

Bromometrische Bestimmung des Thionins und seiner Derivate

Von

E. Ružička

Aus dem Institut für Organische Chemie der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Palacký-Universität in Olmütz (ČSSR)

Mit 1 Abbildung

(Eingegangen am 23. August 1962)

Es wurde die Möglichkeit einer Bromierung von Thionin, Methylenblau, Methylengrün und Azur A in Äthanol durch Bromwasser studiert. Es wurden die Verbindungen 2,4,6,8-Tetrabrom-3,7-diamino-phenthiazoniumhydroxyd, 2,4,6,8-Tetrabrom-3,7-tetramethyldiamino-phenthiazoniumbromid und 6,8-Dibrom-4-nitro-3,7-tetramethyldiamino-phenthiazoniumhydroxyd isoliert und beschrieben. Der Verlauf der Bromierung wurde potentiometrisch verfolgt und Bedingungen zur quantitativen Bestimmung gefunden.

Weil Thionin und seine Derivate häufig in der Biologie und Medizin gebraucht werden, wurde ein Verfahren zu deren rascher Bestimmung gesucht. Schon früher wurde auf die Möglichkeit bromometrischer Bestimmung von Thionin hingewiesen¹ und auch eine bromometrische Bestimmung von Thionin im biologischen Material ausgearbeitet². Die Bromierung von Thionin und seinen Derivaten wurde nur wenig studiert. *Gnehm*³ bereitete Brommethylenblau durch Austausch von Brom gegen eine Aminogruppe. Durch eine direkte Einwirkung von Brom auf Methylenblau in essigsäurem Medium bekam er einen undefinierbaren Stoff⁴. Derselbe Autor führt die Bromierung von Äthylblau in Eisessig durch Brom aus, wobei er Monobromäthylblau erhielt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Möglichkeit einer Bromierung durch Bromwasser in Äthanol untersucht, und zwar von Thionin (3,7-Di-

¹ E. Ružička und M. Kotoušek, Z. anal. Chem. **183**, 351 (1961).

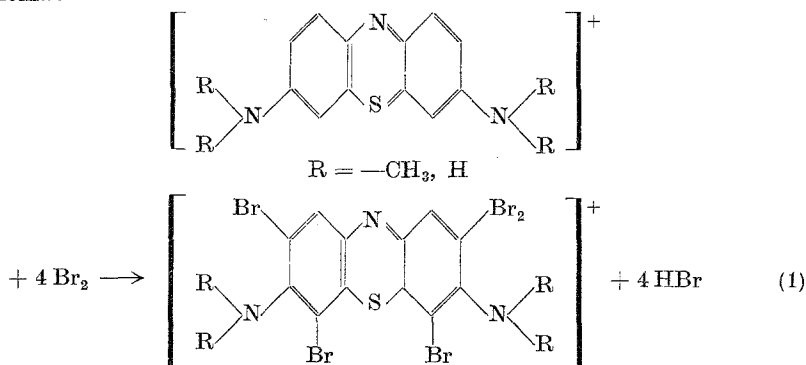
² W. Stewart, J. Assoc. Offic. Agr. Chemists **28**, 693 (1945).

³ R. Gnehm und E. Walder, J. prakt. Chem. [2] **76**, 419 (1907).

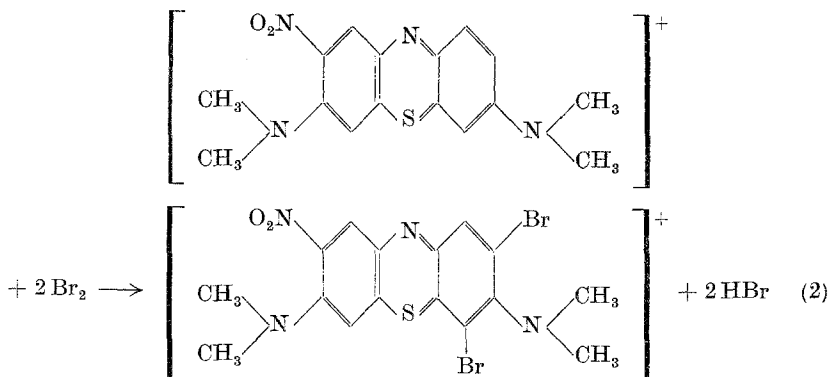
⁴ R. Gnehm, l. c., S. 422.

amino-phenthiazoniumchlorid)⁵, Methylenblau (3,7-Tetramethyldiaminophenthiazoniumchlorid)⁶, Methylengrün (4-Nitro-3,7-tetramethyldiaminophenthiazoniumbromid)⁷ und Azur A (3,7-N,N-Dimethyldiaminophenthiazoniumchlorid)⁸.

Durch Einwirkung von Bromwasser auf Thionin und auf Methylenblau entsteht nach einigen Stunden ein Tetrabromderivat gemäß dem folgenden Schema:



bei Methylengrün entsteht ein Dibromderivat:



Der Verlauf der Bromierung wurde potentiometrisch verfolgt, und es wurde festgestellt, daß nur bei Thionin in verdünntem Äthanol die Bromierung quantitativ gemäß der Gl. (1) verläuft. Bei der Bromierung des Methylenblaus in 96proz. Äthanol bei 20° C wurde gefunden, daß der Verlauf nicht einfach ist und daß beim Bromieren durch Bromwasser in diesem Medium zwei Reaktionen verlaufen (Kurve 2, Abb. 1). Durch Erhö-

⁵ *Ch. Lauth*, Ber. dtsch. chem. Ges. **9**, 1035 (1876).

⁶ *A. Bernthsen*, Ann. Chem. **230**, 73 (1885); Ber. dtsch. chem. Ges. **17**, 611 (1884); **25**, 3128 (1892).

⁷ *R. Gnehm* und *E. Walder*, l. c.³, S. 402.

⁸ *W. J. MacNeal* und *J. H. Kitchell*, J. Amer. Chem. Soc. **48**, 740 (1926).

hung der Temperatur auf 35—40° C bekommt man die potentiometrische Kurve (3), aus der man entnehmen kann, daß es hier einerseits zur Bromierung, andererseits zur Oxydation von Methylenblau kommt⁹. Auch die Potentialeinstellung ist langsam und dauert 7—10 Minuten. Bei der

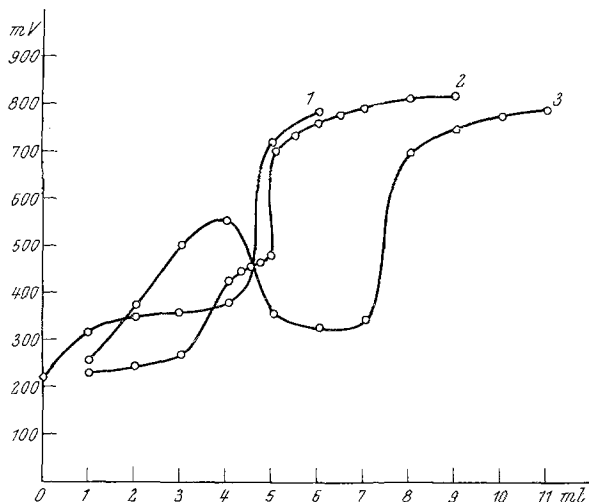
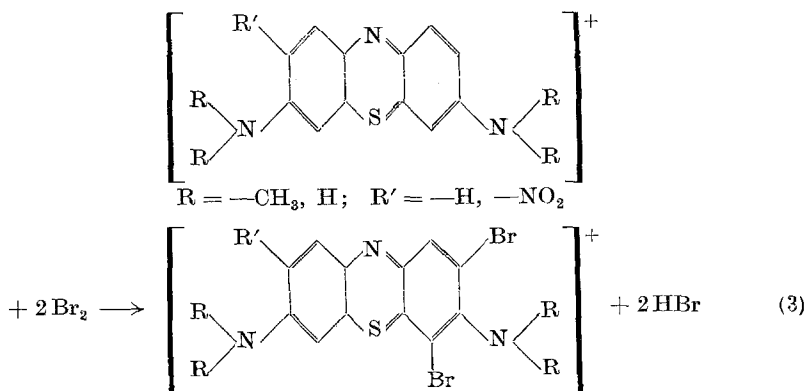


Abb. 1. (1) 10 ml 0,001 m-Lösung von Methylenblau-chlorhydrat in 96proz. Äthanol wurde mit 10 ml dest. Wasser verdünnt und bei einer Temp. von 20° C durch frisch vorbereitetes Bromwasser titriert (1 ml Bromwasser enthielt 0,6808 mg Br). (2) 10 ml 0,001 m-Methylenblau-chlorhydrat-Lösung in 96proz. Äthanol wurde bei einer Temp. von 20—22° C durch frisch vorbereitetes Bromwasser titriert (1 ml Bromwasser enthielt 0,6808 mg Br). (3) 10 ml 0,001 m-Lösung von Methylenblau-hydrochlorid in 96proz. Äthanol wurde durch frisch vorbereitetes Bromwasser bei einer Temp. von 35—40° C titriert (1 ml Bromwasser enthielt 0,6808 mg Br)

Titration von Thionin und Azur A in 96proz. Äthanol wurde nur ein höherer Verbrauch von Bromwasser bemerkt. Quantitativ kann man Thionin, Methylenblau, Methylengrün und Azur A nur in verd. Äthanol (50proz.) in saurem Medium nach folgendem Schema bestimmen:



⁹ E. Ružička, Collect. czechosl. chem. Communic. 24, 2062 (1959).

Die bromometrische Bestimmung kann jedoch nicht bei Anwesenheit von aromatischen Aminverbindungen, Phenolen und Phenoxazonen durchgeführt werden.

Reagentien und Apparate

Die 0,001 m-Stammlösung von Thionin wurde durch Lösen von 0,06593 g Thionin-chlorhydrat (Geigy), dessen Reinheit chromatographisch kontrolliert wurde (s. u.!), in 200 ml siedenden 96proz. Äthanol bereit. Nach Abkühlung auf 20° C wurde die Lösung im Meßkolben auf 250 ml aufgefüllt.

Die 0,001 m-Methylenblaulösung wurde durch Auflösen von 0,09347 g $C_{16}H_{18}N_3S \cdot Cl \cdot 3 H_2O$ (Lachema), dessen Reinheit nach Umkristallisieren aus H_2O chromatographisch kontrolliert wurde (s. u.!) in 250 ml 96proz. Äthanol hergestellt.

Die 0,001 m-Methylengrünlösung wurde durch Auflösen von 0,11132 g Methylengrün-bromhydrat (Lachema), dessen Reinheit nach Umkristallisieren aus H_2O chromatographisch kontrolliert wurde, in 250 ml 96proz. Äthanol bereit.

Die 0,001 m-Lösung von Azur A erhielten wir durch Lösen von 0,02734 g Dimethylthionin-hydrat, welches aus Azur II (Geigy) durch Trennung mittels Säulenchromatographie (auf Al_2O_3 bei Anwendung von System 1) gewonnen wurde. Die Reinheit wurde chromatographisch und durch Analyse kontrolliert.

$C_{14}H_{15}N_3OS$ (289,19). Ber. N 14,52. Gef. N 14,27.

Zu den einzelnen Bestimmungen wurde frisch bereitetes, jodometrisch gestelltes Bromwasser verwendet. Es enthielt bei der Bestimmung von Thionin 0,8151 mg Br_2/ml , von Methylenblau 0,6808 mg Br_2/ml , von Methylengrün 0,8630 mg Br_2/ml , von Azur A 0,6992 mg Br_2/ml .

Die potentiometrischen Messungen wurden mit einem Ionoscop (Laboratoriumsapparate, VE-Betrieb) unter Anwendung einer blanken Platinelektrode und der gesättigten Kalomelektrode durchgeführt.

Chromatographie von Thionin und seiner Derivate

Die Reinheit aller Ausgangsstoffe und der bromierten Produkte wurde mittels Papierchromatographie kontrolliert. Es wurde auf dem Papier Whatman 1 bei $20 \pm 2^\circ C$ gearbeitet. Als Proben wurden gewöhnlich 5 μg Farbstoff (als 0,1proz. Lösung in 96proz. Äthanol oder Pyridin) aufgetragen. Die Detektion wurde im UV-Licht kontrolliert. Als Laufmittel wurden Butanol—Pyridin—Wasser = 5:3:3 (System 1) und Butanol—Eisessig—Wasser = 4:1:5 (System 2) verwendet.

Die Dauer der Entwicklung in beiden Systemen betrug 16 Stdn. Stets wurde Thionin oder Resazurin als Standard mitchromatographiert und die gefundenen R_F -Werte entsprechend korrigiert (Tab. 1).

Bromierungsprodukte der Thiazine

Thionin

0,26 g Thionin-chlorhydrat (Geigy) wird in der gerade notwendigen Menge von 96proz. siedenden Äthanol aufgelöst. Der auf Zimmertemp. abgekühlten Lösung wird langsam unter ständigem Rühren eine Lösung von 0,7 g Brom in 250 ml destill. Wasser zugegeben. Nach 3stdg. Stehen wird der ausgeschiedene dunkelblaue Niederschlag filtriert, mit destill. Wasser und dann mit 20proz. Äthanol durchgewaschen. Das nicht einheitliche Rohprodukt wurde

mittels siedendem 10proz. Äthanol extrahiert; es entstand eine intensiv blaue Lösung, welche mittels 10proz. NH_3 auf $\text{pH} = 8-8,5$ gebracht wurde. Nach etwa 2 Stdn. schied sich ein rotbrauner Niederschlag ab, welcher filtriert, mit Wasser und Äthanol gewaschen und an der Luft getrocknet wurde.

$\text{C}_{12}\text{H}_7\text{Br}_4\text{N}_3\text{OS}$ (560,78). Ber. N 7,49, S 5,71, Br 57,02.

Gef. N 7,89, S 5,60, Br 57,92.

Tabelle 1. R_F -Werte

Verbindung	System I	System II
Thionin	0,65	0,60
Tetrabromthionin.....	0,81	0,66
Methylenblau	0,48	0,51
Tetrabrommethylenblau..	0,90	0,87
Methylengrün	0,585	0,65
Dibrommethylengrün	0,87	0,88
Azur A.....	0,67	0,63

Die Verbindung ist in Anilin violett, in Nitrobenzol rot löslich, teilweise löslich in Aceton (rot) und Methanol (blau); unlöslich in Benzol, Toluol, Butanol, Dioxan, Äthylacetat und Tetrachlorkohlenstoff. Es handelt sich um 2,4,6,8-Tetrabrom-3,7-diamino-phenthiazoniumhydroxyd.

Methylenblau

0,38 g Methylenblau-chlorhydrat (Lachema) wurde bei 65°C in 150 ml 96proz. Äthanol aufgelöst. Nach Abkühlung auf 20°C wurde unter ständigem Rühren nach und nach eine Lösung von 0,8 g Brom in 250 ml destill. H_2O zugegeben. Am Ende der Reaktion begann sich ein rotvioletter Stoff auszuscheiden, welcher nach 4stdg. Stehen abfiltriert, zuerst mit destill. H_2O und dann mit 96proz. Äthanol gewaschen wurde. Er erschien unter dem Mikroskop als violette Nadeln. Durch Trocknung an der Luft, schon bei normaler Temp., veränderte sich die Farbe in dunkelbraun, bei einem wechselndem Wassergehalt. Darum wurde das Salz zur Analyse im Thermostaten bei 105°C getrocknet.

$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{Br}_4\text{N}_3\text{S} \cdot \text{Br}$ (679,7). Ber. N 6,18, S 4,71, Br 58,79.

Gef. N 6,16, S 5,13, Br 58,41.

Das Bromid ist in Anilin gut löslich, schwerer in Methanol, Butanol und Nitrobenzol. Unlöslich ist es in Benzol, Toluol, Aceton und Dioxan. Es handelt sich um 2,4,6,8-Tetrabrom-3,7-tetramethyldiamino-phenthiazoniumbromid.

Methylengrün

0,23 g Methylengrün-bromhydrat (Lachema) wurde in 180 ml 96proz. Äthanol gelöst und unter intensivem Rühren eine Lösung von 0,6 g Brom in 200 ml destill. H_2O hinzugefügt. Es entstand eine kleine Menge violetter Schuppen. Nach 2stdg. Stehen wurde die Lösung mit 5proz. NH_3 auf $\text{pH} = 7,5-8$ eingestellt, wodurch eine rotbraune Lösung entstand, welche mittels Äthylacetat ausgeschüttelt wurde. Der Extrakt wurde eingengt, das Produkt eingemal aus Äthylacetat umkristallisiert und an der Luft getrocknet.

$\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{Br}_2\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$ (504,0). Ber. N 11,12, S 6,36, Br 31,71.

Gef. N 11,72, S 6,23, Br 32,35.

Das 6,8-Dibrom-4-nitro-3,7-tetramethyldiamino-phenthiazoniumhydroxyd ist gut löslich in Anilin (braun), in Aceton (rot), in Dioxan (rot) und in Toluol (rotbraun); teilweise löslich in Nitrobenzol (braun), in Methanol (violettblau) und in Butanol (rot).

Potentiometrische Bestimmung von Thionin und seiner Derivate

Die Titrationen wurden derart vorgenommen, daß zur abgemessenen 0,001 m-Lösung des zu untersuchenden Stoffes in 96proz. Äthanol das gleiche Volumen an destill. H₂O zugefügt wurde sowie unter gründlichem Rühren in Portionen frisch bereitetes Bromwasser. Bei Methylenblau ist es wünschenswert, bei 20° C zu arbeiten. Bei höheren Temperaturen ergeben sich keine reproduzierbaren Werte. Die Potentialeinstellung dauerte ca. 3 Min. Bei der Titration von Thionin ist die Tangentenneigung im Äquivalenzpunkte 246 mV/ml, der Äquivalenzpunkt 640 mV und der pH-Wert im Äquivalenzpunkte 2,4; bei Methylenblau lauten die entsprechenden Werte 624 mV/ml, 558 mV und 2,3; bei Methylengrün 383 mV/ml, 612 mV und 2,5; bei Azur A 349 mV/ml, 568 mV und 2,6.

1 ml 0,01 n-Bromwasser entspricht 0,2838 mg Thionin, 0,7115 mg Methylenblau, 0,8244 mg Methylengrün und 0,6814 mg Azur A.

Die Bestimmung der oben angeführten Verbindungen mittels Bromwasser ist neben aromatischen Aminen, Phenolen und Phenoxazonen, welche auch bromierbar sind, nicht durchführbar.

Eine Übersicht der Ergebnisse ist in der Tab. 2 angeführt.

Tabelle 2

Verbindung	Gegeben mg	Gefunden mg	Fehler mg	%
Thionin	1,136	1,119	— 0,017	— 1,49
	2,272	2,234	— 0,038	— 1,67
	3,408	3,421	0,013	0,38
	4,544	4,512	— 0,032	— 0,70
Methylenblau	2,841	2,863	0,022	0,77
	4,261	4,340	0,079	1,85
	5,682	5,621	— 0,061	— 1,07
Methylengrün	3,292	3,207	— 0,085	— 2,58
	5,038	5,083	0,045	0,89
	6,584	6,678	0,094	1,42
Azur A	1,360	1,328	— 0,032	— 2,64
	2,721	2,684	— 0,037	— 1,35
	4,081	4,192	0,111	2,72

Ich danke Herrn Ing. Z. Stránský für die Ausarbeitung des chromatographischen Teiles meiner Arbeit.