

36. Isolde Hausser, Dietrich Jerchel und Richard Kuhn: Ein blau fluoreszierendes Bestrahlungsprodukt von Triphenyl-tetrazoliumchlorid.

[Aus dem Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizinische Forschung Heidelberg, Institut für Physikalische Therapie und Institut für Chemie*].

(Eingegangen am 10. Dezember 1948.)

2,3,5-Triphenyl-tetrazoliumchlorid (TTC) wandelt sich bei der Bestrahlung mit UV-Licht in alkoholischer Lösung nahezu quantitativ in das blau fluoreszierende, schön krystallisierende 2,3-Diphenyl-5-phenyl-tetrazoliumchlorid um.

Die Lichtempfindlichkeit von 2,3,5-Triphenyl-tetrazoliumchlorid(I) ist bereits H. v. Pechmann und P. Runge¹⁾ aufgefallen. Seit diese Substanz auf Grund der Arbeiten von R. Kuhn und D. Jerchel^{2,3,4)} sowie von G. Lakon^{5,6)} als Reduktionsindicator, vor allem für die Bestimmung der Keimfähigkeit von Pflanzensamen im Handel erhältlich ist, ist die Rotfärbung von Triphenyl-tetrazoliumchlorid-Lösungen im Licht jedem, der mit der Substanz arbeitet, bekannt. In seiner Vorschrift zur Durchführung des topographischen Verfahrens bei Mais schreibt G. Lakon: „Die Tetrazoliumsalze sind lichtempfindlich, besonders bei höheren Temperaturen. Vorratslösungen bleiben bei Zimmertemperatur im Dunkeln einige Wochen lang unverändert“. Für die Durchführung der Keimversuche wird vorgeschrieben, die mit 1-proz. Lösung beschickten Schalen „bei Zimmertemperatur dunkel zu stellen“.

Da nur Licht, das absorbiert wird, chemisch wirken kann, und Triphenyl-tetrazoliumchlorid (TTC) farblos ist, versteht man, daß ultraviolettes Licht viel stärker wirkt als Tageslicht. Bestrahlt man eine 1-proz. wäßrige, nicht fluoreszierende Lösung von TTC mit UV-Licht, so fällt viel rotes Triphenyl-formazan (II) aus; das Filtrat enthält eine farblose, himmelblau fluoreszierende Verbindung. Läßt man auf eine alkoholische Lösung von TTC UV-Licht einwirken, so tritt Triphenyl-formazan höchstens in Spuren auf; die Lösung bleibt praktisch farblos und es gelingt unter diesen Bedingungen nahezu quantitativ TTC in das blau fluoreszierende, schön krystallisierende Photo-Derivat zu verwandeln. Eine verdünnte (0.01-proz.) wäßrige Lösung verhält sich wie die alkoholische.

Diese interessante, von I. Hausser aufgefundene Lichtreaktion ist Gegenstand eingehender Messungen unter mannigfach abgeänderten Versuchs-

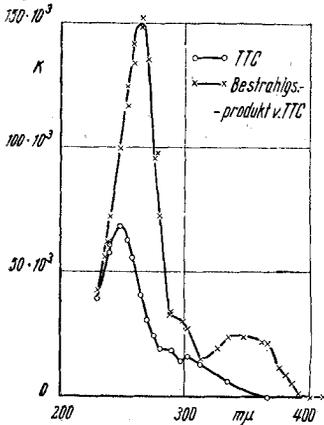
*) Vorgetragen von R. Kuhn im Kolloquium des Instituts am 22. 11. 1948.

1) B. 27, 2920 [1894]. 2) B. 74, 941 [1941]. 3) B. 74, 949 [1941].

4) D. Jerchel u. W. Möhle, B. 77, 591 [1944]; D. Jerchel, FIAT Review, Biochemistry, Bd. I, S. 59 [1947].

5) Ber. Botan. Ges. 60, 299 [1942]. 6) Ber. Botan. Ges. 60, 434 [1942].

bedingungen und unter Einbeziehung weiterer Tetrazoliumsalze gewesen,

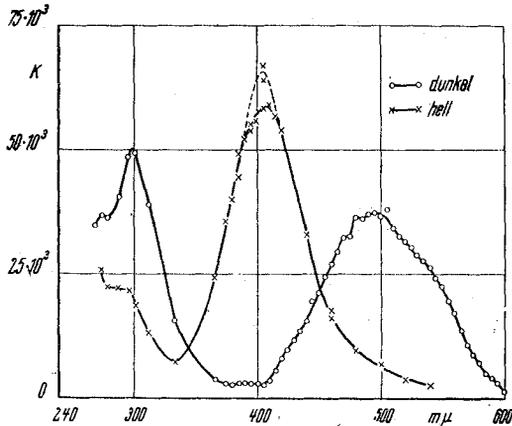


Abbild. 1. 2.3.5-Triphenyl-tetrazoliumchlorid und 2.3-Diphenyl-5-phenyl-tetrazolium-chlorid in Alkohol. Abszissen: Wellenlängen in $m\mu$; Ordinaten: $x = \frac{2.30}{c \times d} \log \frac{I_0}{I}$ (c in Mol/l, d in cm).

wobei für die Reaktionskinetik und für die Bestimmung der Quantenausbeuten der gewaltige Anstieg der Absorptionskoeffizienten im Gebiete von 240 bis 320 $m\mu$ (Abbild. 1) eine ausgezeichnete Meßmöglichkeit bot. Auch Triphenylformazan (II) läßt sich durch Belichten seiner alkoholischen Lösung, die dabei nahezu entfärbt wird, in das blau fluoreszierende Kation verwandeln, das als Pikrat vom Schmp. 331–332° isoliert und durch Misch-Schmelzpunkt mit dem Pikrat des Belichtungsprodukts von TTC identifiziert wurde.

Bei der Bestrahlung von Formazanen erzielt man mit Licht verschiedener Wellenlängen ganz verschiedene Effekte:

1.) Bestrahlt man z. B. Triphenylformazan in Benzol mit sichtbarem Licht (Wellenlängen um 480 $m\mu$), so wird die rote Lösung gelb (Abbild. 2).



Abbild. 2. Triphenylformazan in Benzol. 2.05 mg Subst. in 20 cm Benzol; Schichtdicke der Quarzküvette mit Doppelschliff 1 mm. —○— Absorptions-Spektrum der im Dunkeln bereiteten Lösung (nach 72 stdg. Aufbewahren der Lösung im Dunkeln unverändert).

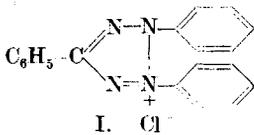
—×— Absorptions-Spektrum derselben Lösung nach etwa 2 stdg. Belichtung mit einer 100-Wattlampe aus 30 cm Entfernung unter Luftkühlung. Zur Bestimmung von 2–3 Meßpunkten wurde die Belichtung jeweils etwa 2 Min. unterbrochen, bis zur Bestimmung der nächsten Meßpunkte wurde erneut 10 Min. belichtet usw. Die Höhe des Maximums bei 400 $m\mu$ hängt von der Schnelligkeit der Messungen ab.

Beim Aufbewahren im Dunkeln tritt das Absorptions-Spektrum der roten Ausgangslösung (unverändert) wieder auf. Dieser reversible Vorgang beruht auf

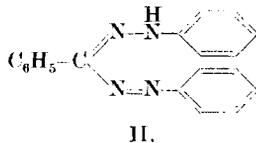
cis-trans-Isomerie. Beim Vorliegen einer Lösung des Triphenyl-formazans in Benzol ist die gelbe Form nur im Licht beständig.

2.) Bestrahlt man Triphenyl-formazan in absol. Alkohol mit ungefiltertem ultravioletem Licht einer Quecksilber-Lampe, so erfolgt zugleich eine Dehydrierung des Formazans II zum Tetrazoliumsalz I bzw. zur Tetrazoliumbase unter Entfärbung der Lösung (a) und eine Dehydrierung des Tetrazoliumsalzes zum blau fluoreszierenden Bestrahlungsprodukt (b).

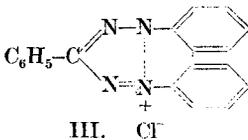
In der vorliegenden Arbeit soll nur die chemische Natur des blau fluoreszierenden Photo-Derivates näher behandelt werden. Es krystallisiert aus Alkohol + Äther in farblosen Nadeln vom Schmp. 360–361°. Seine Bruttoformel $C_{19}H_{13}N_4Cl$ ist um 2 H-Atome ärmer als die des TTC ($C_{19}H_{15}N_4Cl$). Alle Eigenschaften sprechen dafür, daß es sich um das Chlorid einer quartären Ammoniumbase handelt. Für die Konstitution war das Ergebnis der Zinkstaubdestillation von Wichtigkeit. Hierbei lieferte TTC Benzonitril und 1.3 Mol. Anilin, während aus dem Photo-Derivat Benzonitril und Carbazol erhalten wurden. Letzteres entsteht möglicherweise über zunächst gebildetes 2.2'-Diamino-diphenyl (V). Aus der Bildung von Carbazol folgt, daß der Mindergehalt von 2 H-Atomen auf der Ausbildung einer Diphenylbindung zwischen den in 2- und 3-Stellung befindlichen Phenylresten des TTC beruht und dem Photo-Derivat die Konstitutionsformel eines 2.3-Diphenylen-5-phenyl-tetrazoliumchlorids (III) zukommt.



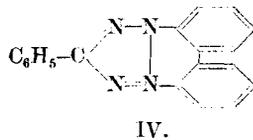
Schmp. 255°, farblos, wasserlöslich, nicht fluoreszierend.



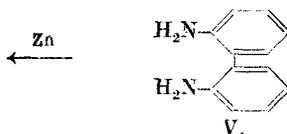
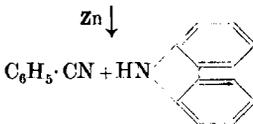
Schmp. 172–174°, rot; wird durch Belichten der Benzollösung gelb (*cis-trans*-Isomerie).



Schmp. 361°, farblos, wasserlöslich, himmelblau fluoreszierend.



olive-farben, Chloroform-Lösung wenig haltbar.



TTC wirkt dehydrierend, wenn es in das Formazan II übergeht; es wirkt hydrierend, wenn sich daraus das Diphenyl-Derivat III bildet. Im Licht

spielen sich Hydrierung und Dehydrierung gleichzeitig ab. Es ist denkbar, daß die von uns aufgefundene photochemische Entstehung einer Diphenylbindung auch für die Biogenese mancher Pflanzenstoffe, die sich vom Diphenyl ableiten, Interesse gewinnen wird.

Bemerkenswert ist das unterschiedliche Verhalten von I und III gegen Reduktionsmittel, insbesondere gegen Natriumdithionit. Während I in soda-alkalischer Lösung durch Natriumdithionit sehr glatt zum roten Triphenylformazan (II) hydriert wird, erhält man aus III einen olive-farbenen Stoff, der sich mit Chloroform der wäßrigen Schicht entziehen läßt. Die Chloroformlösung ist lichtempfindlich und auch im Dunkeln nicht sehr haltbar. Wir rechnen mit der Möglichkeit, daß die olive-farbene Verbindung das entladene Kation des 2.3-Diphenyl-5-phenyl-tetrazoliumsalzes darstellt, d. h. ein freies Radikal (IV) mit unpaarer Zahl von Elektronen ist, das als ein N-haltiges Analogon zum Pentaphenyl-cyclopentadienyl von K. Ziegler aufgefaßt werden könnte. Für die radikalartige Natur des olive-farbenen Reduktionsproduktes spricht, daß wir durch Umsetzung der frisch bereiteten Chloroformlösung mit aus Silberperchlorat und Jod in Äther nach M. Gomberg dargestelltem ClO_4 2.3-Diphenyl-5-phenyl-tetrazoliumperchlorat erhalten haben, das nach Schmelzpunkt (310°) und Mischprobe identisch ist mit einem aus III und Natriumperchlorat hergestellten Vergleichspräparat. Die Bildung dieses quartären Ammoniumsalzes nach der Gleichung $\text{:N} + \text{ClO}_4 \rightarrow \text{:N}^+ + \text{ClO}_4^-$ würde der von E. Weitz⁷⁾ entdeckten Bildung der Aminiumsalze $\text{:N} + \text{ClO}_4 \rightarrow \text{:N}^+ + \text{ClO}_4^-$ formal entsprechen.

Beschreibung der Versuche.

(Dietrich Jerchel).

2.3-Diphenyl-5-phenyl-tetrazoliumchlorid (III).

1.5 g reines Triphenyl-tetrazoliumchlorid (TTC), in 1500 cem absol. Alkohol gelöst, wurden in 20 mm dicken Quarzküvetten 14 Std. mit dem ungefilterten UV-Licht einer S 500 Quecksilber-Hochdrucklampe der Quarzlampengesellschaft Hanau (500 Watt) aus 60 cm Entfernung bestrahlt.

Das Lösungsmittel wurde bis auf 10 cem verdampft. Auf Zusatz von etwa 20 cem trockenem Äther fielen 1.27 g 2.3-Diphenyl-5-phenyl-tetrazoliumchlorid aus. Zur Analyse kristallisierten wir aus Alkohol-Äther um, wobei glitzernde, farblose Nadelchen vom Schmp. $360\text{--}361^\circ$ (Berl-Block) erhalten wurden, die wir bei $138^\circ/0.1$ Torr trockneten.

$\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{Cl}$ (332.8) Ber. C 68.57 H 3.94 N 16.83
Gef. C 68.59, 68.33 H 4.22, 3.97 N 16.45, 16.82.

Das in Wasser schwer lösliche Pikrat kristallisiert aus Pyridin in gelben, haarfeinen Nadeln vom Schmp. $330\text{--}331^\circ$.

$\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{N}_4 \cdot \text{C}_6\text{H}_2\text{N}_3\text{O}_7$ (525.5) Ber. C 57.14 H 2.88 N 18.66
Gef. C 57.37 H 2.88 N 19.05.

Das Perchlorat ist in Wasser schwer löslich und kristallisiert aus Alkohol in weißen Nadeln vom Schmp. 310° .

Destillation mit Zinkstaub (Carbazol).

100 mg 2.3-Diphenyl-5-phenyl-tetrazoliumchlorid wurden mit 1 g Zinkstaub in einer Reibschale innig vermischt und in ein etwa 20 cm langes Glasrohr von 10 mm lichter Weite gefüllt, dessen eines Ende abgeschmolzen war. Durch leichtes Klopfen sorgte man dafür, daß in dem horizontal eingespannten Rohr über dem Zinkstaub ein

⁷⁾ E. Weitz u. H. Schwechten, B. 59, 2307 [1926].

Luftraum von 2–3 mm Höhe entstand. Beim vorsichtigen Erhitzen mit freier Flamme entwich zunächst wenig Wasserdampf, dann folgte ein blaßgelb gefärbter Tropfen (Benzonitril) und bei stärkerem Erhitzen eine sofort krystallisierende Substanz.

Identifizierung des Benzonitrils: n_D^{20} 1.5287; n_D^{20} eines Vergleichspräparates 1.5283. Die Verseifung mit 3 cem 60-proz. Phosphorsäure in der Siedehitze (3 Stdn.) lieferte Benzoesäure, die sich im Kühler abschied und nach Reinigung durch Sublimation bei 121° schmolz (Mischprobe).

Identifizierung des Carbazols: Das Rohkrystalliat aus dem Rohr gab, in wenig Methanol gelöst, mit alkohol. Pikrinsäure-Lösung eine dichte Fällung von orangefarbenen Nadelchen, die aus alkohol. Pikrinsäure-Lösung umkrystallisiert wurden und dann bei 186 bis 189° schmolzen. Schmp. eines Vergleichspräparates von Carbazol-pikrat 188–190°; Mischprobe: 187–189° (Kofler). Beim Umkrystallisieren von Carbazol-pikrat aus Alkohol erhielt man freies Carbazol vom Schmp. 230–231° (Kofler).

In einem quantitativ durchgeführten Mikroversuch, in dem 25 mg 2:3-Diphenyl-5-phenyl-tetrazoliumchlorid mit Zinkstaub destilliert wurden, erhielten wir 5.5 mg (ber. 8.1 mg) Benzonitril = 68% d.Th. und 5.7 mg (ber. 12.4 mg) Carbazol = 46% der Theorie.

Vergleichsversuch mit 2:2'-Diamino-diphenyl(V): Unter den angegebenen Bedingungen lieferte 2:2'-Diamino-diphenyldihydrochlorid, mit der 10fachen Menge Zinkstaub destilliert, in guter Ausbeute Carbazol vom Schmp. 231° (Berl-Block).

Hrn. Hans Fischer danken wir für seine wertvolle Hilfe beim chemisch-präparativen Teil der Arbeit, Frln. A. Dold für die Messung der Absorptions-Spektren.

37. Otto Kruber: Über das 2-Aza-fluoranthren im Steinkohlenteer.

[Aus dem wissenschaftlichen Laboratorium der Gesellschaft für Teerverwertung m. b. H., Duisburg-Meiderich.]

(Eingegangen am 24. November 1948.)

Aus der um 385° siedenden Fraktion des Steinkohlenteers wurde eine Base $C_{15}H_9N$ isoliert und als 2-Aza-fluoranthren identifiziert.

Die Basen der hochsiedenden Fraktionen im Steinkohlenteer sind bis jetzt nur sehr wenig bekannt. Allein das Acridin und das Phenanthridin, beide um 350° siedend, werden als basische Bestandteile des Anthracenöls, dessen Siedegrenzen bis über 360° hinausgehen, erwähnt. Es enthält nach der in der Technik üblichen volumetrischen Bestimmungsart 2–3% Basen. In noch höheren Siedelagen der Teeröle nimmt der Basengehalt zu; er steigt in der bis 390° siedenden Fluoranthren-Pyren-Fraktion auf 4–6% an. Die noch unbekannteren Basen dieser Fraktion stellen nach der Abtrennung von Neutralstoffen und den hier noch spärlich vorkommenden Phenolen ein sehr zähflüssiges Öl dar.

Durch wiederholte Fraktionierung ließen sich aus der um 385° siedenden Fraktion feste Stoffe abscheiden, aus welchen nach mehrfachem Umlösen eine Base in großen glänzenden Krystallen rein erhalten wurde; sie ist das noch unbekannte 2-Aza-fluoranthren (I). Als Abkömmling des Isochinolins zerfällt sie, wie dieses selbst, bei der Oxydation mit Kaliumpermanganat nach zwei Richtungen; neben Fluorenon-carbonsäure-(I) (II) entsteht 4-Aza-fluorenon-carbonsäure-(I) (III). Durch Erhitzen mit Kalk wird aus den Säuren Fluorenon (IV) bzw. das schon lange bekannte und kürzlich¹⁾ wieder aus dem 4-Aza-fluoren gewonnene 4-Aza-fluorenon (V) erhalten.

¹⁾ B. 81, 483 [1948].