

Eine neue Farbstoffklasse von biochemischer Bedeutung: Triindylmethanfarbstoffe.

Von

Alexander Ellinger und Claude Flamand.

(Aus dem Universitätslaboratorium für medizinische Chemie und experimentelle
Pharmakologie zu Königsberg i. Pr.)

(Der Redaktion zugegangen am 16. August 1909.)

Erhitzt man den β -Indolaldehyd in Substanz oder in wässriger Lösung mit mäßig konzentrierten Säuren, so färbt sich, wie Ellinger¹⁾ vor 3 Jahren mitteilte, die Lösung bald intensiv rot, und nach mehrere Minuten langem Kochen scheidet sich beim Erkalten der Lösung ein in prachtvollen gewundenen Nadeln krystallisierender roter Farbstoff aus. Wir haben gemeinsam die Untersuchung dieses Farbstoffes unternommen und in ihm den ersten Repräsentanten einer bisher nicht beschriebenen Klasse von Farbstoffen kennen gelernt, welche das Interesse des Biochemikers beanspruchen dürfen; denn wie weiter unten ausgeführt wird, stehen einige Farbstoffe des Harns und vielleicht auch andere im Tierkörper gebildete Farbstoffe zu dem neuen Körper in naher Beziehung.

Darstellung und Eigenschaften des Farbstoffs aus Indolaldehyd.

1 g Indolaldehyd wird mit 50 ccm Wasser gekocht, worin es sich nicht vollständig löst; die heiße Flüssigkeit wird mit 50 ccm 50%iger Schwefelsäure versetzt und 10—15 Min. im Sieden gehalten. Mit Beginn des Siedens tritt die Rotfärbung und zunächst vollständige Lösung ein, bald scheiden sich Krystalle ab, die sich beim Abkühlen beträchtlich vermehren. Der nach 24stündigem Stehen abfiltrierte Farbstoff wird in viel siedendem Eisessig gelöst, durch einen Heißwassertrichter fil-

¹⁾ A. Ellinger, Über die Konstitution der Indolgruppe im Eiweiß. III. Mitt.: Oxydation des Tryptophans zu β -Indolaldehyd. Ber. d. deutsch. chem. Ges. Bd. XXXIX, S. 2519, 1906.

triert und scheidet sich daraus beim Stehen in mehr als Zentimeter langen Nadeln ab, welche abgesaugt und zur Entfernung anhaftender Essigsäure mehrmals mit Äther gewaschen werden. Die so gewonnenen Krystalle erinnern in ihrer Farbe, dem metallischen Glanze und dem dunkelgrünen Reflexe im auffallenden Lichte an das Aussehen des Fuchsin. Die Ausbeute an Farbstoff vor dem Umkrystallisieren beträgt etwa 90—100% des Aldehyds. Der Farbstoff färbt in essigsauer-alkoholischer Lösung Wolle und Seide rotbraun mit einem Stich ins Violette.

Die Analyse machte anfangs erhebliche Schwierigkeiten, weil die Substanz äußerst hartnäckig Essigsäure festhält, welche beim Stehen im Vakuum-Exsikkator über Ätzkali nicht weggeht und erst durch Trocknen bei 130—140° vollständig entfernt werden kann. Die so getrocknete Substanz ist sehr hygroskopisch; so sind wohl die etwas zu hoch gefundenen Wasserwerte bei der Verbrennung zu erklären. Die folgenden Analysen sind sämtlich mit Material, welches viermal aus Eisessig umkrystallisiert und bei 130—140° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet war, angestellt.

1. 0,1762 g gaben 0,0735 g H₂O und 0,3837 g CO₂
2. 0,1420 g „ 0,0577 g H₂O „ 0,3087 g CO₂
3. 0,1657 g „ 0,0677 g H₂O „ 0,3635 g CO₂
4. 0,198 g gaben 14,7 ccm N bei 10° und 746 mm Hg
5. 0,221 g gaben in alkoholisch-wässriger Lösung mit BaCl₂ gefällt, 0,1545 g BaSO₄.

Gefunden	1.	2.	3.	4.	5.	Berechnet für (C ₂₅ H ₁₇ N ₃) ₃ · 3 H ₂ SO ₄
C =	59,4	59,29	59,82			59,39
H =	4,63	4,51	4,54			3,95
N =				8,72		8,3
H ₂ SO ₄ =					29,46	29,05

Die Substanz schmilzt nicht scharf; bei 212° beginnt sie zu sintern und zersetzt sich allmählich unter teilweiser Sublimation; sie ist in Wasser fast unlöslich, beim Erwärmen mit Wasser nimmt sie eine bräunliche Färbung an; in Alkohol, Amylalkohol und Aceton löst sie sich auch in der Kälte reichlich, in Essigäther weniger, in Benzol ist sie fast unlöslich, in heißem Eisessig löst sie sich reichlich, in kaltem sehr wenig. Die Lösungen in saurem Alkohol zeigen ein charakteristisches Ab-

sorptionsspektrum: bestehend aus zwei ziemlich breiten Streifen im Grün bis Blau; der schmälere, etwa von der Mitte zwischen den Linien D und E bis F sich erstreckend, tritt bei größerer Schichtdicke allein deutlich hervor, in dünner Schicht ist der breitere, etwa von der Linie Eb bis F ausgedehnt, deutlicher, während der erstbeschriebene unscharf wird.

Verreibt man die Krystalle in der Kälte mit Ammoniak, so schlägt die Färbung sofort je nach der Konzentration in gelb bis braun um, und es entsteht eine krystallisierte Base, welche sich mit Äther ausschütteln läßt. Beim Verdunsten der Ätherlösung oder beim gelinden Erwärmen derselben geht aber die Base in eine unlösliche Modifikation über. Setzt man unter dem Mikroskop Ammoniak zu den Krystallen, so kann man das Eindringen des Alkalis verfolgen. Man erhält dann das merkwürdige Bild eines teils rot, teils gelbgefärbten Krystalls.

Sowohl die Farbsalze wie die Farbbase lassen sich mit Zinkstaub zur Leukoverbindung reduzieren, welche mit Äther ausgeschüttelt werden kann und welche an der Luft langsam, bei Zusatz von Oxydationsmitteln schnell den Farbstoff regeneriert.

Für das Verständnis der Farbstoffbildung gab folgende Beobachtung den Schlüssel: Als das Kochen des Indolaldehyds mit Säuren am absteigenden Kühler vorgenommen wurde, wurden in der Vorlage neben geringen Mengen Indol schweflige Säure und reichlich Ameisensäure gefunden. Das Destillat gab nicht nur die qualitativen Reaktionen: Rotfärbung mit Eisenchlorid in neutraler Lösung, Reduktion von ammoniakalischer Silberlösung und von Sublimat, sondern es konnte durch Kochen mit BaCO_3 auch das Baryumformiat rein dargestellt werden.

Das mehrmals aus Wasser umkrystallisierte Baryumformiat gab folgenden Analysenwert:

0,1725 g exsikkatortrockene Substanz lieferten 0,1768 g BaSO_4

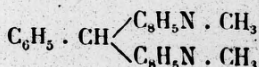
	Ber.	Gef.
Ba =	60,42	60,26.

Konstitution des Farbstoffs.

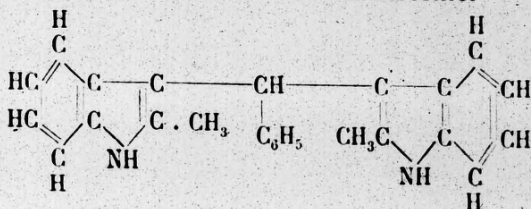
Da die Bildung des Farbstoffs unter Abspaltung von Ameisensäure und partieller Reduktion der Schwefelsäure er-

folgt war, so lag es nahe, anzunehmen, daß sich der Indolaldehyd mit Indol kondensiert und unter Oxydation und Salz- bildung zu dem Farbstoff vereinigt habe. In der Literatur sind bisher ähnliche Kondensationsprodukte der Indole mit Farbstoff- charakter von E. Fischer und Wagner¹⁾ unter dem Namen der Rosindole und von M. Freund und Lebach²⁾ beschrieben.

Nach Fischer³⁾ vereinigt sich z. B. der Benzaldehyd mit 2 Molekülen α -Methylindol (Methylketol) zu dem Benzylidendi- ketol

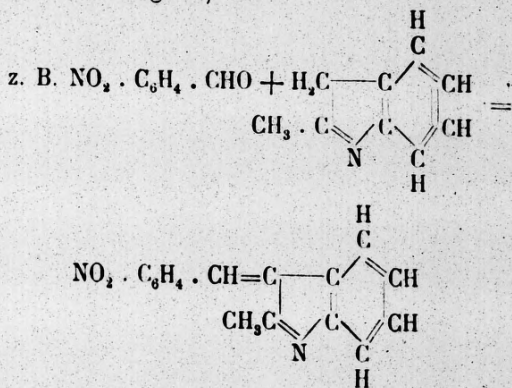


welchem wahrscheinlich die Konstitutionsformel



zukommt.

Neben dieser Art von Kondensation kommt, wie Freund und Lebach zeigten, auch eine solche zwischen einem Molekül Aldehyd und einem Molekül eines Indols, welches dann nach der Indoleninform reagiert, vor:

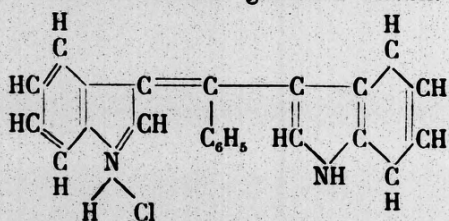


¹⁾ E. Fischer und P. Wagner, Über Rosindole. Ber. d. deutsch. chem. Ges. Bd. XX, S. 815, 1886 und Ann. d. Ch. Bd. CCXLII, S. 372, 1887.

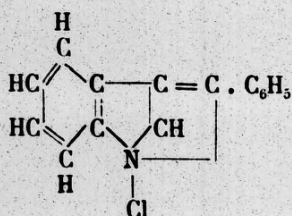
²⁾ M. Freund und G. Lebach, Über Indolfarbstoffe. Ber. d. chem. Ges. Bd. XXXVIII, S. 2640, 1905.

³⁾ E. Fischer, Über einige Reaktionen der Indole. Ber. d. chem. Ges. Bd. XIX, S. 2988, 1885.

Beide Verbindungstypen sind als Leukobasen von Farbstoffen zu betrachten; unter Einwirkung von Oxydationsmitteln gaben die Verbindungen des ersten Typus mit Säuren meist rote, die des zweiten Typus blaue Farbstoffe, für deren einfachsten Repräsentanten Freund und Lebach unter der Annahme chinoider Bindungen, welche durch Übergang der Indol- in die Indoleninform zustande kommen können, die folgenden Formeln wahrscheinlich gemacht haben.

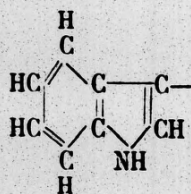


salzsaures Phenyl-indyl-indoliden-methan

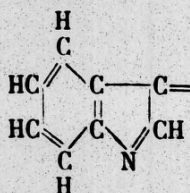


Anhydrid des Chlorhydrats des Phenyl-indoliden-carbinols.

Zu der Nomenklatur sei bemerkt, daß unter „Indyl“ der einwertige Rest



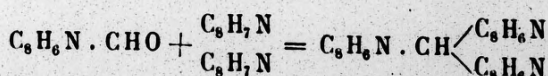
unter „Indoliden“ der zweiwertige Rest



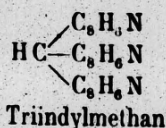
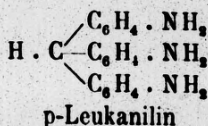
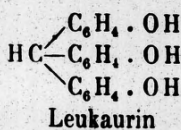
verstanden wird.

Die Einzelheiten in der Konstitution der genannten Farbstoffe sind noch nicht mit Sicherheit festgestellt, denn die „blauen Farbstoffe“ konnten bisher nicht krystallisiert gewonnen und analysiert werden, und auch für die Konstitution der Rosindole, auf deren nahe Verwandtschaft mit den Triphenylmethanfarbstoffen Fischer bereits hingewiesen hat, ist die Vereinigung des Methan-C-Atoms mit den in β -Stellung befindlichen C-Atomen des Pyrrolrings nur wahrscheinlich gemacht.

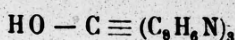
Nach den geschilderten, bereits studierten Farbstoffbildungen aus aromatischen Aldehyden und Indolen liegt es am nächsten, anzunehmen, daß der Farbstoff aus dem Indolaldehyd sich von einer Leukoverbindung ableitet, welche aus Indolaldehyd mit 2 Molekülen Indol zusammengetreten ist, also einem Triindylmethan.



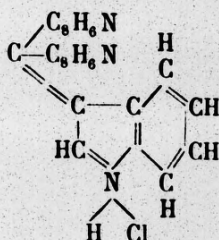
Es liegt somit eine vollkommene Analogie mit dem Leukaurin und dem p-Leukanilin vor:



Der Farbbase würde somit die Formel



zukommen und dem salzsauren Farbstoff unter Annahme einer chinoiden Bindung die Formel:



Der beim Erhitzen von Indolaldehyd mit Salzsäure entstehende Farbstoff, für den ein geeignetes Umkrystallisationsmittel bisher nicht gefunden wurde, beginnt bei 172° zu sintern, zersetzt sich allmählich und erscheint bei etwa 220° im

Schmelzröhrchen als homogene Flüssigkeit. Im Gegensatz zum schwefelsauren Salz tritt nur 1 Mol. HCl in das Molekül ein.

0,2388 g nicht umkrystallisierte, über KOH im Exsikkator getrocknete Substanz gab 0,0928 g AgCl

$C_{25}H_{17}N_3$, HCl: Ber: HCl 9,23% Gef. 9,90%.

Wie bei den Rosanilinen kommen also auch bei unserer Farbbase Salze mit 1 und mit 3 Äquivalenten Säure vor. Die Tatsache, daß auch das zweite und dritte Indolmolekül Säure zu binden vermögen, spricht dafür, daß auch diese in der stärker basischen Indoleninform auftreten.

Der Base selbst, welche auf Zusatz von Ammoniak aus den Salzen entsteht, scheint die Anhydridformel zuzukommen. Trotz vielfacher Bemühungen haben wir bei der Elementaranalyse der aus der Ätherlösung durch spontanes Verdunsten erhaltenen Base keine scharf stimmenden Zahlen erhalten können. Die Werte lagen vielmehr zwischen den für die Anhydridformel $C_{25}H_{17}N_3$ und die Carbinolformel $C_{25}H_{19}N_3O$ verlangten. Die gleichen Erfahrungen haben v. Baeyer und Villiger¹⁾ mit der sogen. Homolkaschen aus Parafuchsin gemacht.

Synthese des Farbstoffs aus Indol und Methanderivaten.

War unsere Annahme von der Konstitution des Farbstoffs richtig, so mußte man erwarten, daß er ähnlich wie die Farbstoffe der Triphenylmethanreihe auch durch Zusammentritt eines Methankohlenstoffs mit 3 Molekülen Indol unter dem Einfluß von Oxydationsmitteln entstehen mußte.

In der Tat läßt sich der Farbstoff durch Erhitzen von Ameisensäure oder Oxalsäure und Schwefelsäure mit Indol bei Gegenwart von Eisenchlorid darstellen. Auch andere Träger des Methankohlenstoffs wie Formaldehyd u. a. lassen sich zur Darstellung des Farbstoffs verwenden. Er ist indessen so gewonnen schwer zur Krystallisation zu bringen; wir be-

¹⁾ A. v. Baeyer und V. Villiger, Dibenzalaceton und Triphenylmethan. Ber. d. chem. Ges. Bd. XXXVII, S. 2848 (1904).

schränkten uns deshalb darauf, das entstandene Produkt spektroskopisch zu identifizieren.

Dagegen gelang die Reindarstellung des Farbstoffs aus dem Produkt der Einwirkung von Chloroform und alkoholischer Kalilauge auf Indol. Wie Ellinger in der Beschreibung der Synthese des Indolaldehyds (l. c.) angeführt hat, bilden sich neben diesem Produkte und dem β -Chlorchinolin bei der Reaktion beträchtliche Mengen eines Harzes, welches seinerzeit nicht näher untersucht wurde. Als wir von diesem Harze, das noch in ansehnlicher Quantität von früheren Darstellungen her aufgehoben war, ein wenig in Alkohol lösten und in Schwefelsäure gossen, fiel sofort ein schön roter Farbstoff amorph aus, der das charakteristische Spektrum zeigte. Die Reindarstellung gelang auf folgende Weise:

Das Harz wurde unter Erwärmen in viel Alkohol gelöst, filtriert und die erkaltete alkoholische Lösung in feinem Strahle unter beständigem Umrühren in die vier- bis fünffache Menge 20%iger Schwefelsäure gegossen. Der Niederschlag wurde abfiltriert und, etwa 24 Stunden auf Tontellern ausgestrichen, getrocknet. Der so von einem Teil der anhaftenden wässerigen Schwefelsäure befreite Farbstoff wurde mit etwa der 10fachen Menge Essigäther, dem 5% Eisessig zugesetzt waren, gelinde erwärmt, wobei er nicht vollständig in Lösung ging. Schon nach einigen Minuten schieden sich an der Grenze der Essigäther- und der wässerigen Schicht Krystalle aus, deren Menge beim Stehen erheblich zunahm. Die Krystalle wurden abfiltriert und mehrmals aus heißem Eisessig umkrystallisiert. Sie erwiesen sich in allen Eigenschaften mit dem Farbstoff aus Indolaldehyd identisch.

1. 0,194 g Substanz, bei 130° getrocknet, gaben 0,0715 g H_2O und 0,4200 g CO_2 .

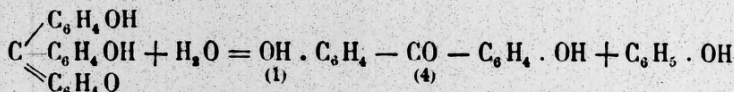
2. 0,1755 g Substanz verbrauchten bei der N-Bestimmung nach Kjeldahl 10,25 ccm $n/10-H_2SO_4$.

3. 0,2025 g Substanz gaben 0,138 g $BaSO_4$.

Gefunden:	C = 59,05	Ber. 59,39
	H = 4,09	3,95
	N = 8,18	8,3
	$H_2SO_4 = 28,63$	29,05

Spaltung der Farbbase.

Wie Caro und Graebe¹⁾ gezeigt haben, läßt sich Aurin durch Erhitzen mit Wasser in p-Dioxybenzophenon und Phenol spalten:



Wir hofften durch einen ähnlichen Spaltungsversuch vielleicht Aufschlüsse über die Bindungsverhältnisse im Triindylmethanfarbstoff zu gewinnen. Das Resultat war nicht das erwartete: Statt eines Diindylketons entstand der β -Indolaldehyd neben Indol. Es muß also mit der hydrolytischen Spaltung gleichzeitig eine Reduktion eingetreten sein, zu welcher die beobachtete Entstehung kohligter Substanz Veranlassung gegeben haben kann.

Ungefähr 2,5 g Farbbase, welche durch Verreiben des Farbstoffs mit Ammoniak gewonnen waren, wurden im Autoklaven mit 100 ccm Wasser 2 Stunden auf 220° im Ölbad erhitzt. Die wässrige Lösung wurde heiß vom Ungelösten abgossen, und der Rückstand noch zweimal je 4 Stunden mit 100 ccm Wasser in der gleichen Weise behandelt. Die vereinigten wässrigen Lösungen, welche stark nach Indol rochen und beim Erkalten einen krystallinischen Niederschlag fallen ließen, wurden im Dampfstrom destilliert, bis das Destillat keine Nitrosoindolreaktion mehr gab. Das Destillat wurde mit Äther erschöpfend ausgeschüttelt. Der krystallinische Ätherrückstand wog etwa 0,35 g. Er wurde aus Wasser umkrystallisiert und durch Krystallform, Schmelzpunkt und die zahlreichen bekannten Farbreaktionen als reines Indol erkannt. Die im Kolben zurückgebliebene wässrige Lösung schied während der Destillation ein wenig Harz ab, von welchem abfiltriert wurde. Beim Erkalten krystallisierten lange, gelb gefärbte Nadeln aus, welche nach einmaligem Umkrystallisieren bei 190° schmolzen. Die Ausbeute betrug 0,25—0,3 g — Von einer Entfärbung wurde wegen der dabei unvermeidlichen Verluste abgesehen.

¹⁾ H. Caro u. C. Graebe. Zur Kenntnis der Rosolsäuren Ber. d. chem. Ges. Bd. XI, S. 1348 (1878).

0,1813 g Subst. (bei 105° getrocknet) geben 0,0832 g H₂O und 0,4959 g CO₂.

C ₉ H ₇ NO:	Ber. C 74,48	Gef. 74,60
	H 4,88	5,09

Die Substanz, welche mit Säure erhitzt den krystallisierten Farbstoff bildete und ein krystallinisches Phenylhydrazon gab, erwies sich also als reiner Indolaldehyd.

Über Abkömmlinge des Triindylmethanfarbstoffs.

Wir haben bisher nur die Stammsubstanz der Triindylmethanfarbstoffe einer eingehenden Untersuchung unterzogen, hoffen aber bald weitere Repräsentanten der neuen Farbstoffklasse beschreiben zu können. Plancher und Ponti,¹⁾ welche genau nach dem Verfahren von Ellinger arbeitend, aus α -Methylindol den Methylindolaldehyd dargestellt haben, gaben bereits an, daß auch dieser, mit Säuren erhitzt, einen schön krystallisierenden Farbstoff gibt. Wir können die Angabe bestätigen und hinzufügen, daß auch dieser Farbstoff unter Abspaltung von Ameisensäure sich bildet.

Weiterhin gelingt es leicht, durch Kondensation von Indolaldehyd mit verschiedenen Indolderivaten in Eisessiglösung unter Zusatz von H₂SO₄ Farbstoffe zu erhalten. Die Reaktion beschränkt sich nicht auf die Homologen des Indols, wie das Skatol, sondern ist auch auf Indolcarbonsäure und Indolessigsäure anwendbar. Auch aus Oxalsäure, Schwefelsäure und Skatol ist ein blauvioletter Farbstoff zu gewinnen, und man kann die Verschiedenheit der Farbtöne bei dieser Reaktion ebenso gut zur Differenzierung von Indol und Skatol benutzen wie die Ehrlichsche Dimethylaminobenzaldehyd-Reaktion.

In die Klasse der Triindylmethanfarbstoffe gehört zweifellos auch das Urorosein, welches nach den schönen Untersuchungen von Herter²⁾ das Produkt der Einwirkung von Säure

¹⁾ G. Plancher e U. Ponti, Azione del cloroformio sull' α -metilindolo e su alcuni pirroli. Rendiconti della R. Accad. dei Lincei. Bd. XVI. ser. 5^a, S. 130 (1907).

²⁾ C. A. Herter. On indolacetic acid as the chromogen of the „urorosein“ of the urine. Journ. of biol. chem. Bd. IV, S. 253 (1908).

und Nitriten auf Indolessigsäure ist. Der Eine von uns (E.) hat in Gemeinschaft mit O. Riesser Untersuchungen dieses Harnfarbstoffs im Gange.

Mit Wahrscheinlichkeit darf auch der rote Farbstoff, der beim Ansäuern des Urins nach Skatoldarreicherung auftritt, das sogen. „Skatolrot“, in die neue Farbstoffgruppe gerechnet werden, ein Farbstoff, der in der medizinisch-chemischen Literatur bereits die mannigfachsten Interpretationen erlebt hat. Herr Professor Jaffé hat bereits vor Beginn unserer Arbeit das Studium des Skatolfarbstoffs begonnen und ist zurzeit damit noch beschäftigt.

Vielleicht wird die Auffindung der Triindylmethanfarbstoffe auch in weitere Gebiete der tierischen und eventuell auch pflanzlichen Farbstoffe mit neuer Fragestellung vorzudringen gestatten. Wir denken hier namentlich an das Studium der Melanine. Bei der Leichtigkeit, mit welcher das Tryptophan zu Indolaldehyd oxydiert wird und der Aldehyd sich mit andern Substanzen zu Farbstoffen kondensiert, ist jedenfalls die Bildung solcher Farbstoffe im tierischen und pflanzlichen Leben höchst diskutabel. Mit diesen hypothetischen Andeutungen soll nur die Richtung bezeichnet sein, in welcher wir die Arbeit über die Triindylmethanfarbstoffe nach der biochemischen Seite hin fortzusetzen beabsichtigen.
