

# RICHARD KUHN, HELMUT BAUER und HANS-JOACHIM KNACKMUSS

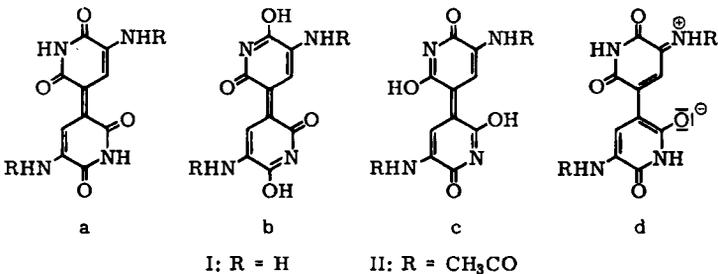
## Struktur und Synthesen des Bakterienfarbstoffs Indigoidin

Aus dem Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung,  
Institut für Chemie, Heidelberg  
(Eingegangen am 25. Januar 1965)

Die Farbigkeit des Indigoidins (I) wird auf den Chromophor des Indigos zurückgeführt. NMR-spektroskopische Untersuchungen an Derivaten erhärten die angegebene symmetrische Struktur. Das durch hydrolytischen Austausch von zwei  $\text{NH}_2$ - gegen zwei OH-Gruppen erhaltene Derivat III läßt sich in den Bakterienfarbstoff zurückverwandeln. Weitere Synthesen des Indigoidins gelangen ausgehend von Citrazinsäure, von 5-Amino-pyridon-(2) sowie von Bipyridyl-(3.3'), wodurch die Verknüpfung von zwei Pyridin-Ringsystemen in 3.3'-Stellung bewiesen wird. Aus 15.5 g Citrazinsäure, die aus Citronensäure und Ammoniak leicht zugänglich ist, sind 8.3 g (66%) synthetisches Indigoidin erhältlich. Für die Gewinnung dieser Farbstoffmenge aus Kulturen von *Pseudomonas indigofera* wäre das Anlegen und Aufarbeiten von ca. 10000 Petri-Schalen erforderlich gewesen.

### FARBERSCHEINUNGEN UND TAUTOMERIEPROBLEME

Der blaue Farbstoff Indigoidin, den verschiedene Bakterien, *P. indigofera*, *C. insidiosum*, *A. atrocyaneus* und *A. polychromogenes*, extracellulär abscheiden<sup>1,2</sup>, hat die Summenformel  $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_4\text{O}_4$  und die Struktur I eines symmetrischen Diaminobipyridyl-(3.3')-Derivates<sup>1,2</sup>. Neben der Formel Ia<sup>1)</sup>, die am wahrscheinlichsten ist, sind auch tautomere Formeln möglich, z. B. die Lactimformen Ib und Ic. Zwitterion-Strukturen (z. B. Id) kommen ebenfalls in Betracht<sup>3)</sup>.



Die Strukturen Ia, Ib und Ic stellen Derivate eines Diazadiphenochinons-(4.4') bzw. -(2.2') dar, deren mittelständige Doppelbindungen das Auftreten von *cis-trans*-

- 1) R. KUHN, H. BAUER, H.-J. KNACKMUSS, D. A. KUHN und M. P. STARR, *Naturwissenschaften* **51**, 409 [1964].
- 2) R. KUHN, M. P. STARR, D. A. KUHN, H. BAUER und H.-J. KNACKMUSS, *Arch. Mikrobiol.*, im Druck.
- 3) vgl. 1.5-Diamino-naphthochinon-(2.6), S. DÄHNE und H. PAUL, *Chem. Ber.* **97**, 1625 [1964], und Aminochinone, S. DÄHNE, J. RANFT und H. PAUL, *Tetrahedron Letters* [London] **45**, 3355 [1964].

## Absorptionsmaxima in verschiedenen Lösungsmitteln

	THF		Methanol		DMSO		DMF		Pyridin	
	$\lambda_{\max}$ (m $\mu$ )	log $\epsilon$	$\lambda_{\max}$ (m $\mu$ )	log $\epsilon$	$\lambda_{\max}$ (m $\mu$ )	log $\epsilon$	$\lambda_{\max}$ (m $\mu$ )	log $\epsilon$	$\lambda_{\max}$ (m $\mu$ )	log $\epsilon$
X	598	**	***		***		***		620	
I	589	**	**		612		602	4.37	602	4.37
II	495	**	**		513		511	4.39	516	4.39
III	478 460	4.33 Schulter	474		488		648 345	4.24 3.70	495	
IV	391 306	4.17 3.97	389		394		598	4.29	607	
V	463 445	4.12 Schulter	462 445	Schulter	467 445	Schulter	467 450	4.39 Schulter	469 450	Schulter
VI	256	4.27	257	4.06						
VII	289	4.21	291	4.22						
VIII	277	4.12	278 241	4.06 3.86			280	3.99		

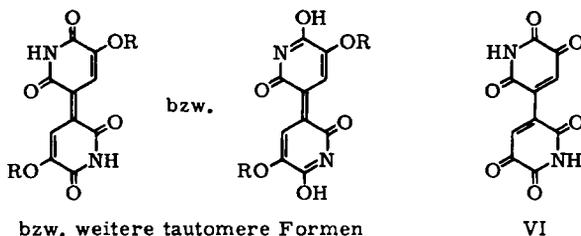
\*) In *N*-Methyl-pyrrolidon-(2) ist für Indigoidin  $\lambda_{\max} = 605$  m $\mu$  (log  $\epsilon$  4.33).

\*\*) Zu wenig löslich.

\*\*\*) Rasche Zersetzung.

Isomeren möglich erscheinen lassen (vgl. dazu S. 2143). Da Aminochinone intensiv farbig sind<sup>4)</sup>, macht Formel I die tiefe Farbe (Tab.) verständlich. Indigoidin löst sich in  $n/20$  KOH mit violetter Farbe ( $\lambda_{\max}$  530  $m\mu$ ), die unter der Einwirkung von Sauerstoff sehr bald ausbleicht.

Durch Hydrolyse des Indigoidins mit 6*n* HCl erhält man unter Austausch der beiden  $NH_2$ - gegen OH-Gruppen \*) den Farbstoff III. Die Farbe der Verbindung ist im durchscheinenden Licht rot (Tab.), im reflektierten grün.



III: R = H

IV: R =  $CH_3CO$

V: R =  $CH_3$

Die stark bathochrome Verschiebung in DMF wird bedingt durch basische Bestandteile des Lösungsmittels (Anionbildung)<sup>5)</sup>. Das Hydrolyseprodukt III ist eine stärkere Säure als Indigoidin; es treibt  $CO_2$  aus Kaliumhydrogencarbonat-Lösung aus. In  $n/20$  KOH zeigt III eine Absorptionsbande bei ca. 635  $m\mu$ . Die tiefblaue Farbe<sup>6)</sup> verschwindet bald wieder, besonders unter der Einwirkung von Sauerstoff, und geht in Gelborange über.

Dem Indigoidin (I) und dessen Hydrolyseprodukt III vergleichbare, tieffarbige carbocyclische Verbindungen sind:

1. 5.5'-Dihydroxy-diphenochinon-(2.2'), dunkelblaugrüne Nadeln<sup>7)</sup>. Da die Stellung der Hydroxyle nicht bewiesen ist, wurde die Substanz auch als Chinhydron des 2.5.2'.5'-Tetrahydroxy-biphenyls mit dem entsprechenden Dichinon ( $C_{12}H_{10}O_4 + C_{12}H_6O_4$ ) aufgefaßt. Sie könnte aber auch als 2-[2.5-Dihydroxy-phenyl]-benzochinon-(1.4), d. h. als inneres Chinhydron, formuliert werden.

2. „Dinaphthylidichinhydron“, das sich in polaren Lösungsmitteln mit gelbrauner, in unpolaren Lösungsmitteln mit violetter Farbe löst<sup>8)</sup>, sowie das grünlich glänzende 3.3'-Dimethoxy-binaphthyl-(1.1')-chinon-(4.4')<sup>8)</sup>.

3. 5.5'-Dimethoxy-3.4.3'.4'-tetramethyl-diphenochinon-(2.2')<sup>9)</sup>, das blauviolette Kristalle bildet, u. a.

\*) Die leichte Hydrolysierbarkeit von Aminochinonen ist eine bekannte Erscheinung, von der u. a. bei der gezielten Synthese von Catena-Verbindungen Gebrauch gemacht wurde. G. SCHILL und A. LÜTTRINGHAUS, *Angew. Chem.* **76**, 567 [1964]; *Angew. Chem. internat. Edit.* **3**, 546 [1964].

4) M. MARTYNOFF und G. TSATSAS, *Bull. Soc. chim. France* **1947**, 52; *C. A.* **41**, 5478 [1947].

5) Konzentrierte Lösungen von III in DMF sind gelbbraun.

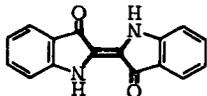
6) Allgemeine Erscheinung bei Anionen von phenolischen Chinonen. A. J. SHAND und R. H. THOMSON, *Tetrahedron* [London] **19**, 1919 [1963].

7) L. BARTH und J. SCHREDER, *Mh. Chem.* **5**, 589 [1884].

8) H. CASSEBAUM und W. LANGENBECK, *Chem. Ber.* **90**, 339 [1957].

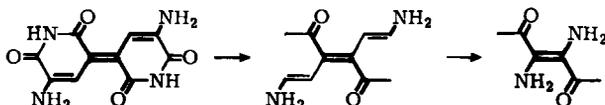
9) D. SCHULTE-FROHLINDE und F. ERHARDT, *Liebigs Ann. Chem.* **671**, 92 [1964].

Die Farbe des Indigoidins ( $\lambda_{\max}$  602 m $\mu$  in Pyridin) ist der des Indigos ( $\lambda_{\max}$  614 m $\mu$  in Pyridin) auffallend ähnlich. Nach M. KLESSINGER und W. LÜTTKE<sup>10)</sup> ist der Chromophor des Indigos die nebenstehende Atomgruppierung.



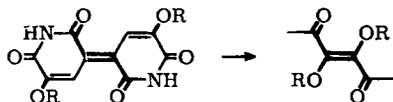
Die beiden Benzolringe tragen zur Farbigkeit nicht wesentlich bei.

Verkürzt man nun das Formelbild Ia des Indigoidins nach dem Vinylogieprinzip und eliminiert aus jedem Ring eine Carbonamidgruppe, so bleibt das farbgebende Prinzip des Indigos übrig:

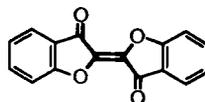


Entfernt man statt dessen die beiden Carbonamidgruppen in 2.3- und 2'.3'-Stellung und verkürzt den Rest nach dem Vinylogieprinzip, so gelangt man ebenfalls zum Indigo-Chromophor.

Analog kann man die Farbigkeit von 4.5.4'.5'-Tetrahydroxy-3.3'-diazadiphenochinon-(2.2') (III) und von 4.4'-Dihydroxy-5.5'-dimethoxy-3.3'-diazadiphenochinon-(2.2') (V) auch vergleichen mit derjenigen von Oxindigo:



III:  $\lambda_{\max}$  478 m $\mu$  (in THF oder in Äthanol)  
V:  $\lambda_{\max}$  463 m $\mu$  (in THF)



Oxindigo:  $\lambda_{\max}$  432 m $\mu$  (in Äthanol)

Wie bei den Indigofarbstoffen ändern sich auch die Farbe und die Carbonylfrequenzen im Infrarot bei der Dehydrierung von III zu VI: III tief bronzegrün, 1670/cm; VI nahezu farblos, 1750/cm.

Die symmetrische Verteilung der aciden Wasserstoffe in Verbindung III wurde auf zwei Wegen bewiesen.

1. Das NMR-Spektrum der Diacetylverbindung IV zeigt in DMSO- $d_6$  (gegen Tetramethylsilan gemessen) nur ein Signal für die beiden Vinyl-Protonen bei  $\tau$  1.22 (2) und nur ein Signal für die Methyl-Protonen der Acetoxygruppen bei  $\tau$  7.68 (6). Bei unsymmetrischer Anordnung der Acetoxygruppen müßten jeweils zwei Signale im Vinyl-Protonen-Bereich und zwei im Bereich der Methyl-Protonen auftreten.

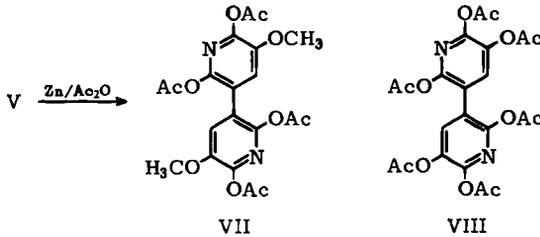
2. Das rote Dimethylderivat V wurde reduktiv acetyliert zur farblosen Tetraacetoxy-Verbindung VII.

Dessen NMR-Spektrum in DMSO- $d_6$  zeigt zwei getrennte Signale der verschiedenen Acetoxygruppen bei  $\tau$  7.90 (6) und  $\tau$  7.66 (6), ein Singulett bei  $\tau$  6.13 (6) von den gleichwertigen Methoxygruppen und ein Singulett bei  $\tau$  2.65 (2) von den Vinyl-Protonen. Aus der symmetrischen Struktur von VII resultiert auch die symmetrische

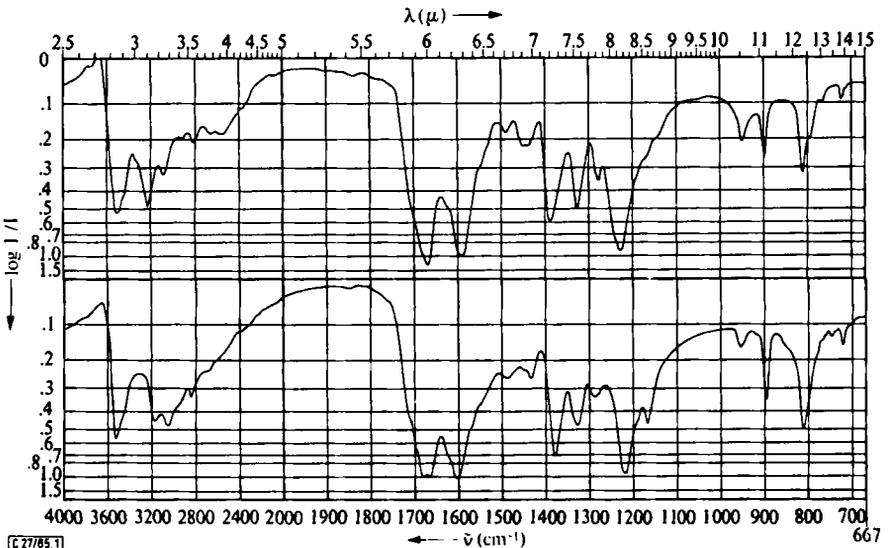
<sup>10)</sup> Tetrahedron [London] 19, Suppl. 2, 315 [1963].

Anordnung der Atome für V. Weil nun V in THF fast die gleiche Absorption zeigt wie III (Tab.), muß in III der gleiche Chromophor für die Farbe verantwortlich sein wie in V. Daraus folgt für das Hydrolyseprodukt von Indigoidin die durch III ausgedrückte Symmetrie.

Daß III nicht als Chinhydron  $C_{10}H_8N_2O_6 + C_{10}H_4N_2O_6$  vorliegt, ergab die Acetylierung zu IV in einer Reinausbeute von 58%. Die Hexaacetylleukoverbindung VIII, die man bei der reduktiven Acetylierung von III erhält, entstand dabei nicht; außerdem ließ sich VI ( $C_{10}H_4N_2O_6$ ) unter den gewählten Bedingungen nicht acetylieren.



Nach Ia, b, c und III sollte Indigoidin sowie dessen Hydrolyseprodukt in einer *cis*- und *trans*-Form auftreten können.



IR-Spektren von 4,5,4',5'-Tetrahydroxy-3,3'-diazadiphenylmethan-(2,2') (III) in KBr aus IV (oben) und aus VIII (unten)

Durch saure Hydrolyse von 4,4'-Dihydroxy-5,5'-diacetoxy-3,3'-diazadiphenylmethan-(2,2') (IV) und durch oxydierende Hydrolyse (unter Zutritt von Sauerstoff) von 2,5,6,2',5',6'-Hexaacetoxybipyridyl-(3,3') (VIII) erhält man zwei Substanzen, deren Analysenwerte übereinstimmen, deren IR-Spektren sich aber in den Extinktionen der Banden unterscheiden (Abbild.). Die UV-Spektren zeigen nur sehr geringe

Unterschiede im Extinktionsverhältnis der Schulter bei 460 m $\mu$  zum Hauptmaximum bei 478 m $\mu$  (in THF). Es ist naheliegend anzunehmen, daß in beiden Substanzen *cis-trans*-Gemische von III vorliegen. Eine chromatographische Auftrennung, die an Polyamid und an Cellulose versucht wurde, gelang bisher nicht.

#### STRUKTURAUFKLÄRUNG DURCH DERIVATE UND ABBAU<sup>2)</sup>

Aufgrund von Analyse und Molgewichtsbestimmung in Wendtschem Lactam hat Indigoidin (I) die Bruttoformel C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>. Das Massenspektrum des Diacetylderivats bestätigte das Molgewicht genau. Durch Hydrolyse mit 6*n* HCl gewann man bronze grüne Kristalle, C<sub>10</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> (III), und 2 Moll. NH<sub>3</sub>. Diazomethan methylierte III zu einem Derivat, dessen Massenspektrum auf C<sub>10</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> stimmte. Außerdem stützte die osmometrische Molgewichtsbestimmung (Mechrolab) des Hexaacetylleukoderivats VIII die Bruttoformel von III.

Die Oxydation von III mit konz. Salpetersäure führt zum nahezu farblosen Dichinon VI, C<sub>10</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> (Molgewichtsbestimmung durch Massenspektrum). Dem dichinoiden Charakter entsprechend nimmt VI 2 Moll. H<sub>2</sub>, das Chinon Indigoidin (I) aber nur 1 Mol. H<sub>2</sub> unter Entfärbung auf. Aus dem NMR-Spektrum von VI folgt bei Annahme eines Bipyridyl-Systems eine symmetrische Verteilung der N- und O-Atome. Neben einem Signal bei  $\tau$  -3.18, das den NH-Protonen zukommt, zeigt das Spektrum von VI in DMSO-d<sub>6</sub> nur noch ein einziges Signal bei  $\tau$  2.83, das von zwei nicht koppelnden Vinyl-Protonen herrührt. Die beiden Vinyl-Protonen müssen daher symmetrisch auf die beiden Ringe verteilt sein. Bei Zugabe von D<sub>2</sub>O zur Lösung von VI verschwindet das Signal der NH-Protonen.

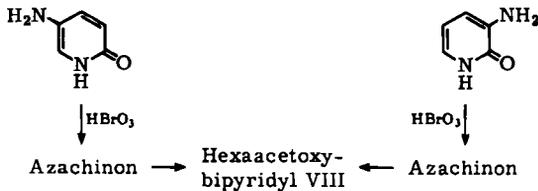
Ein weitergehender Abbau des Indigoidins, z. B. mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Essigsäure, liefert nur kleine Bruchstücke wie Oxalsäure und Oxamid.

#### STRUKTURBEWEISE DURCH SYNTHESEN

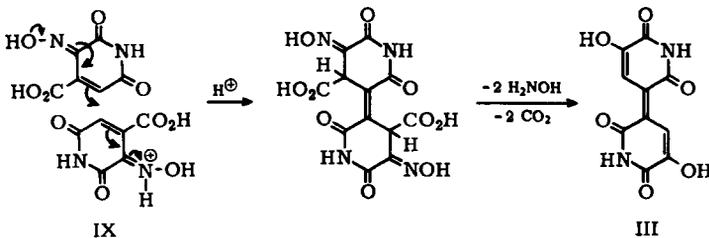
*Indigoidin und seine Derivate sind Sechsringimide*: J. H. BOYER und S. KRUGER<sup>11)</sup> erhielten durch Oxydation von 3- und 5-Amino-pyridon-(2) eine Substanz C<sub>5</sub>H<sub>3</sub>NO<sub>3</sub> von metallisch grünem Glanz. Das daraus durch reduktive Acetylierung gewonnene Produkt bezeichneten sie als „2.3.6-Triacetoxy-pyridin“. Analog haben wir das Indigoidin-Hydrolyseprodukt III — dieses zeigt, auf Ton gepreßt, ebenfalls metallisch grünen Glanz — reduzierend acetyliert. Das erhaltene Hexaacetoxy-bipyridyl-(3.3') VIII ist nach Schmp. (Mischprobe), Analyse, Molekulargewichtsbestimmung (osmometrisch) und IR-Spektrum mit nach BOYER und KRUGER dargestelltem „2.3.6-Triacetoxy-pyridin“ identisch. Die Pyridinkerne sind also biphenylartig und nicht, wie BOYER und KRUGER annahmen, nur durch Nebenvalenzen bzw. chinhydronartig verknüpft.

Da sich 5- und 3-Amino-pyridon-(2) in ein und dasselbe Hexaacetoxy-bipyridyl VIII überführen lassen, müssen in III in jedem der zwei Pyridinringe beide  $\alpha$ -Stellungen und eine  $\beta$ -Stellung zum Heteroatom durch Sauerstoff-Funktionen substituiert sein.

<sup>11)</sup> J. Amer. chem. Soc. 79, 3552 [1957].



Bereits 1893 erhielten W. J. SELL und T. H. EASTERFIELD<sup>12)</sup> durch säurekatalysierte Dimerisierung und Decarboxylierung von Nitrosocitrazinsäure (IX) ein ebenfalls bronzegrünes Produkt. Auch aus diesem gewinnt man durch reduzierende Acetylierung das Hexaacetoxy-bipyridyl VIII. Diese Synthese von III bestätigt die Stellung der Sauerstoffsubstituenten. Die Autoren machten eine 3,3'-Verknüpfung der Pyridinkerne wahrscheinlich, so daß folgender Dimerisierungsmechanismus angenommen werden darf:



Für das Dehydroderivat von III haben SELL und EASTERFIELD bereits die richtige Strukturformel VI angegeben.

**3,3'-Verknüpfung der Pyridinringe:** Beweisend für die Bipyridyl-(3,3')-Struktur ist die folgende Synthese. Bipyridyl-(3,3')<sup>13)</sup> wird zum Bis-*N*-oxyd<sup>14)</sup> oxydiert, das sich in ein 3,3'-Bispyridon umlagern läßt. Durch Nitrierung führt man in jeden Ring eine Nitrogruppe ein, die mit Sn und Salzsäure zur Aminogruppe reduziert wird. Das Diamino-3,3'-bispyridon — die Stellung der Substituenten kann nicht angegeben werden — oxydiert man mit HBrO<sub>3</sub>. Das IR-Spektrum des rohen Oxydationsproduktes läßt bereits die Identität mit Indigoidin-Hydrolyseprodukt (III) erkennen. Zur Identifizierung des Rohproduktes III — eine einfache Reinigungsmethode ist nicht bekannt — wurde zum Dehydroderivat VI oxydiert. Die Analyse und das IR-Spektrum des Dichinons beweisen die Identität von natürlichem und synthetischem Azachinon III.

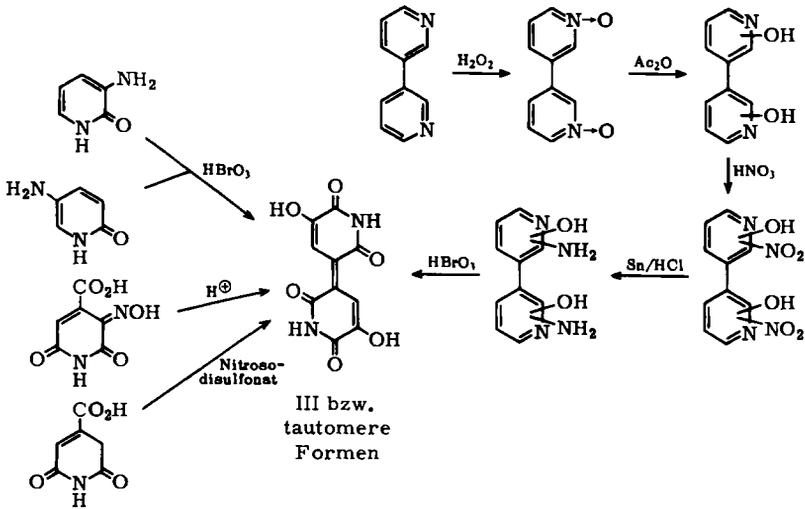
Das Indigoidin-Hydrolyseprodukt ist ein 4,5,4',5'-Tetrahydroxy-3,3'-diazadi-phenochinon-(2,2')(III) auf Grund aller bisher angeführten Synthesen, die im Schema (S. 2146) zusammengefaßt sind.

**Stellung der Aminogruppen im Indigoidin:** Durch Schmelzen mit Ammoniumacetat wird III bei 130° in 30-proz. Ausbeute zu Indigoidin (I) zurückverwandelt (Austausch von zwei OH- gegen zwei NH<sub>2</sub>-Gruppen; Umkehrung der Säurehydrolyse).

<sup>12)</sup> J. chem. Soc. [London] **63**, 1035 [1893]; s. a. W. J. SELL und H. JACKSON, ebenda **75**, 507 [1899].

<sup>13)</sup> C. R. SMITH, J. Amer. chem. Soc. **52**, 397 [1930].

<sup>14)</sup> J. HAGIWA und K. SHIOMI, J. pharmac. Soc. Japan **76**, 858 [1956].



Beweisend für die 5.5'-Stellung der Aminogruppen ist die folgende Synthese des Indigoidins aus Aminocitrazinsäure (3-Amino-2.6-dihydroxy-isonicotinsäure). Man hatte bereits beobachtet<sup>15)</sup>, daß Aminocitrazinsäure, besonders in wäßrig alkalischer Lösung, sehr autoxydabel ist; die entstehenden farbigen Produkte wurden nicht näher untersucht und als Polymere angesprochen. Je nach Versuchsbedingungen konnten wir jedoch zwei dimere Oxydationsprodukte in guten Ausbeuten gewinnen.

Oxydiert man Aminocitrazinsäure bei Raumtemperatur in wäßriger Hydrogencarbonatlösung mit  $K_3Fe(CN)_6$ , so erhält man augenblicklich tiefblaue Lösungen des Natriumsalzes einer Dicarbonsäure X.

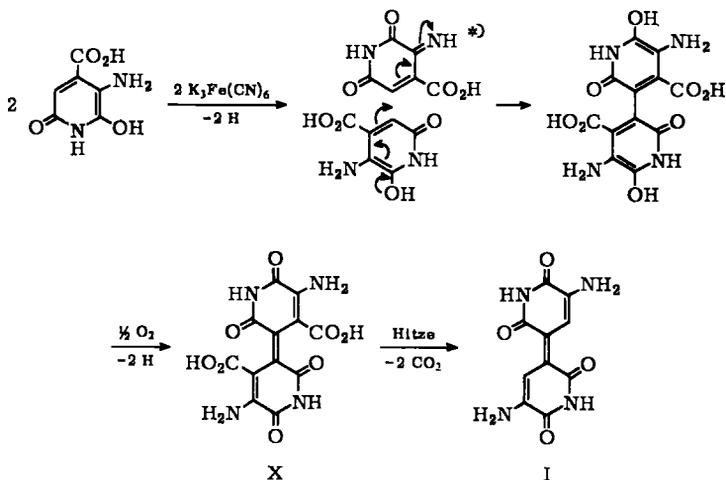
Die freie Säure läßt sich durch Ansäuern in großen grünlänzenden Kristallen abscheiden. Sie ist in Wasser und anderen Lösungsmitteln sehr schwer löslich. Wäßrig alkalische Lösungen der Dicarbonsäure sind instabil. Deshalb muß man die Säure aus hydrogencarbonatalkalischen Lösungen durch Ansäuern möglichst rasch ausfällen. Erwartungsgemäß ist die Darstellung analysenreiner Salze schwierig. Die Natrium- bzw. Kaliumsalze scheiden sich aus kalten wäßrigen Lösungen bei hoher Konzentration der entsprechenden Alkali-Ionen in großen, prächtig karminrotglänzenden Plättchen ab. Das schwerlösliche Bariumsalz fällt bereits beim Zutropfen von verd. Bariumacetatlösung in rotglitzernden Kristallen aus.

Die Kristalle der Säure (X) verändern sich beim Erhitzen bis 200° nicht. Die Decarboxylierung zu Indigoidin gelingt in 21-proz. Ausbeute durch längeres Erhitzen der Dicarbonsäure in wäßriger Suspension. Die leicht hydrolysierbaren Aminogruppen des Indigoidins verbieten eine durch starke Säuren katalysierte Decarboxylierung.

Diese Synthese über die 5.5'-Diamino-4.4'-dihydroxy-3.3'-diazadiphenochinon-(2.2')-dicarbonsäure-(6.6') (X) ist in sich ein Beweis für die Struktur I des Bakterienpigments, das somit als 5.5'-Diamino-4.4'-dihydroxy-3.3'-diazadiphenochinon-(2.2') bezeichnet werden kann.

<sup>15)</sup> Z. B. PAPANASTASSIOU, A. McMILLAN, V. J. CZEBOTAR und T. J. BARDOS, J. Amer. chem. Soc. 81, 6056 [1959].

Die beschriebene zweistufige Indigoidinsynthese kann man auch als Eintopfreaktion mit 93% Ausbeute durchführen. Weil im alkalischen Medium die Decarboxylierung von X verhindert wird, im sauren Milieu aber die Aminogruppen hydrolytisch abgespalten werden, nimmt man die Oxydation mit  $K_3Fe(CN)_6$  am besten in siedender wäßriger Suspension vor.



Der angenommene Reaktionsmechanismus erläutert, daß man zweckmäßig nur die Hälfte der berechneten Menge, d. h. nur 2 Äquivalente  $K_3Fe(CN)_6$  zugibt; nach einigen Minuten oxydiert man mit  $O_2$  weiter. Gibt man 4 Äquivalente  $K_3Fe(CN)_6$  auf einmal zu, so erhält man gelbbraune Lösungen und kein Indigoidin. — Eine teilweise Decarboxylierung auf der Stufe des naszierenden Chinons\*) kann nicht ausgeschlossen werden.

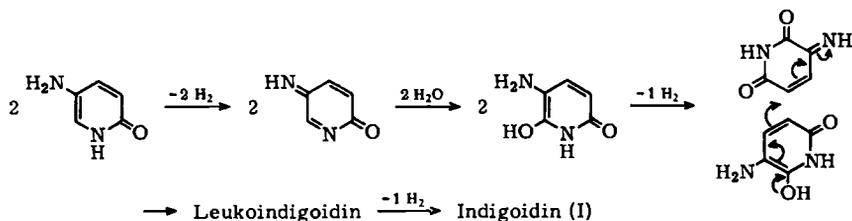
Die Synthese von Indigoidin aus Aminocitrazinsäure gelingt auch mit  $O_2$  allein als Oxydationsmittel. Unter ähnlichen Temperatur- und pH-Bedingungen wie oben muß jedoch länger erhitzt werden, so daß die Ausbeuten 80% nicht übersteigen. Der Farbstoff fällt dabei jedoch aschefrei und sofort praktisch rein an.

Gibt man, um die Oxydation zu beschleunigen,  $NaHCO_3$ ,  $(NH_4)_2CO_3$ , Pyridin oder Triäthylamin zum Reaktionsgemisch, so erhält man labile farbige Lösungen, jedoch praktisch kein Indigoidin. Nur in Gegenwart kleiner Mengen ( $1/2$  Äquivalent)  $KNCO^{16)}$  erhält man Indigoidin in Ausbeuten bis zu 30%.

Der für die Aminocitrazinsäure-Oxydation diskutierte Mechanismus ließ auch bei der Oxydation der Aminopyridone nach BOYER und KRUGER die Bildung von Indigoidin, d. h. nicht nur von III, unter geeigneten Bedingungen erwarten.

Tatsächlich isolierten wir aus dem so erhaltenen Rohpigment (10%) reines Indigoidin in 2-proz. Ausbeute. Diese Experimente zeigen, daß die Zugabe von Harnstoff bei einer früher<sup>16)</sup> erwähnten Indigoidinsynthese unwesentlich war. Die Oxy-

<sup>16)</sup> R. KUHN, W. BLAU, H. BAUER, H. J. KNACKMUSS, D. A. KUHN und M. P. STARR, Naturwissenschaften 51, 194 [1964].



dation von Aminopyridon in stark saurem Medium ist zwar für die Entstehung des Indigoidins ungünstig, jedoch läßt sich die hydrolytische Abspaltung der Aminogruppen (Synthesebedingungen nach BOYER) durch starkes Kühlen und möglichst kurze Verweilzeit im sauren Milieu unterdrücken. — Auch die zuletzt angeführte Synthese des Indigoidins beweist die 5.5'-Stellung der Aminogruppen.

Der Bildungsmechanismus des Indigoidins bei der erwähnten Hydrierung der „golden yellow needles“<sup>(1)</sup> ist noch undurchschaubar.

Schon 1884 beobachteten A. BEHRMANN und A. W. HOFMANN<sup>17)</sup>, daß eine ammoniakalische Lösung von Citrazinsäure beim Stehenlassen an der Luft blau wird. Eigene Versuche ergaben, daß der entstehende Farbstoff, der nicht in reiner Form isoliert wurde,  $\lambda_{\text{max}} = 602 \text{ m}\mu$  (in DMF) zeigt wie Indigoidin. Es bleibt jedoch ungewiß, ob dabei durch aminierende Oxydation Indigoidin gebildet wird, da Citrazinsäure auch ohne Zusatz von Ammoniak (z. B. in Dimethylsulfoxyd schon bei Raumtemperatur im Laufe mehrerer Stunden) blaue Lösungen mit  $\lambda_{\text{max}} = 607 \text{ m}\mu$  liefert.

Herrn Prof. Dr. M. P. STARR und Fräulein Prof. Dr. D. A. KUHN danken wir für die Überlassung von natürlichem Indigoidin, Herrn Dr. G. R. BEDFORD (J. C. J. Macclesfield, England) für die Aufnahme und Diskussion der NMR-Spektren, Herrn Dr. W. OTTING für IR-spektroskopische Messungen, Herrn Dr. H.-FR. GRÜTZMACHER (Chemisches Staatsinstitut Hamburg) für die Aufnahme der Massenspektren, Herrn Prof. Dr. H. RUDY (Benckiser, Ladenburg) für Überlassung von Citrazinsäure, der CIBA AG Basel für 4.7-Phenanthrolinchinon-(5.6).

### BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

2.2'-Dihydroxy-5.6.5'.6'-tetraoxo-5.6.5'.6'-tetrahydro-bipyridyl-(3.3') (VI): 40 mg III (aus natürlichem Indigoidin) werden in 0.5 ccm konz. Salpetersäure ( $d = 1.5$ ) unter Rühren 1 Min. auf 30° erwärmt. Nach Abkühlen und Zufügen von 3 ccm Wasser fällt ein gelber kristalliner Niederschlag (27 mg), der aus verd. Salpetersäure umkristallisiert werden kann (verlustreich). Die Substanz ist lichtempfindlich; sie löst sich in wäbr. Alkali mit tiefblauer Farbe.

$\text{C}_{10}\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_6$  (248.2) Ber. C 48.40 H 1.62 N 11.29 Gef. C 48.19 H 1.93 N 11.60

Aus synthetischem III erhält man die gleiche Verbindung.

#### 4.5.4'.5'-Tetrahydroxy-3.3'-diazadiphenochinon-(2.2') (III)

a) 3.0 g 5-Amino-pyridon-(2)-hydrochlorid<sup>11)</sup> werden mit  $\text{KBrO}_3$  wie bei der Synthese des Indigoidins (S. 2153) oxydiert. Man läßt jedoch die Reaktionsmischung mehrere Stdn. bei ca. 5° stehen, filtriert den violetten Niederschlag ab, wäscht mit Wasser und erhitzt das Rohprodukt 30 Min. mit 10 ccm 6*n* HCl zum Sieden. Nach Abfiltrieren, Waschen mit Wasser

<sup>17)</sup> Ber. dtsh. chem. Ges. 17, 2681 [1884].

und Trocknen bei 150° i. Vak. erhält man 0.77 g rotes kristallines *III*, das, auf Ton abgepreßt, einen metallisch grünen Glanz zeigt.

$C_{10}H_6N_2O_6$  (250.2) Ber. C 48.01 H 2.42 N 11.20 Gef. C 48.03 H 2.56 N 11.14

Das IR-Spektrum in KBr stimmt nahezu überein mit dem des aus natürlichem Indigoidin erhaltenen Produkts. Die sichtbaren Spektren in DMF sind identisch.

b) *Durch saure Verseifung von 2.5.6.2'.5'.6'-Hexaacetoxy-bipyridyl-(3.3') (VIII):* 81 mg reines *VIII* werden mit 5 ccm 6*n* HCl 1 Stde. auf dem Dampfbad erwärmt. Man erhält 10–12 mg sehr reines 4.5.4'.5'-Tetrahydroxy-3.3'-diazadiphenochinon-(2.2') (*III*) in bronze-grünen Kristallen (IR-Spektrum s. Abbild.). Trocknen bei 150°/1 Torr liefert eine rotes Pulver.

$C_{10}H_6N_2O_6$  (250.2) Ber. N 11.20 Gef. N 11.10

c) *Durch saure Verseifung von 4.4'-Dihydroxy-5.5'-diacetoxy-3.3'-diazadiphenochinon-(2.2') (IV):* Wie vorstehend erhält man reines *Chinon III* mit ca. 90% Ausb. Grünschwärze Kristalle (IR-Spektrum s. Abbild.), die bei 150° getrocknet wurden.

$C_{10}H_6N_2O_6$  (250.2) Ber. N 11.20 Gef. N 10.95

d) Eine Suspension von Nitrosocitrazinsäure (*IX*) in 2*n* H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3–4 g in 100 ccm) wird langsam auf 100° erhitzt. Die Lösung färbt sich intensiv blau, später violett bis braun. Wenn die lebhafte CO<sub>2</sub>-Entwicklung nachgelassen hat, läßt man auf 70–60° abkühlen, saugt ab und wäscht mit warmem Wasser, bis das Filtrat nur noch schwach blau gefärbt ist. Man erhält derbe Prismen mit bronze-grünem Glanz, die bei 150° i. Vak. getrocknet werden. Ausb. 40–45%.

$C_{10}H_6N_2O_6$  (250.2) Ber. C 48.01 H 2.42 N 11.20 Gef. C 47.72 H 2.57 N 11.55

Nach UV-Spektrum und Analyse ist die Substanz vom Indigoidin-Hydrolyseprodukt nicht zu unterscheiden. Die IR-Spektren und Debye-Scherrer-Aufnahmen sind jedoch verschieden (verschiedenartige Assoziationen oder/und verschiedenartige *cis-trans*-Gemische).

4.4'-Dihydroxy-5.5'-diacetoxy-3.3'-diazadiphenochinon-(2.2') (*IV*)<sup>2)</sup>: a) Aus dem erhaltenen *III* mit BF<sub>3</sub>-Ätherat/Acetanhydrid. Aus Nitrobenzol goldgelbe Blättchen in 58-proz. Ausb.

$C_{14}H_{10}N_2O_8$  (334.2) Ber. C 50.31 H 3.01 N 8.38 2 CH<sub>3</sub>CO 25.75  
Gef. C 50.42 H 2.75 N 8.50 CH<sub>3</sub>CO 25.91

Nach Elektronenspektren und der Debye-Scherrer-Aufnahme identisch mit aus natürlichem Indigoidin erhaltenen *IV*<sup>2)</sup>.

b) *III* aus *IX* liefert das gleiche Produkt.

4.4'-Dihydroxy-5.5'-dimethoxy-3.3'-diazadiphenochinon-(2.2') (*V*): Zu einer Lösung von 1.0 g *III* in 1 l THF gibt man 60 ccm ca. 0.56 *m* äther. Diazomethan und läßt mehrere Stdn. im Kühlschrank stehen. Der gebildete rote Niederschlag (0.57 g, aus der Mutterlauge können noch 78 mg gewonnen werden) wird abfiltriert, aus Pyridin umkristallisiert und mit Methanol gewaschen. Ausb. 0.42 g (38%) rote Nadeln mit grünem Oberflächenglanz.

$C_{12}H_{10}N_2O_6$  (278.2) Ber. C 51.80 H 3.62 N 10.07 2 OCH<sub>3</sub> 22.30  
Gef. C 51.57 H 3.92 N 10.47 OCH<sub>3</sub> 22.02

Lösungen der roten Substanz in heißem Pyridin sind hellgelb. In 2*n* NaOH löst sich der Dimethyläther mit roter Farbe, die nach einiger Zeit ausbleicht.

5.5'-Dimethoxy-2.6.2'.6'-tetraacetoxy-bipyridyl-(3.3') (*VII*): 100 mg *V* werden in 10 ccm Acetanhydrid mit 0.5 g Zinkstaub 1 Stde. auf 110° erhitzt. Man arbeitet nach l. c.<sup>2)</sup> auf und erhält aus Methanol 67 mg (42%) farblose Würfel. Schmp. 147°.

$C_{20}H_{20}N_2O_{10}$  (448.4) Ber. C 53.57 H 4.50 N 6.25 2 OCH<sub>3</sub> 13.89 4 CH<sub>3</sub>CO 38.40  
Gef. C 53.55 H 4.59 N 6.36 OCH<sub>3</sub> 14.01 CH<sub>3</sub>CO 38.26

2.5.6.2'.5'.6'-Hexaacetoxy-bipyridyl-(3.3') (VIII)

a) Aus 100 mg III erhält man durch reduktive Acetylierung mit *Acetanhydrid* und *Zinkstaub*<sup>2)</sup> nach Umkristallisieren aus Äthanol (mit Kohle) 86 mg (43%) farblose hexagonale Kristalle, Schmp. 157–159°.

b) Aus III, das aus IX gewonnen wurde, farblose sechseckige Blättchen, Schmp. 163–164°. Ausb. 76%.

$C_{22}H_{20}N_2O_{12}$  (504.4) Ber. C 52.28 H 4.00 N 5.55

Gef. C 52.47 H 3.95 N 5.63 Mol.-Gew. 518 (osmometr. in THF)

Die Verbindungen nach a) und b) sind nach Schmp., Mischprobe, IR-Spektrum und Debye-Scherrer-Diagramm identisch mit VIII natürlicher Herkunft.

3-Nitroso-2.6-dihydroxy-isonicotinsäure (Nitrosocitrazinsäure) (IX)\*): 5.0 g 2.6-Dihydroxy-isonicotinsäure (Citrazinsäure)\*\*) werden in 25 ccm Wasser suspendiert und unter Sauerstoffausschluß mit  $N_2O_3$  – aus  $As_2O_3 + HNO_3$  ( $d = 1.3–1.35$ ) – behandelt, wobei man die Temperatur bei 10–15° hält. Unter kräftigem Rühren löst sich die Citrazinsäure (15–20 Min.). Gegen Ende der Reaktion beginnt IX auszukristallisieren. Man bricht die Nitrosierung ab, sobald man beginnende Decarboxylierung erkennt. Dann wird noch 1 Stde. auf 0° gekühlt und abgesaugt. Die rohe Nitrososäure löst sich restlos in Äthanol. Die äthanol. Lösung wird vorsichtig (Rotationsverdampfer, Bad <35°) i. Vak. bis fast zur Trockne eingedampft, der Rückstand mit Äther verdünnt, gekühlt und abgesaugt. Durch Waschen mit kaltem Äther erhält man die Säure fast farblos. Ausb. 80–90%.

$C_6H_4N_2O_5 \cdot H_2O$  (202.1) Ber. C 35.64 H 2.96 N 13.86 Gef. C 35.99 H 2.46 N 13.84

Bei Abweichungen von den angegebenen Reaktionsbedingungen erhält man leicht tiefblaue Lösungen, aus denen sich nur kleine Mengen IX gewinnen lassen.

2.5.6.2'.5'.6'-Hexahydroxy-bipyridyl-(3.3'): Eine Suspension von 1 mMol Chinon III in 20 ccm DMF wird mit 400–500 mg Pd/BaSO<sub>4</sub> hydriert. Innerhalb von 30–40 Min. wird 1 mMol H<sub>2</sub> aufgenommen. Nach Abtrennung vom Katalysator unter Sauerstoff-Ausschluß läßt sich das Hydrierungsprodukt durch Zugabe von Äther farblos und kristallin abscheiden. An der Luft färbt es sich rasch violett-braun. Vollständig reoxydiert zum Chinon III wird es durch Erhitzen in 2n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> unter Luftzutritt.

Bipyridyl-(3.3')-dicarbonsäure-(2.2')<sup>18)</sup>: Eine Suspension von 20 g 4.7-Phenanthrolin-chinon-(5.6) in 400 ccm Wasser versetzt man mit 100 ccm 10-proz. Kalilauge. Zur klaren Lösung tropft man unter Rühren 7 g KMnO<sub>4</sub> in 150 ccm Wasser. Dann wird kurz auf 50–60° erhitzt, vom MnO<sub>2</sub> abfiltriert, verdampft, der Rückstand mit 50 ccm Wasser aufgenommen<sup>†)</sup>, mit 2n HCl schwach angesäuert und die Lösung zur Entfernung von CO<sub>2</sub> auf dem Wasserbad erhitzt. Bei Zugabe von 16 g CuCl<sub>2</sub> in 20 ccm Wasser fällt das blaue Cu-Salz der Bipyridyldicarbonsäure aus, das abfiltriert und mit viel Wasser gewaschen wird. Man suspendiert es in 400 ccm Wasser und leitet H<sub>2</sub>S mehrere Std. bei 70° ein, filtriert vom CuS ab und verdampft. Ausb. 13 g (56%). Schmp. 217° (Zers.) (Lit.<sup>18)</sup>: 214–214.5°).

Bipyridyl-(3.3')<sup>13)</sup>: 15.5 g Bipyridyldicarbonsäure werden mit ca. 10 ccm Glycerin angeteigt und langsam auf 150° erhitzt (3 Std.). Unter Rotfärbung tritt Lösung ein. Nach Abkühlen

\*) Verbesserung der Angaben von SELL, EASTERFIELD und JACKSON<sup>12)</sup>.

\*\*\*) Die eingesetzte Citrazinsäure entsprach den von F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. A.-G. Schweiz. Pat. 301, 434, [1954], C. A. 51, 2055 [1957], angegebenen Reinheitskriterien (Lösen in konz. Schwefelsäure und Ausfällen mit Wasser).

†) Die Bipyridyldicarbonsäure kann auch aus dieser Lösung durch Ansäuern mit konz. Salzsäure ausgefällt werden: sie ist dann jedoch weniger rein.

<sup>18)</sup> A. L. SEARLES und R. M. WARREN, J. org. Chemistry 18, 1317 [1953].

versetzt man mit wenig Wasser, sättigt mit  $K_2CO_3$ , schüttelt mehrmals mit Äther aus, trocknet die äther. Lösung über  $MgSO_4$  und destilliert den Äther ab. Es hinterbleiben 8.4 g (85%) eines schwach rötlichen Öls, das zur weiteren Umsetzung nicht destilliert werden muß. *Pikrat*: Schmp. 234° (Lit.<sup>19)</sup>: 232°).

*Bipyridyl-(3.3')-bis-N-oxyl*<sup>14)</sup>: Eine Lösung von 6.3 g *Bipyridyl-(3.3')* in 35 ccm Eisessig + 15 ccm 30-proz. Wasserstoffperoxid wird 5 Stdn. auf 100° erhitzt. Dann gibt man weitere 15 ccm 30-proz. Wasserstoffperoxid zu und erhitzt noch 10 Stdn. Nach dem Abkühlen wird die Hälfte der Essigsäure abdestilliert, dann mit 20 ccm Wasser verdünnt und auf 10 ccm eingengt. Nach erneuter Zugabe von Wasser (50 ccm) dampft man bis zur Trockene ein. Der Rückstand wird in 50 ccm Wasser gelöst und die Lösung mit 20 g  $K_2CO_3$  versetzt. Dabei fällt das *Bis-N-oxyl* farblos aus (5 g). Aus dem Filtrat erhält man durch Ausschütteln mit  $CHCl_3$  noch 1 g. Aus Äthanol sternförmig angeordnete Prismen. Schmp. 304° (Zers.) (Lit.<sup>14)</sup>: 305°).

$C_{10}H_8N_2O_2$  (188.2) Ber. C 63.82 H 4.29 N 14.89 Gef. C 63.75 H 3.99 N 15.35

*3.3'-Bispyridon-(2.2' bzw. 6.6' bzw. 2.6')* oder Gemische derselben: 6.5 g *Bipyridyl-bis-N-oxyl* werden in 70 ccm *Acetanhydrid* 2 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Es tritt allmählich Lösung ein unter Dunkelfärbung. Dann wird i. Vak. abdestilliert, nach Zusatz von absol. Äthanol erneut verdampft und 2n HCl (2 ccm) zugefügt. Das abgeschiedene halb feste Produkt wird mit 30 ccm Wasser versetzt und abfiltriert (3.3 g). Aus Wasser 2.1 g (33%) lanzettförmige Blättchen.

$C_{10}H_8N_2O_2$  (188.2) Ber. C 63.82 H 4.29 N 14.89 Gef. C 63.68 H 4.48 N 15.07

*Dinitro-3.3'-bispyridon (mögliche Isomere wie oben)*: In eine Lösung von 1.3 g *3.3'-Bispyridon* in 4 ccm konz. Schwefelsäure tropft man unter Rühren und Kühlen ein Gemisch von 1.7 ccm rauchender *Salpetersäure* (*d* 1.5) und 2.6 ccm konz. Schwefelsäure und hält die Temperatur unter 25°. Nach einigen Stdn. gießt man auf 15 g Eis. Hierbei fällt ein Niederschlag aus, den man mit 10 ccm 40-proz. Natronlauge digeriert und mit Eiswasser wäscht. Aus Pyridin 0.8 g (42%) gelbe Nadeln, die bis 350° nicht schmelzen.

$C_{10}H_6N_4O_6$  (278.2) Ber. C 43.17 H 2.17 N 20.14 Gef. C 43.07 H 2.32 N 20.38

*Diamino-3.3'-bispyridon (mögliche Isomere wie oben)*: 0.95 g *Dinitro-3.3'-bispyridon* werden portionsweise unter Rühren zu 5 g gran. Zinn in 20 ccm konz. Salzsäure gegeben. Die Mischung erwärmt sich auf 45°. Nach Hinzufügen von weiteren 30 ccm 6n HCl wird 2 Stdn. auf 80° erhitzt, dann filtriert und das Filtrat mit Wasser auf 80 ccm verdünnt. Das Zinn wird mit  $H_2S$  ausgefällt und die Lösung verdampft. Rückstand 0.47 g *Hydrochlorid der Diaminoverbindung*, schwach bräunlich.

*Oxydation zu III*: 0.47 g rohes *Diamino-3.3'-bispyridon-hydrochlorid* werden mit 5 ccm konz. Schwefelsäure übergossen und zur Entfernung von HCl schwach erwärmt. Die bräunliche Lösung gießt man auf 10 g Eis und tropft unter Rühren und Kühlen eine Lösung von 70 mg  $KBrO_3$  in 2 ccm Wasser zu. Nach mehrstdg. Stehenlassen hat sich ein grünvioletter Niederschlag abgeschieden (37 mg). Er wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen und i. Vak. bei 150° getrocknet. Das IR-Spektrum stimmt bis auf unwesentliche Abweichungen mit dem des *Indigoidin-Hydrolyseproduktes III* überein.

Aus 10 mg des Rohproduktes erhält man durch Oxydation mit *Salpetersäure* (*d* = 1.5) nach oben beschriebener Methode 5 mg einer gelben kristallinen Substanz, die nach Analyse und IR-Spektrum identisch ist mit VI, dargestellt aus Indigoidin, Aminocitrazinsäure oder 5-Amino-pyridon-(2).

$C_{10}H_4N_2O_6$  (248.2) Ber. N 11.29 Gef. N 11.29

<sup>19)</sup> ZD. H. SKRAUP und G. VORTMANN, Mh. Chem. 4, 569 [1884].

*Indigoidin (I) aus dem Hydrolyseprodukt III*: Eine Mischung von 200 mg *III* und 10 g *Ammoniumacetat* wird 45 Min. auf 130° erhitzt. Nach dem Abkühlen wird mit 40 ccm Wasser versetzt, das Ungelöste abfiltriert und mit 0.5*n* CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H gewaschen. Zur Entfernung restlichen Ausgangsmaterials suspendiert man den Rückstand (180 mg) in 100 ccm gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und rührt mehrere Stdn. bis die überstehende Lösung eine orangegelbe Farbe annimmt. Das unlösliche *Indigoidin* wird abfiltriert und mit 1*n* CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H gewaschen. Ausb. 60 mg (30%). IR-Spektrum in KBr und sichtbares Spektrum in DMSO stimmen mit denen des natürlichen Farbstoffs überein.

*Diacetylderivat II<sup>2)</sup>*: Mit *Acetanhydrid* und BF<sub>3</sub>-Ätherat erhält man aus 55 mg synth. *Indigoidin* 47 mg Diacetylprodukt, aus 150 ccm Nitrobenzol 32 mg (44%) violett-rote Nadeln.

C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> (332.3) Ber. C 50.60 H 3.64 N 16.86 2 CH<sub>3</sub>CO 25.90

Gef. C 50.30 H 3.61 N 16.81 CH<sub>3</sub>CO 25.96

IR-Spektrum in KBr und sichtbares Spektrum in DMSO sind identisch mit denjenigen der Diacetylverbindung aus natürlichem *Indigoidin*.

*5.5'-Diamino-4.4'-dihydroxy-3.3'-diazadiphenochinon-(2.2')-dicarbonsäure-(6.6')* (*Indigoidin-dicarbonsäure*) (*X*): 3.4 g (20 mMol) *Aminocitrazinsäure* (3-Amino-2.6-dihydroxy-isonicotinsäure)<sup>15)</sup> werden in 100 ccm gesätt. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gelöst und 6.5 g (10 mMol) K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> in 25 ccm Wasser hinzugegeben. Die Lösung färbt sich sofort unter Aufschäumen tiefblau. Zur vollständigen Oxydation leitet man O<sub>2</sub> durch die Lösung. Nach 10 Min. werden 100 ccm Eisessig hinzugegeben. Beim Kühlen im Eisbad kristallisiert die *Indigoidin-dicarbonsäure* aus. (Gelegentlich fällt vor dem Ansäuern das Natriumsalz der Dicarbonsäure in violettroten Plättchen aus, die sich beim Ansäuern nicht vollständig in die freie Säure umwandeln.) Aschefreie Produkte erhält man, indem man das Rohprodukt in halbgesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung löst und mit Eisessig ausfällt. Grünglänzende derbe Prismen. Ausb. > 52%.

C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub> (336.2) Ber. C 42.86 H 2.40 N 16.67 Gef. C 42.57 H 2.52 N 16.71

Die alkalischen tiefblauen Lösungen der Dicarbonsäure sind instabil (Hydrolyse und Autoxydation); selbst beim schnellen Lösen in NaHCO<sub>3</sub>-Lösung erhält man beim Ausfällen mit Säure nur 60% der Dicarbonsäure zurück.

*Decarboxylierung von X zu Indigoidin (I)*: 100 mg reine feingepulverte *Dicarbonsäure X* werden in 10 ccm Wasser suspendiert und 2–3 Stdn. auf 100° erhitzt. Das Rohprodukt wird über die Leukoform gereinigt und ist dann mit natürlichem *Indigoidin* identisch (IR-Spektrum). Ausb. 15 mg (21%).

#### *Indigoidin (I) aus Aminocitrazinsäure unter anderen Bedingungen*

1. 2.0 g *Aminocitrazinsäure*<sup>15)</sup> werden in 40 ccm siedendes Wasser eingetragen. Unter Rühren gibt man 3.44 g K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> in 10 ccm Wasser hinzu. Nach 5 Min. wird O<sub>2</sub> durch die Flüssigkeit geleitet und unter Rühren weitere 30 Min. auf Siedetemperatur gehalten. (Oxydation und Decarboxylierung sind vollständig, wenn nach Absaugen einer Probe die Mutterlauge nicht mehr blau gefärbt ist.) Wie für das natürliche *Indigoidin* beschrieben<sup>2)</sup>, wird einmal über die Leukoform umgefällt. Reinausb. 93% (kolorimetrisch in *N*-Methyl-pyrrolidon, bez. auf reines natürliches *Indigoidin*, λ<sub>max</sub> 605 mμ, ε = 2.155 · 10<sup>4</sup>). Ein aschefreies Produkt (14 mg) erhält man durch Umkristallisieren aus heißem Chinoxalin (22 g) und Waschen mit Benzol.

C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (248.2) Ber. C 48.39 H 3.25 Gef. C 48.41 H 3.24

Die N-Werte fallen oft 1–1.5% zu niedrig aus.

*Diacetylderivat II*: Identisch mit dem aus natürlichem *I*.

2. Man leitet unter kräftigem Rühren *Sauerstoff* durch eine siedende Suspension von *Aminocitrazinsäure* in Wasser. Wenn der gebildete Farbstoff keine  $\text{NaHCO}_3$ -löslichen Anteile mehr enthält (nach 75–80 Min.), wird abgekühlt, abgesaugt und mit  $1n \text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$  gewaschen. Das Produkt ist mit nach 1. gewonnenem *Indigoidin* identisch (IR- und sichtbares Spektrum), jedoch aschefrei und nach kolorimetrischer Bestimmung praktisch rein.

3. 420 mg (2.0 mMol) *Aminocitrazinsäure-hydrochlorid* werden in 10 ccm siedendem Wasser, das 240 mg (3.0 mMol) *KNCO* enthält, suspendiert. Unter Rühren leitet man  $\text{O}_2$  durch die Lösung, die sich schnell tiefblau färbt; das *Indigoidin* beginnt auszukristallisieren (kupferfarbene Kristallhaut). Nach 10–15 Min. wird mit Eisessig angesäuert. Durch Reinigen über die Leukoform erhält man den Farbstoff in 31-proz. Ausb. Elektronenspektren und Debye-Scherrer Diagramme beweisen die Identität mit natürlichem Indigoidin.

*Indigoidin (I) aus 5-Amino-pyridon-(2)*: 3.0 g *5-Amino-pyridon-(2)-hydrochlorid* werden mit 25 ccm konz. Schwefelsäure übergossen und schwach erwärmt, bis keine  $\text{HCl}$ -Nebel mehr entweichen. Dann gießt man auf 50 g Eis und tropft unter Rühren 1.1 g  $\text{KBrO}_3$  in 25 ccm Wasser zu. Die Temperatur soll nicht über  $5^\circ$  steigen. Die Lösung wird bald dunkelblau: Nach  $1\frac{1}{2}$  stdg. Aufbewahren bei  $-5^\circ$  wird der gebildete violette Niederschlag abfiltriert und mit Wasser und  $1n \text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$  gewaschen. Ausb. 0.55 g. Beim Pressen auf Ton zeigt die Substanz kupferfarbenen Glanz. Zur Entfernung von mitentstandener III verküpt man das Rohprodukt zweimal in jeweils 250 ccm gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung mit 2.5 g  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  und fällt das *Indigoidin* durch Einleiten von Sauerstoff wieder aus. Abzentrifugieren und Waschen mit  $1n \text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$  liefert 96 mg Farbstoff, der nach Elektronenspektren mit natürlichem Indigoidin identisch ist; die *Diacetylderivate II* stimmten ebenfalls überein.

*4.5.4'.5'-Tetrahydroxy-3.3'-diazadiphenochinon-(2.2') (III)<sup>17)</sup>*: 0.5 g *Citrazinsäure* trägt man in eine kaltgesätt. wäßr. Lösung von 0.25 g *Kaliumnitrit* ein. Dabei erwärmt sich die Lösung schwach und färbt sich blaugrün. Vom Ungelösten wird abfiltriert und das Filtrat in Äthanol gegossen. Der ausgefallene blaugrüne Niederschlag wird abfiltriert und mit Äthanol gewaschen. Ausb. 0.6 g. Hiervon wurden 0.35 g in 10 ccm Wasser gelöst und die blaue Lösung mit  $6n \text{HCl}$  angesäuert. Die Farbe schlug nach Rotviolett um. Nach mehreren Stdn. Stehenlassen in der Kälte bildete sich ein roter Niederschlag (24 mg).

$\text{C}_{10}\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_6$  (250.2). Ber. C 48.01 H 2.42 N 11.20 Gef. C 47.87 H 2.22 N 11.05

Die Verbindung ist nach IR-Spektrum und Analyse identisch mit III, hergestellt aus *5-Amino-pyridon-(2)*. [27/65]