

Über die roten vom Indol sich ableitenden Harnpigmente.

II. Mitteilung.

Von
Prof. A. Benedicenti.

(Aus dem Institut für experimentelle Pharmakologie der Universität Messina.)
(Der Redaktion zugegangen am 3. September 1909.)

Bei früheren im hiesigen Laboratorium angestellten Untersuchungen¹⁾ über das Verhalten im Organismus der Derivate des Indols wurde beobachtet, daß aus allen C-alkylierten Derivaten des Indols (Skatol, α -Methylindol, α - β -Dimethylindol, Trimethylindol, β -Äthylindol, Bz. 3 · Pr. 2 · Dimethylindol) sich ein roter Harnfarbstoff darstellen läßt; das Indigotin dagegen oder demselben analoge Körper können nur aus solchen Indolabkömmlingen gewonnen werden, in welchen die Wasserstoffatome der beiden Methingruppen unsubstituiert geblieben sind. In diesem letzteren Falle geht allem Anschein nach die Oxydation der Methingruppe \equiv CH zum Carbinolradikal \equiv C · OH und die Kondensation des Indoxyls zu dem Doppelmolekül des Indigotins wohl leichter vonstatten, während man sich vorstellen könnte, daß bei C-alkylierten Derivaten größere Hindernisse der Oxydation sich in den Weg legen, so daß dieselbe bei der ersten Phase stehen bleibt, wodurch Oxydationsprodukte des halben Moleküls, d. h. des Indoxyls, zustande kommen. Wenn das zutrifft, sollten nach meiner Voraussetzung Indol-derivate, die im Benzolkern alkyliert sind, im Harne ebenfalls Indigo erzeugen und das ist wirklich der Fall, wie ich kürzlich

¹⁾ Cuttitta, Sull' azione fisiologica e comportamento nell' organismo dell' indolina e suoi derivati. Giornale R. Accad. med. Torino. Vol. XIII, anno LXX.

²⁾ Benedicenti, Über ein grünes, vom Indol sich ableitendes Harnpigment. Diese Zeitschrift, Bd. LIII, S. 481.

habe konstatieren können,¹⁾ als ich Bz. 3 Methylindol und α -Naphthindol Kaninchen und Hunden verabreichte.

Nachdem bewiesen wurde, daß die blauen, sowie die grünen Harnpigmente als Indigo und Indigoderivate zu betrachten sind,²⁾ blieben noch die roten Harnfarbstoffe zu studieren, welche ihre Quelle in den C-alkylierten Derivaten des Indols finden. Bezüglich der chemischen Natur der roten Harnpigmente sind bereits Untersuchungen verschiedener Autoren vorhanden, die jedoch nicht zu übereinstimmenden Schlußfolgerungen geführt haben. Ich will hier nur die Arbeit von Porcher und Hervieux³⁾ erwähnen, die das Verhalten des Skatols im Organismus untersucht haben und die Existenz des Skatoxyls in Abrede stellen, indem sie behaupten, daß das Skatolrot mit dem Urorosein von Nencki und Rosier gleich zu stellen ist, und die Arbeit von Größer, welcher dagegen das Harnpigment als ein wirkliches Skatolderivat betrachtet und bestätigt, daß, wenn man das Pigment aus dem Harn isoliert und mit Zinkstaub destilliert, man ein Destillationsprodukt gewinnen kann, welches nach Skatol riecht.

Für meine Untersuchungen⁴⁾ wählte ich das Methyketol (α -Methylindol), weil es im Handel am leichtesten zu bekommen ist.

Wenn man eine alkoholische Lösung dieses Stoffes für einige Zeit der Luft aussetzt, so ändert sie sich und nimmt nach und nach eine rote Färbung an.

¹⁾ Benedicenti, Sui pigmenti orinari d'origine indolica. Festschrift für Herrn Prof. O. Schmiedeberg, S. 64.

²⁾ Cuttitta, Sul N-dimetilindaco o verde d'indaco. Giorn. R. Accad. medicina di Torino. Vol. XIV, anno LXXI.

³⁾ Porcher et Hervieux, Compt. rend. Société Biol., Bd. CXXXVIII, S. 1725.

⁴⁾ Bei diesen Untersuchungen wurde ich durch die tätige Mitwirkung des Herrn Dr. Salvatore Cuttitta, dem ich das Studium einiger Fragen über das Verhalten der Indolabkömmlinge im Organismus anvertraut hatte, oft unterstützt. Einige Daten dieser Arbeit sowie viele andere, die leider verloren gegangen sind, hätte er selbst veröffentlicht, wenn die Katastrophe von Messina, die ihn tötete, nicht das Leben eines jungen Mannes, der die Wissenschaft mit der größten Begeisterung liebte, plötzlich zerstört hätte.

Nicht alle C-alkylierten Derivate des Indols verhalten sich in dieser Hinsicht gleich; einige werden entweder nicht rot an der Luft, oder färben sich sehr langsam, andere dagegen, wie z. B. Trimethylmethylenindolin, färben sich schon nach kurzer Lufteinwirkung so intensiv, daß es schwer ist, sie im reinen Zustande zu bewahren. Ist vielleicht dieses rote Pigment die Ursache der roten Färbung, welche man bekommt, wenn die C-alkylierten Derivate des Indols mit rauchender Salzsäure und Calciumhypochlorit behandelt werden? Und im bejahenden Falle, ist dieses Pigment identisch demjenigen, welches man aus dem Harn solcher Tiere erhält, denen man die Indolderivate entweder per os oder durch subcutane Injektion einführt?

Einen Ausgangspunkt für solche Erörterungen scheint mir der Versuch von Porcher zu bilden. Dieser Autor beobachtete, daß, wenn man Hunden und Kaninchen Methylketol darreicht, man im Harne keine Spur von dieser Substanz nachweisen kann. Man muß demnach zu dem Schlusse kommen, daß der Farbstoff, welchen man aus dem Harn erhält, nicht direkt von dem unveränderten Methylketol, sondern von einem anderen ähnlichen Stoffe her stammt. Man weiß noch nichts Genaues über die verschiedenen Oxydationsstufen der Indolderivate, aber es ist wohl wahrscheinlich, daß sich dieses erste Umwandlungsprodukt auch als Durchgangsprodukt bildet, wenn man Methylketol in vitro der Oxydation unterwirft; in jedem Fall ist es sicher, daß es sich nicht nur im Organismus bildet, sondern auch, wenn man Methylketol in vitro mit frischem Harn mischt, wie folgender Versuch erläutert.

Man bringt in vier Gefäße je 100 ccm Harn, fügt zu ihnen 0,01, 0,02, 0,03, 0,05 g Methylketol hinzu und hält sie dann 36 Stunden bei gleichmäßiger Temperatur eines Bratofens von etwa 40° C. Die Harne werden jetzt vom Methylketol befreit und zu diesem Zwecke mit Äther ausgezogen und zwar so lange, bis der Ätherauszug sich weder mit Salzsäure und Calciumhypochlorit, noch mit Furfurol und Vanillin¹⁾ mehr färbt. Hierbei beobachtete ich, daß der Äther aus dem Inhalt

¹⁾ Cuttitta. Il comportamento degli indoli colle aldeidi a proposito della reazione di Konto. Arch. farmac. e scienze affini, 1907—1908.

des ersten Gefäßes nichts aufnahm, aus dem zweiten extrahierte er nur eine kleine Menge unverändertes Methylketol, aus den anderen ziemlich erhebliche Mengen. Die so extrahierten Harne gaben bei Erwärmen mit Salzsäure und nach Zusatz einiger Tropfen eines beliebigen Oxydationsmittels (wie Wasserstoffsuperoxyd, Calciumhypochlorit) eine intensive rote Färbung, identisch mit derjenigen, welche man aus dem Harn der Tiere erhält, denen man Methylketol eingeführt hat.

Wenn ich den Harn durch Wasser ersetzte, konnte ich mich überzeugen, daß die Bildung des Chromogens wirklich durch die Wirkung des Harnes und nicht durch diejenige des Sauerstoffes der Luft bewirkt worden war. Das gleiche Resultat erhielt man, wenn man Skatol, Äthylindol, Bz. 3-Pr. 2-Dimethylindol statt des Methylketols nimmt.

Wir können daraus schließen:

1. Das den Tieren verabreichte Methylketol geht nicht unverändert in Harn über.

2. Im Harn findet sich statt dessen ein Chromogen, das fähig ist, ein rotes Pigment zu liefern, wenn es mit Salzsäure und Calciumhypochlorit oxydiert wird.

3. Das Chromogen bildet sich auch, wenn man Methylketol mit Harn in Berührung läßt.

4. Wie Methylketol verhalten sich auch die anderen C-alkylierten Indolderivate.

5. Es ist wohl möglich, daß das rote Pigment, welches man durch Oxydation des Methylketols erhält, mit demjenigen des Harns identisch ist.

Um diesen letzten Punkt aufzuklären, schritt ich dazu, das Verhalten des Methylketols bei der Oxydation mit Salzsäure und Calciumhypochlorit zu studieren. In dieser Hinsicht besitzen wir noch gar keine Daten, obwohl die Wirkung anderer Oxydationsmittel auf Methylketol bereits untersucht worden ist.

5 g Methylketol wurden mit 150 ccm Wasser und 50 ccm rauchender Salzsäure bis zur vollständigen Lösung erwärmt. Wenn man tropfenweise eine konzentrierte Lösung von Calciumhypochlorit in diese Flüssigkeit fallen läßt und gleichzeitig bis

zum Siedepunkt erhitzt, bemerkt man leicht, daß dort, wo die Hypochloritlösung einfällt, die Flüssigkeit eine schöne grüne Färbung annimmt, die aber fast sofort verschwindet, um ins Rot überzugehen. Wenn man diese Erscheinung genauer betrachtet, kann man folgendes beobachten:

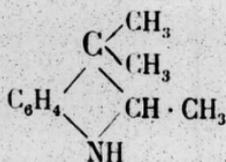
1. Das grüne Pigment, welches einen Übergang zum roten Pigment darstellt, erhält man nicht nur, wenn man das Methylketol mit Ca-Hypochlorit behandelt, sondern auch wenn es mit Kaliumhypobromit, Bromwasser, Kaliumpermanganat oxydiert wird.

2. Wenn man aber diese Oxydationsmittel durch Ferrichlorid ersetzt, bemerkt man die grüne Farbe nicht, sondern sofort die rote.

3. Dieselben Resultate erzielt man, wenn Trimethylindol, Bz · 3-Pr · 2-Dimethylindol, Pr 2-methyl-, α -Naphthindol und wahrscheinlich auch die anderen C-alkylierten Derivate des Indols der Oxydation unterwirft.

4. Die grüne Färbung, welche, wie schon erwähnt, fast sofort verschwindet, um in Rot überzugehen, kann man viel beständiger erhalten, indem man das Methylketol bei niedriger Temperatur der Oxydation unterwirft. Durch Abkühlen mittels einer Kältemischung wird der Farbumschlag verhindert: die Lösung färbt sich grün; grüne Flöckchen scheiden sich ab und bleiben so lange unverändert, als die Temperatur sich sehr niedrig erhält.

Diese erwähnten Tatsachen können das Verhalten des Trimethylindolins im Organismus



gut erklären. Cuttitta hatte schon beobachtet, daß man beim Behandeln des Harns der Tiere, denen Trimethylindolin zugeführt war, mit neutralem Bleiacetat, Oxydation des Filtrats mit Calciumhypochlorit und Salzsäure eine grüne Färbung erhält, die aber fast sogleich verschwindet, um in Rot überzugehen. Da man diese grüne Färbung aus dem Harn der Tiere,

denen Methylketol gegeben wurde, nicht erhält, so muß man schließen, daß beim Trimethylindolin, welches nicht unverändert in den Harn übergeht, die Oxydation im Organismus sich vielleicht auf die ersten Stufen beschränkt, während sie beim Methylketol so weit fortschreitet, daß der Übergang zum grünen Pigment schon im Organismus stattfindet. Diese Widerstandsfähigkeit des Trimethylindolins gegen die Oxydation findet sich dadurch bestätigt, daß der Harn, dem diese Substanz beigemischt wurde, sie nicht verändert, wie dies beim Methylketol der Fall ist, und findet vielleicht auch eine Erklärung in der Tatsache, daß im Trimethylindolin der Pyrrolkern durch die Methylgruppen mehr geschützt ist, als beim Methylketol. Der allgemeine Schluß aber, den wir aus allen diesen Tatsachen folgern können, ist der, daß, ebenso wie die Derivate des Indols sich gegenüber dem Sauerstoff der Luft und den Oxydationsmitteln verschieden verhalten, auch im Organismus eine Verschiedenheit obwaltet, da einige leichtere, andere tiefere Veränderungen erleiden.

Wenn wir nun die grüne Farbe unberücksichtigt lassen und die Oxydation des Methylketols weiter fortsetzen, dann scheidet sich, wie schon erwähnt, das rote Pigment in Form roter Flöckchen ab. Man läßt die Mischung noch für kurze Zeit sieden und gießt nach dem Erkalten die helle gelbe Flüssigkeit vom Niederschlag ab. Die so erhaltene Substanz wird dann mit destilliertem Wasser zum Sieden erhitzt, um sie von der hinzugesetzten Salzsäure völlig zu befreien, darauf heiß abfiltriert. Nach mehrmaligem Waschen mit Wasser und an der Luft getrocknet, stellt sie sich als ein rotes Pulver dar. Um dieses Pigment weiter zu reinigen, habe ich es zuerst mit siedendem Benzol am Rückflußkühler behandelt, worin Methylketol und andere Verunreinigungen sich leicht lösen, und dann in Essigsäure gelöst. Aus dieser Lösung wurde es durch Wasser in amorphen Flocken gefällt, filtriert, mit Wasser ausgewaschen und getrocknet. Das so erhaltene Produkt stellt ein rotbraunes, metallisch glänzendes Pulver dar. Auf dem Platinbleche verbrennt es sehr schwer und hinterläßt keine Asche. In Alkohol und Eisessig ist es sehr löslich, ebenso in Aceton und Anilin; sehr wenig löslich in Benzol; unlöslich in

Toluol und Xylol. In konzentrierter Salzsäure löst sich das Pulver nicht, wohl aber in konzentrierter Schwefelsäure. Bei fortgesetztem Kochen mit Alkalien wird es hellgelb; in Ammoniak und Natronlauge löst es sich ziemlich schwer; aus beiden Lösungen wird es durch Salzsäure in roten amorphen Flocken gefällt. Trotz aller Sorgfalt wollte es mir nicht gelingen, den Farbstoff aus irgend einem seiner Lösungsmittel krystallinisch zu erhalten.

Der so beschriebene Farbstoff scheint dem Indigorot sehr ähnlich zu sein, welches Niggeler¹⁾ nach Isatinfütterung erhielt.

Das von mir dargestellte Harnpigment reduziert in hohem Maße ammoniakalische Lösung von Silbernitrat und enthält Chlor in seinem Molekül. Da die Versuche, die ich anstellte, um das Chlor zu bestimmen, nicht zu einem günstigen Erfolg führten, so habe ich vorgezogen, die Substanz nach der Entziehung des Chlors zu analysieren. Zu diesem Zwecke löste ich zunächst das rote amorphe Pulver in Alkohol. Die Lösung wurde auf dem Wasserbad schwach erwärmt, indem ich nach und nach kleine Stücke Natrium hineinfallen ließ und die Erwärmung der Lösung am Rückflußkühler für die Dauer einer Stunde fortsetzte. Der Rückstand aus der alkoholischen Lösung wurde dann mit Wasser aufgenommen, filtriert und nach mehrmaligem Waschen mit siedendem Wasser in Essigsäure gelöst, aus der Lösung mit Wasser gefällt und endlich an der Luft getrocknet.

Nach dieser sorgfältigen Reinigung stellt sich das Produkt als ein Pulver dar, welches kein Chlor im Molekül enthält und dabei ganz die Eigenschaften der ursprünglichen Substanz besitzt. Wenn man dieses Pulver der Destillation mit Zinkstaub unterwirft, erhält man ein gelbes Öl von schwachem, an Indol erinnerndem Geruch, welches ich aber nicht in genügender Quantität habe erhalten können; um eine Analyse vorzunehmen. Die Analyse des Pigmentes gab die folgenden Zahlen:

1. 0,2682 g Substanz ergaben 0,1655 g H₂O und 0,7461 g CO₂.

0,3017 g Substanz ergaben 19 ccm Stickstoff bei 22° und bei einem Druck von 744,7 mm bei 0°.

¹⁾ Niggeler, Harnfarbstoffe aus der Indigogruppe. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol., Bd. III, S. 67.

II. 0,2692 g Substanz ergaben 0,1668 g H₂O und 0,7491 g CO₂.

0,1900 g Substanz ergaben 12,58 ccm Stickstoff bei 26° und bei einem Druck von 748,73 mm bei 0°.

III. 0,4317 g Substanz ergaben 29,80 ccm Stickstoff bei 21,5° und bei einem Druck von 758,22 mm bei 0°.

Gefunden in Prozenten.

	I.	II.	III.	Mittel.
C =	75,87	75,56	—	75,71
H =	6,79	6,81	—	6,80
N =	6,98	7,23	7,76	7,32
O =	10,36	10,40	—	10,38

Aus den gefundenen Prozentzahlen berechnet sich als einfachster Ausdruck für die Zusammensetzung des Pigmentes die Formel C₁₂H₁₃NO. Diese Zusammensetzung scheint auch durch die Analyse des Derivates, welches man durch die Wirkung der rauchenden Salpetersäure erhält, bestätigt. Um dieses Produkt darzustellen, habe ich das Pigment in 10 Teilen Schwefelsäure gelöst und auf dem Wasserbade erwärmt; dann wurde nach und nach Salpetersäure, und zwar so lange, bis keine Gasentwicklung mehr stattfand, hinzugefügt. Das so erhaltene rohe Produkt stellt ein gelbes amorphes Pulver dar, welches durch wiederholtes Waschen mit Wasser, Lösen in Essigsäure und Fällen aus dieser Lösung durch Wasser gereinigt wurde.

0,1520 g Substanz ergaben 20,4 ccm Stickstoff bei 22° und bei einem Druck von 758,32 mm bei 0°.

Gefunden:	Berechnet für C ₁₂ H ₁₁ (NO ₂) ₂ NO:
N = 15,16%.	15,23%.

Aus den Resultaten dieser Analysen ersieht man, daß das rote Pigment nicht als ein Oxydationsprodukt des halben Moleküls des Indogotins, also des Indoxyls, zu betrachten ist. Daß es Phenolcharaktere besitzt, scheint durch die Tatsache bewiesen zu sein, daß es ammoniakalisches Silbernitrat sehr stark reduziert, jedoch können wir nichts Bestimmtes über seine chemische Konstitution sagen. Ich habe indessen, indem ich mir vorbehalte, später darauf zurückzukommen, es für nützlich erachtet, die Eigenschaften dieses Pigmentes mit denjenigen des Harnes zu vergleichen.

Zu diesem Zwecke habe ich Hunden und Kaninchen Methylketol wiederholt durch subcutane Injektion eingeführt. Um das rote Pigment aus dem Harn zu isolieren, bediente ich

mich der Methode, die von Größer vorgeschlagen worden ist. Der durch Oxydation rot gewordene Harn wurde mit Chlorbaryumlösung behandelt, wobei der Niederschlag von Baryumsulfat einen großen Teil der roten Substanz mit sich zu Boden reißt. Der auf einem Filter gesammelte Niederschlag wird mit absolutem Alkohol mehrmals übergossen, bis die rote Farbe vom letzteren vollständig aufgenommen ist. Die alkoholische Lösung wird durch schwaches Erwärmen verdunstet und der Rückstand mehrmals mit Essigsäure aufgenommen. Aus dieser Lösung wird das Pigment mit Wasser gefällt und endlich gereinigt und getrocknet.

Das so gewonnene rote Pulver hat die gleichen Eigenschaften wie das rote Pigment, welches man durch die Oxydation des Methylketols *in vitro* erhält; in der Tat enthält dieses Harnpigment Chlor in seinem Molekül und kann leicht von diesem durch Natrium befreit werden. Es ist in Alkohol, Essigsäure, Aceton und Anilin sehr löslich, sehr wenig löslich in Benzol, unlöslich in Toluol und Xylol. In konzentrierter Salzsäure löst sich das Harnpigment nicht, wohl aber in konzentrierter Schwefelsäure, endlich reduziert es ammoniakalische Silbernitratlösung sehr stark und wird von Salpetersäure unter Gasentwicklung angegriffen.

Eine Elementaranalyse des Pigmentes sowie eine Bestimmung des Molekulargewichts hätten am besten die Identität der beiden Substanzen bewiesen, aber die Katastrophe von Messina, durch welche das Laboratorium ganz zerstört wurde, hat die Fortsetzung dieser Arbeit unmöglich gemacht.

Wir können jedoch zu den 3 folgenden Schlüssen kommen:

1. Das rote Pigment, welches man erhält, wenn man den Tieren Methylketol verabreicht, ist ein Oxydationsprodukt, zu welchem man durch andere Oxydationsstufen gelangt.

2. Das rote Pigment, welches man erhält, wenn man Methylketol *in vitro* der Oxydation unterwirft, scheint kein Oxydationsprodukt des Indoxyls zu sein.

3. Dieses letztere rote Pigment sowie das rote Harnpigment sind vielleicht als ein und dieselbe Substanz zu betrachten.

Messina, Dezember 1908.