getrocknet. Kleine, gelbe, vielfach gebüschtelte Nadeln. Zers.-Pkt. 320—325° unter völliger Schwärzung (Vorwärmung auf 310° und rasches Erhitzen).

4.180 mg Sbst.: 9.257 mg CO_2 , 2.000 mg H_2O . — 4.360 mg Sbst.: 9.640 mg CO_2 , 1.950 mg H_2O . — 2.481 mg Sbst.: 0.527 ccm N (25°, 738 mm).

$C_{15}H_{15}O_2N_5$ (297.31). Ber. C 60.59, H 5.09, N 23.56.
Gef. „, 60.40, 60.30, „, 5.35, 4.91, „, 23.63.

Borsäurezusatz verbessert die Ausbeute etwas. Anwesenheit von Wasser ist ungünstig.

Zur Bestimmung der Extinktion wurden 2 mg Cyclohexyl-azaflavin in 3 ccm Eisessig gelöst und mit Wasser auf 25 ccm aufgefüllt. Die Messung muß rasch geschehen, weil das Flavin nach längerem Stehenlassen wieder auskristallisiert. Gemessen wurde mit Filter S43 in der 1-mm-Küvette. Bei einer Konzentration von 100 γ/ccm und einer Schichtdicke von 1 cm ist $\epsilon = 4.4$. Aus dem früher bestimmten Extinktionswert des 9-Propyl-8-aza-flavins ($\epsilon = 5.4$) berechnet sich für 9-Cyclohexyl-8-aza-flavin der Wert $\epsilon = 4.6$, sodaß also die molaren Extinktionskoeffizienten der beiden Flavine ziemlich übereinstimmen.

Die Fluorescenz der essigsauren oder neutralen Lösung ist am Tageslicht und vor der Quarzlampe grün, jedoch bei weitem nicht so stark wie beim Propylflavin. Auf Zusatz von Alkali oder Mineralsäure wird sie gelöscht. Die feste Substanz fluoresciert vor der Quarzlampe hellgelb.

Gute Lösungsmittel für das 9-Cyclohexyl-8-aza-flavin sind Ameisensäure, Essigsäure, Pyridin und Mineralsäuren. In Wasser ist das Flavin sehr schwer, in Alkohol und Methanol ist es etwas besser löslich. In 15-proz. Natronlauge löst es sich infolge der Schwerlöslichkeit des Natriumsalzes auch in der Wärme kaum auf. Mit zunehmender Verdünnung der Lauge nimmt die Flavinlöslichkeit jedoch zu.

Die charakteristische reversible Reduktion der Flavine durch Natriumhydrosulfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) findet sich auch beim 9-Cyclohexyl-8-aza-flavin und ist besonders vor der Quarzlampe gut zu beobachten.

Konz. Mineralsäuren lösen mit hellgelber Farbe und zerstören kaum. Bromwasser, Wasserstoffperoxyd, nascierendes Chlor greifen auch in der Siedehitze nicht an. Kocht man eine Eisessiglösung des Flavins einige Std. im Dunkeln, so ist kaum eine Verfärbung festzustellen. Gegen Licht ist das Cyclohexyl-azaflavin jedoch ebenso wie die anderen Azaflavine empfindlich: Setzt man eine Flavinlösung dem Tageslicht aus, so geht bereits nach einigen Std. die grüne Fluorescenz in Blaugrün über. Kochen mit Lauge zerstört das Flavin.

Abbau beim Belichten: Die Belichtung einer Eisessiglösung des Flavins mit sichtbarem Licht führt bei Luftzutritt nach einigen Std. unter Dunkelfärbung der Lösung zu einem blau fluoreszierenden Reaktionsprodukt. Belichtet man jedoch unter Sauerstoffausschluß in Stickstoffatmosphäre, so dunkelt zwar die Lösung, aber die Blaufluorescenz tritt auch nach mehreren Std. nicht auf; bestrahlt man diese Lösung bei Luftzutritt weiter, so beobachtet man indes auch hier die Blaufluorescenz. Dieser auffällige Einfluß des Luftsauerstoffs zeigt sich bei Bestrahlung mit unfiltriertem Licht der Quarzlampe nicht; hier ist in jedem Fall blaue Fluorescenz zu beobachten.

Die präparative Aufarbeitung gestaltet sich folgendermaßen: Eine Lösung von 600 mg Cyclohexyl-azaflavin in 200 ccm Eisessig wird in einer Porzellanschale unter Wasserkühlung 10 Std. mit einer 200-Watt-Lampe aus etwa 6 cm Entfernung bestrahlt. Die dunkle Reaktionslösung wird im Vak. zur Trockne eingeengt, der schwarze essigsäurefreie Rückstand in absol. Alkohol aufgenommen und an Aluminiumoxyd (standardisiert nach Brockmann) chromatographiert. Entwickelt wird mit 96-proz. Alkohol. Das Chromatogramm zeigt folgende Schichten: Am stärksten haftet oben eine schmale dunkelbraune Schicht, die auch nach längerem Entwickeln nicht wesentlich wandert. Unmittelbar darunter tritt eine olivgrüne, etwas schwächer haftende Schicht auf. Den weitaus größten Raum erfüllt eine gut nach unten wandernde gelbe Schicht, die jedoch nicht einheitlich ist, sondern zu unterst aus einem schmalen, vor der Quarzlampe grellgelb fluoreszierenden, zu oberst aus einem viel breiteren Teil besteht, der vor der Quarzlampe nur schwach dunkelgelb fluoresciert. Diese beiden am Tageslicht gelben Schichten sind nicht genügend getrennt und weiterhin noch durch Begleitsubstanzen verunreinigt. Sie werden daher nach Elution mit Alkohol nochmals chromatographiert. Dabei bleiben die Begleitkörper im oberen Teil der Säule als gelber und, unmittelbar darunterliegend, als farbloser, vor der Quarzlampe aber starkblau fluoreszierender Ring haften, während die Hauptmenge als gelbe breite Schicht nach unten wandert. Diese wird nun weiter mit Alkohol entwickelt, wobei die schwächer adsorbierte, vor der Quarzlampe stark gelb fluoreszierende Schicht von der beträchtlich breiteren und fester haftenden getrennt wird.

Auf diese Weise wurden also mehrere definierte Schichten erhalten, die sich durch ihre Farbe und Fluorescenz kennzeichnen ließen. Zur Kennzeichnung wurde jeweils eine Probe mit Wasser ausgekocht und vom Adsorbens abfiltriert. Die folgende Tafel gibt eine kurze Übersicht, wobei die einzelnen Schichten in der gleichen Reihenfolge von oben nach unten eingesetzt sind, wie sie an der Säule auftreten.

Bezeichnung	Schicht		Lösung			
	Farbe am Tages- licht	Fluoresc. v. d. Quarzl.	Farbe am Tages- licht	Fluoresc. v. d. neutr.	Quarzlampe alkal.	mineral- sauer
1. Chromato-gramm	a	dunkelbraun	keine	dunkelbraun	blau	gelb
	b	olivgrün	keine	olivgrün	blaugrün	gelb
Die unter der Schicht b liegende Zone ergab nach Elution beim 2. Chromatogramm:						2. Chromatogramm:
2. Chromato-gramm	a	gelb	gelb	gelb	blau	keine
	b	farblos	blau	farblos	blau	keine
	c	gelb	schwach gelb	gelb	grün	keine
	d	gelb	leuchtend gelb	schwach gelb	blaugrün	tiefgelb

Präparativ aufgearbeitet wurden nur die Schichten 2c und 2d. Die alkoholischen Lösungen wurden bis zur Trübung eingeengt und die beim Stehenlassen im Fässchrank auftretenden Fällungen aus 15-proz. Essigsäure umkristallisiert.

Schicht 2c: Durch 1-maliges Umkristallisieren aus Essigsäure wurden ockergelbe bis olivgrüne mikroskopische Warzen erhalten. Ausb. etwa 15 mg. Schmp. 325—330° unt. Zers. (Vorheizen auf 310°).

Die chemischen und physikalischen Eigenschaften sprechen ebenso wie das chromatographische Verhalten für unverändertes Flavin. Die Elementaranalyse zeigt, daß tatsächlich verunreinigtes 9-Cyclohexyl-8-aza-flavin vorliegt (getrocknet bei 100°/1 mm):

4.514 mg Sbst.: 9.717 mg CO₂, 1.952 mg H₂O. — 1.396 mg Sbst.: 0.290 ccm N (25°, 739 mm).

C₁₅H₁₅O₂N₅ (297.31). Ber. C 60.59, H 5.09, N 23.56. Gef. C 58.68, H 4.84, N 23.14.

Schicht 2d: Aus Essigsäure wurden gelbe mikroskopische Warzen vom Schmp. 350—355° (Zers.; Vorheizen bis 300°) erhalten. Ausb. etwa 10 mg.

Zur Analyse wurde 2 Stdn. bei 100°/1 mm getrocknet.

4.084 mg Sbst.: 8.490 mg CO₂, 1.475 mg H₂O. — 1.530 mg Sbst.: 0.304 ccm N (22°, 741 mm).

C₉H₇O₂N₃ (189.14). Ber. C 57.13, H 3.73, N 22.22. Gef. C 56.70, H 4.04, N 22.42.

Die Substanz ist in Wasser und Natriumbicarbonatlösung kaum, in Alkohol und Essigsäure etwas besser löslich. Die Lösungen sind hellgelb und fluorescieren blaugrün (die pH-Abhängigkeit der Fluorescenz ist aus der obigen Tafel ersichtlich). Die Krystalle fluorescieren vor der Quarzlampe intensiv orangefarben, im Gegensatz zum gelbfluorescierenden Flavin. Natriumhydrosulfitlösung (Na₂S₂O₄) reduziert unter Entfärbung und Fluorescenzlöschung. Beim Schütteln mit Luft kehren Farbe und Fluorescenz wie beim Flavin wieder. Die Reduktion ist also reversibel.