

Über ein neues Indoxylderivat

von

Adolf Jolles.

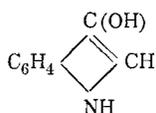
Aus dem chemischen Laboratorium von Dr. M. und Prof. A. Jolles in Wien.

(Vorgelegt in der Sitzung am 18. März 1915.)

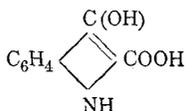
In Band 87 (1913), Heft 4, der »Zeitschrift für physiologische Chemie« habe ich in einer vorläufigen Mitteilung eine neue Indikanreaktion beschrieben, für welche ich folgende Vorschrift gab:

»10 cm^3 Harn werden mit 2 cm^3 einer 20prozentigen Bleizuckerlösung versetzt, umgeschüttelt und klar filtriert. Zum Filtrate setzt man $\frac{1}{2}$ cm^3 einer zehnprozentigen alkoholischen Thymollösung, 10 cm^3 einer eisenchloridhaltigen Salzsäure (Obermayer's Reagens) und 4 cm^3 Chloroform hinzu und schüttelt das Ganze gut durch, worauf bei Anwesenheit selbst der geringsten Spuren von Indikan das Chloroform eine schöne violette Färbung zeigt.«

Bei dem Versuche, den Mechanismus dieser Reaktion aufzuklären und womöglich die Konstitution des violetten Stoffes zu ergründen, ging ich anstatt von dem bekanntlich sehr unbeständigen Indoxyl



von der viel beständigeren, durch Erhitzen aber leicht in Indoxyl überführbaren Indoxylsäure

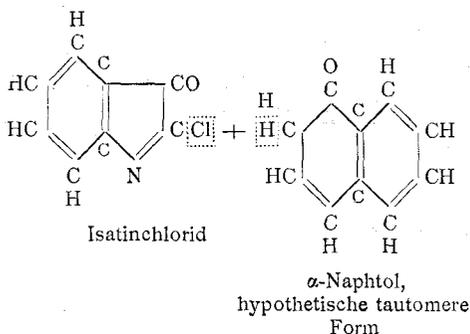


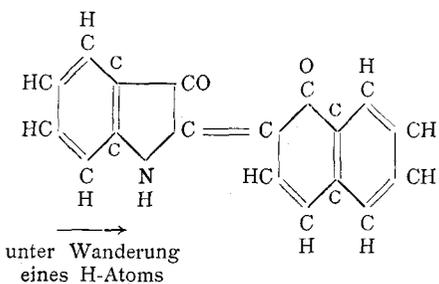
aus, von welcher mir die Farbenfabriken vorm. Friedr. Bayer & Co. in liebenswürdiger Weise eine genügende Quantität zur Verfügung gestellt hatten.

10 g Indoxylsäure wurden in der Hitze in Eisessig gelöst. Nach Beendigung der Kohlendioxydentwicklung wurde eine Eisessiglösung von 8.5 g Thymol zugefügt und die Mischung mit einer Lösung von 36 g Eisenchlorid in wenig konzentrierter Salzsäure versetzt. Beim Eintragen der Reaktionsmasse in Wasser schied sich ein dunkelblau gefärbtes Koagulum ab, welches sich unter dem Mikroskop als ein Gemenge einer blauen amorphen Masse und roter Krystalsplitter erwies.

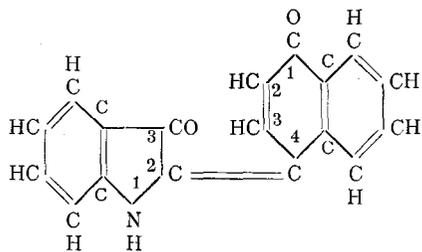
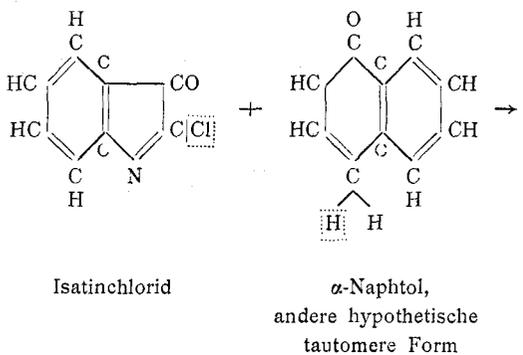
Auf Grund dessen vermutete ich, daß sich bei der oben beschriebenen Indikanreaktion zwei isomere Substanzen bilden, welche in die Gruppe der von Friedländer und seinen Schülern (Monatshefte für Chemie, 29, p. 359, 375, 387; 30, p. 271) aus Isatinchlorid (oder Isatinanilid) und Phenolen — also auf einem ganz anderen Wege — dargestellten »indigo-iden« Farbstoffe gehören.

Da für die von Friedländer beispielsweise mit α -Naphthol durchgeführte Kondensation, bei welcher zwei isomere Stoffe entstehen, folgende Reaktionen anzunehmen sind:



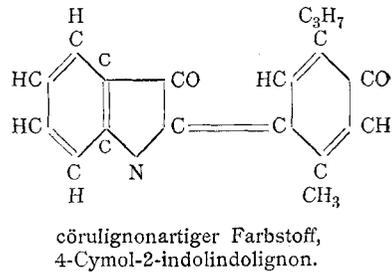
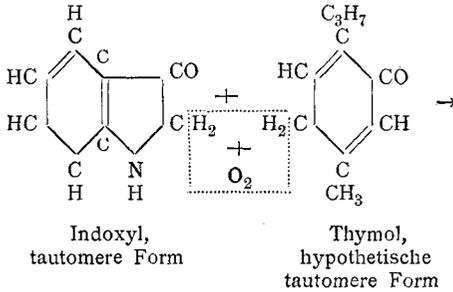
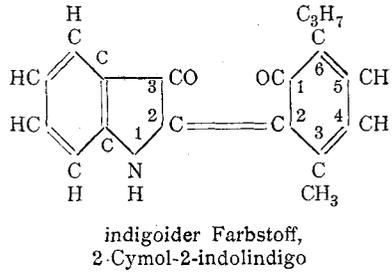
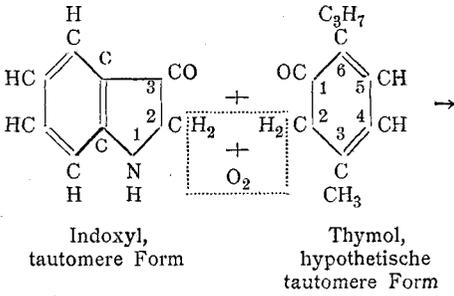


indigoier Farbstoff 2-Naphtalin-2-indolindigo



cörlignonartiger Farbstoff
4-Naphtalin-2-indolindigo,

glaubte ich, daß für die beiden, wie oben beschrieben, von mir erhaltenen Stoffe folgende Bildungsweise angenommen werden müsse:



Die Versuche, die beiden Stoffe nach der von Friedländer für die Kondensationsprodukte aus α -Naphtol und

Isatinchlorid angegebenen Methode (Auskochen mit verdünnter Sodalösung) zu trennen, hatten aber keinen Erfolg. Hingegen gelang es, durch fraktionierte Krystallisation aus Nitrobenzol das Gemenge in einen schwerer löslichen, blauen, amorphen Anteil und einen leichter löslichen, roten, krystallisierten Körper zu zerlegen.

Da nun einerseits die Elementaranalyse zeigte, daß die beiden so erhaltenen Stoffe nicht einheitlich sind und andererseits nur der rote Körper den bei der eingangs angegebenen Indikanreaktion angeführten auffallenden Farbenumschlag beim Schütteln seiner Chloroformlösung mit konzentrierter Salzsäure und mit Wasser zeigte, während die Chloroformlösung des blauen Stoffes weder bei Berührung mit konzentrierter Salzsäure noch mit Wasser ihre Nuance änderte, so mußte geschlossen werden, daß die blaue Substanz nicht ein Produkt der Reaktion zwischen Indoxyl, Thymol und Ferrichlorid, sondern vielmehr eine in der technischen Indoxylsäure bereits vorhandene, beziehungsweise durch Einwirkung des Eisenchlorids in irgendeiner Weise veränderte Verunreinigung darstellt. Um nun diese Verunreinigungen von vornherein auszuschließen und somit das Reaktionsprodukt gleich in möglichster Reinheit zu gewinnen, wurde bei den weiteren Versuchen folgende Arbeitsweise eingehalten:

30 g Indoxylsäure wurden mehrere Male mit Wasser ausgekocht, in welchem sich das Indoxyl, nicht aber die harzigen Verunreinigungen der technischen Indoxylsäure lösen, die Lösungen heiß filtriert und zu den gesammelten Filtraten so viel Eisessig zugefügt, daß das in der Kälte aus der wässrigen Lösung als gelbes Öl abgeschiedene Indoxyl wieder in Lösung ging. Hierzu wurde nun eine Eisessiglösung von 25 g Thymol gefügt und das Gemisch unter gutem Rühren in überschüssige Eisenchloridsalzsäure (enthaltend 110 g Ferrichlorid) eingetragen. Das Ganze wurde hierauf unter Rühren in konzentrierte Sodalösung eingegossen, wobei sich eine rotbraune Masse abschied. Diese wurde abgesaugt, mit Wasser gewaschen, getrocknet, hierauf zur Entfernung des überschüssigen, d. h. nicht in Reaktion getretenen Thymols mit Petroäther ausgezogen und schließlich zur Trennung des

Farbstoffes vom Ferrihydroxyd mit Äther im Soxhlet extrahiert. Der aus der ätherischen Lösung durch Abdunsten gewonnene Farbstoff wurde schließlich zweimal aus Nitrobenzol umkrystallisiert und dabei in Form schöner roter Prismen mit aufgesetzten Pyramiden erhalten.

Herr Hofrat Prof. v. Lang hatte die Freundlichkeit, die krystallographische Untersuchung vorzunehmen, wofür ich ihm zu besonderem Danke verpflichtet bin. Herr Hofrat v. Lang teilte mir folgendes mit: »Die Krystalle sind platte Nadeln von nur $\frac{1}{30}$ mm Querdimension. Sie sind in der Längsrichtung begrenzt von zwei Flächenpaaren, von welchen das breite sehr gut spiegelt und die einen Winkel von $80^{\circ} 2'$ miteinander bilden. Weitere Messungen waren nicht auszuführen, da beide Enden der Krystalle zugespitzt sind, ohne daß Spuren von Flächen zu entdecken wären.«

»Die Krystalle sind doppelbrechend, und zwar sind die Hauptschwingungsrichtungen parallel und senkrecht zur Längsrichtung. Hierbei sind die parallelen Schwingungen dunkelrot, während die senkrechten vollständig absorbiert werden. Aus dem optischen Verhalten ist zu schließen, daß die untersuchten Krystalle entweder dem rhombischen oder dem monoklinen System angehören, wahrscheinlich dem letzteren mit einer Achsenschiefe von $98^{\circ} 58'$.«

Die Substanz schmilzt bei 218 bis 220° unter gleichzeitiger Zersetzung und ist in den gewöhnlichen organischen Lösungsmitteln mit roter bis braunroter Farbe löslich (sehr verdünnte Lösungen zeigen eine braune bis bräunlichgelbe Färbung). Bei Zusatz von Salzsäure schlägt die rote oder braunrote Farbe der Lösungen in Violett um; wird die Salzsäure durch Auswaschen oder Neutralisation entfernt, so kehrt die ursprüngliche Farbe wieder. Auch in Alkalilauge ist die Substanz, und zwar mit schwach gelber Farbe löslich und kann daraus, solange die Lösung nicht erhitzt wurde, durch Ansäuern wieder ausgefällt werden. Beim Erhitzen der alkalischen Lösung erfolgt Spaltung.

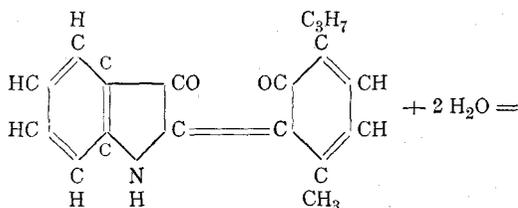
0.2107 g Substanz gaben 0.5950 g CO_2 und 0.1149 g H_2O .

0.3985 g Substanz gaben 18.0 cm^3 N bei 15° C. und 756 mm Barometerstand.

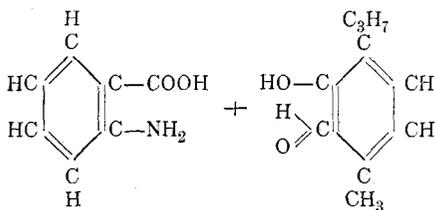
In 100 Teilen:

	Berechnet für <u>C₁₈H₁₇NO₂</u>	Gefunden
C	77·38	77·01
H	6·14	6·10
N	5·02	5·25

Zur Entscheidung der Frage, ob dem gewonnenen Stoffe die indigoide oder die cörlignonartige Struktur zukomme, wurde die von Friedländer angegebene Alkalisplaltung vorgenommen, bei welcher der indigoide Stoff nach der Gleichung:



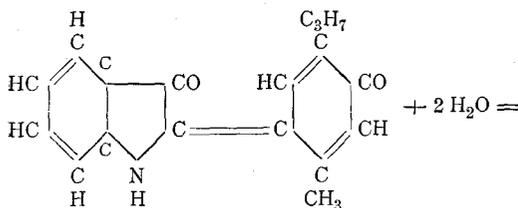
2-Cymol-2-indolindigo



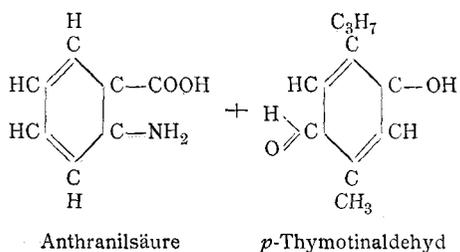
Anthranilsäure

o-Thymotinaldehyd

in Anthranilsäure und *o*-Thymotinaldehyd, der cörlignonartige Stoff nach der Gleichung:



4-Cymol-2-indolindignon



in Anthranilsäure und *p*-Thymotinaldehyd zerfallen müßte.

2 g Substanz wurden mit 20 g zehnpromzentiger Natronlauge so lange gekocht, bis beim Ansäuern einer Probe keine Rückbildung des Farbstoffes mehr eintrat und hierauf die gesamte Reaktionsmasse mit Salzsäure bis zur sauren Reaktion versetzt, wobei sich eine braungelbe amorphe Masse abschied. Im Filtrate konnte zwar die Anthranilsäure nachgewiesen werden, jedoch gelang es nicht, aus dem Rückstande das andere Spaltprodukt rein zu gewinnen. Trotzdem glaube ich mit Sicherheit annehmen zu können, daß nicht Ortho-, sondern Parathymotinaldehyd als zweites Spaltungsprodukt auftritt, da in dem wasserunlöslichen Anteil der angesäuerten Spaltmasse kein mit Wasserdämpfen flüchtiges Produkt enthalten ist, der *o*-Thymotinaldehyd aber, wie jeder aromatische Orthooxyaldehyd mit Wasserdämpfen flüchtig sein muß. Auf Grund dieser Überlegung müßte also dem durch gemeinsame Oxydation von Thymol und Indoxyl mittels Ferrichlorid dargestellten Produkte die cörolignonartige Struktur und mithin nach Friedländer's Nomenklatur die Bezeichnung 4-Cymol-2-indolindolignon beigelegt werden, was noch dadurch gestützt wird, daß die Substanz keinerlei tinktoriellen Charakter zeigt, d. h. weder zur ungebeizten noch zur gebeizten tierischen oder pflanzlichen Faser irgendwelche Affinität besitzt, ein Verhalten, welches bei einem Stoffe von indigoider Struktur kaum möglich erscheint.

Darstellung des salzsauren Salzes des Indolignons.

Eine Quantität der reinen Substanz wurde in trockenem Äther gelöst, mit trockenem HCl-Gas gesättigt und der ausgefallene braunschwarze, samtartige Niederschlag, der unter

dem Mikroskop deutlich Nadeln erkennen ließ, isoliert. Bei der Analyse konnte festgestellt werden, daß das entstandene Salz ein Molekül HCl enthält.

Es ist interessant hervorzuheben, daß die Substanz, wie ihre Löslichkeit in Alkalien beweist, auch schwach saure Eigenschaften hat; beide Erscheinungen sind ja auch bei den indigoïden Farbstoffen beobachtet worden.

0·0738 g im Schwefelsäureexsikkator getrocknete Substanz lieferte 0·0322 g AgCl.

Daher in 100 Teilen:

	Berechnet	Gefunden
Cl.....	11·24	10·80

Qualitativer Nachweis des indoxylschwefelsauren Kaliums (Indikan).

Die hervorstechendste Eigenschaft des bei der gemeinsamen Oxydation von Thymol und Indoxyl entstehenden 4-Cymol-2-indolindolignons ist seine Fähigkeit, mit 1 Mol Säuren Salze zu bilden, die eine tiefviolette Farbe zeigen. Dies ist auch die Ursache der Färbung des Chloroformauszüge bei der von mir vorgeschlagenen Indikanreaktion. Behandelt man die Chloroformlösung mit Wasser, so wird entsprechend der größeren Löslichkeit der Salzsäure in Wasser diese dem Chloroform entzogen, das Salz des Indolignons hydrolytisch gespalten und die violette Farbe schlägt in die rotbraune des Indolignons um.

Die durch Säure bedingte Violettfärbung ist außerordentlich empfindlich. Um die Empfindlichkeit festzustellen, habe ich wässrige Lösungen von indoxylschwefelsaurem Kali hergestellt,¹ welche pro Liter 2·6, 1·3, 0·65, 0·325 mg »Indikan« enthielten.

¹ Die Darstellung des indoxylschwefelsauren Kaliums (Indikan) erfolgte nach einem neuen, von mir und E. Schwenck in der »Biochemischen Zeitschrift«, Bd. 68, p. 347, publizierten Verfahren aus N-Acetindoxyl und Chlorsulfonsäure.

Es wurden stets je 10 cm^3 der Lösungen mit 1 cm^3 einer fünfprozentigen alkoholischen Thymollösung versetzt und umgeschüttelt. Hierauf setzte ich 10 cm^3 einer rauchenden Salzsäure, welche 5 g Eisenchlorid pro Liter enthielt, zu, schüttelte mehrmals sorgfältig um und ließ zirka 15 Minuten stehen. Nachher fügte ich 5 cm^3 Chloroform hinzu und extrahierte durch wiederholtes Schütteln den Farbstoff, wobei sich das Chloroform, je nach dem Gehalte der Lösung an Indikan, mehr oder weniger intensiv violett färbte. In einer Lösung, die 0·325 mg Indikan pro Liter enthielt, gab die Thymolprobe noch eine deutliche Reaktion, so daß, da 10 cm^3 verwendet wurden, die unterste Grenze 0·0032 mg Indikan beträgt. Die bekannte Obermayer'sche Reaktion gab in einer Lösung, die 1·3 mg Indikan im Liter enthielt, bereits ein vollkommen negatives Resultat, so daß ceteris paribus die Thymolprobe etwa viermal so empfindlich ist als die Obermayer'sche Reaktion.

Quantitative Bestimmung des indoxylschwefelsauren Kaliums (Indikan).

Der Umstand, daß bei der Thymolreaktion nur ein Produkt resultiert, während alle Methoden, welche auf der Oxydation des »Indikans« zu Indigo beruhen, stets zu Lösungen führen, welche mit größeren oder geringeren Mengen von Indigorot oder Indigobraun verunreinigt sind, legte den Gedanken nahe, die Thymolprobe zu einer quantitativen (kolorimetrischen) Bestimmung des indoxylschwefelsauren Kaliums zu verwenden.

Für eine kolorimetrische Verwendung des Indolignons standen zwei Wege offen.

Man konnte entweder die Chloroformlösung von violetter Farbe, also das salzsaure Salz des Indolignons nehmen oder aber man mußte der Chloroformausschüttelung die Salzsäure entziehen und die rotbraune Lösung des Indolignons verwenden. Beide Wege habe ich versucht und bei Einhaltung der gebotenen Vorsichtsmaßregeln gangbar befunden.

Die Methode, die sich des salzsauren Salzes bedient, erwies sich aber als nicht immer gleich zuverlässig, und zwar

deshalb, weil sich eine Beimengung von Wasser zur Chloroformlösung manchmal nur schwer vermeiden läßt. Es tritt dann aber leicht die erwähnte hydrolytische Spaltung ein und damit auch die Bildung von Zwischenfarben.

Hingegen hat sich folgendes Verfahren gut bewährt:

10 cm^3 der entsprechend verdünnten Indikanlösung werden im Schütteltrichter mit 1 cm^3 einer fünfprozentigen Thymolösung gut vermischt, worauf man die gleiche Menge, also 10 cm^3 , einer rauchenden Salzsäure zusetzt, welche pro Liter 5 g Eisenchlorid enthält. Nach gründlichem Schütteln läßt man zum Zwecke vollständiger Bildung des Indolignons 2 Stunden stehen. Nachher extrahiert man die Flüssigkeit mit je 5 cm^3 reinem Chloroform, und zwar so oft, bis die letzte Ausschüttelung farblos erscheint. Die einzelnen Chloroformextrakte werden in einem zweiten Schütteltrichter aufgefangen und hier mit destilliertem Wasser geschüttelt. Hierbei nimmt die ursprünglich violett gefärbte Chloroformlösung einen rotbraunen Farbenton an.

Zur weiteren Reinigung läßt man hierauf die Chloroformlösung in den ersten Trichter ab, der inzwischen gereinigt und mit sehr verdünntem Alkali (zirka $\frac{n}{500}$ bis $\frac{n}{1000}$) beschickt wurde.

Das Waschwasser im anderen Schütteltrichter extrahiert man noch mit einigen Kubikzentimetern Chloroform, die man dann ebenfalls in den Schütteltrichter mit dem Alkali bringt. Hierauf wäscht man in der gleichen Weise noch einmal mit destilliertem Wasser und läßt nunmehr die Chloroformlösung in ein Kölbchen ab, in welchem sich die mitgerissenen Wassertröpfchen bei zirka zweistündigem Stehen absetzen, worauf man an die eigentliche kolorimetrische Bestimmung gehen kann.

Man bereitet sich eine Standardlösung aus synthetisch gewonnenem 4-Cymol-2-indolindolignon, indem man 0.01 g in 100 cm^3 Chloroform auflöst. Von dieser Stammlösung werden 5 cm^3 mit Chloroform auf 50 cm^3 verdünnt und mit der so erhaltenen Lösung die Chloroformausschüttelung aus der Indikanlösung im Kolorimeter verglichen.

1 cm^3 der Vergleichslösung entspricht 0·01 mg Indolignon, entsprechend 0·0090 mg Indikan.

Zur kolorimetrischen Bestimmung habe ich einerseits das Wolff'sche Kolorimeter benutzt, welches Herr Prof. G. Goldschmiedt mir gütigst zur Verfügung gestellt hat, andererseits einen Apparat, der nach ähnlichem Prinzip hergestellt wurde, bei welchem aber der Inhalt der Röhren nur je 15 cm^3 betrug, was namentlich bei verdünnten Indikanlösungen ein bequemes Arbeiten ermöglichte.

Die Einzelheiten dieses seinerzeit für die kolorimetrische Eisenbestimmung verwendeten Apparates habe ich bereits im Jahre 1898 eingehend beschrieben.¹

Um die Brauchbarkeit der Methode zu prüfen, habe ich aus synthetisch gewonnenem Indikan Lösungen in destilliertem Wasser hergestellt und den Inhalt kolorimetrisch bestimmt.

Die verwendeten Lösungen enthielten im Liter:

Lösung A 0·1332 g Substanz
 » B 0·0666 g »

Da das verwendete Präparat 97·6% Indikan enthielt, waren entsprechend im Liter:

Lösung A 0·1300 g Indikan
 » B 0·0650 g »

Es wurde in 25 cm^3 der Lösung B nach der Methode von Ellinger² (modifizierte Wang-Obermayer'sche Methode) der Indikangehalt quantitativ festgestellt und 1·27 mg statt der vorhandenen 1·63 mg gefunden. Wie Ellinger an reinen Indikanlösungen festgestellt hat, gehen bei dieser Methode nur etwa 85 bis 86% des Indoxyls in Indigo über, so daß man mit einem Fehler von zirka 15% rechnen muß.

Unter Berücksichtigung dieser 15% sind in 25 cm^3 der Lösung B nach Ellinger 1·49 mg vorhanden, welcher Wert dem tatsächlich vorhandenen Indikangehalte von 1·63 mg schon nahe kommt.

¹ Wiener mediz. Presse, Nr. 5 (1898), und Archiv für die ges. Physiologie, Bd. LXV.

² Zeitschrift für physiologische Chemie, 38, 178 (1903).

Aus den Indikanlösungen *A* und *B* wurden je 10 und 5 cm^3 entnommen, die Indikanbestimmung nach der beschriebenen Thymolmethode durchgeführt und die Chloroformausschüttelungen aus den *A*-Lösungen auf 50 cm^3 , aus den *B*-Lösungen auf 25 cm^3 aufgefüllt.

Verglichen wurde mit einer Standardlösung aus reinem Indolignon, die 0·01 g Substanz, entsprechend 0·009 g Indikan in 100 cm^3 enthielt, welche Lösung vor dem Gebrauch auf das Zehnfache verdünnt wurde.

1 cm^3 dieser verdünnten Lösung entspricht 0·009 mg Indikan.

Versuch I. 10 cm^3 der Lösung *A*, Gesamtvolumen der Chloroformausschüttelungen 50 cm^3 . Die kolorimetrische Bestimmung erfolgte im Wolff'schen Kolorimeter. Zylinder I enthielt 25 cm^3 der Standardlösung, entsprechend 0·225 mg Indikan, Zylinder II 25 cm^3 der Ausschüttelung. Da letztere stärker gefärbt erschien als die Standardlösung, wurde von derselben so viel Chloroform abgelassen, bis Farbgleichheit eintrat. Es entsprachen 8 cm^3 der Ausschüttelung 25 cm^3 Standardlösung.

Daher gefunden in 10 cm^3 der Lösung *A* 1·406 mg, berechnet 1·300 mg Indikan.

Versuch II. 5 cm^3 der Lösung *A*, Gesamtvolumen der Chloroformausschüttelung 50 cm^3 . Die kolorimetrische Bestimmung erfolgt im Wolff'schen Kolorimeter. Zylinder I enthielt 25 cm^3 der Standardlösung, entsprechend 0·225 mg Indikan, Zylinder II 25 cm^3 der Ausschüttelung. Es entsprachen 17 cm^3 der Ausschüttelung 25 cm^3 Standardlösung.

Daher gefunden in 5 cm^3 der Lösung 0·662 mg, berechnet 0·650 mg Indikan.

Versuch III. 10 cm^3 der Lösung *B*, Gesamtvolumen der Chloroformausschüttelungen 25 cm^3 . Die kolorimetrische Bestimmung erfolgte in dem kleinen Kolorimeter. Zylinder I enthielt 15 cm^3 der Standardlösung, entsprechend 0·135 mg Indikan, Zylinder II 15 cm^3 der Ausschüttelung. Da der Inhalt des Zylinders II stärker gefärbt erschien als der des Zylinders I, wurde von II so viel Chloroform abgelassen,

bis Farbgleichheit eintrat. Es entsprachen 5.2 cm^3 des Zylinders II 15 cm^3 des Zylinders I.

Daher gefunden in 10 cm^3 der Lösung B 0.6490 mg , berechnet 0.6500 mg Indikan.

Versuch IV. 5 cm^3 der Lösung B, Gesamtvolumen der Chloroformausschüttelung 25 cm^3 . Die kolorimetrische Bestimmung erfolgte im kleinen Kolorimeter. Zylinder I enthielt 15 cm^3 der Standardlösung, entsprechend 0.1350 mg Indikan. Zylinder II enthielt 15 cm^3 der Ausschüttelung. Es entsprachen 15 cm^3 der Standardlösung 10.3 cm^3 der Ausschüttelung.

Daher gefunden in 5 cm^3 der Lösung B 0.3277 mg , berechnet 0.3250 mg Indikan.

In gleicher Weise habe ich in je 8, 6, 4, 2 cm^3 der Lösungen A und B den Indikangehalt kolorimetrisch bestimmt und lasse nachstehend die Resultate tabellarisch folgen:

Anzahl der Kubikzentimeter	Gefunden	Berechnet	Anzahl der Kubikzentimeter	Gefunden	Berechnet
	Indikan in Milligramm			Indikan in Milligramm	
Lösung A			Lösung B		
8	1.120	1.040	8	0.548	0.520
6	0.820	0.780	6	0.382	0.390
4	0.538	0.520	4	0.265	0.260
2	0.255	0.260	2	0.128	0.130

In konzentrierten Lösungen sind die Differenzen etwas größer als in verdünnten Lösungen, es ist aber kein Zweifel, daß bei Verwendung geeigneterer Apparate die Einstellung der Farbnuancen wesentlich schärfer erfolgen könnte.

Jedenfalls geht aus den Versuchen hervor, daß in reinen Indikanlösungen der Indikangehalt nach dem beschriebenen Verfahren kolorimetrisch bestimmt werden kann.

Über die Anwendung dieses relativ einfachen und theoretisch gut begründeten Verfahrens auf Harn, Blut etc. behalte ich mir vor, an anderer Stelle zu berichten.