Über das Wesen der Ehrlichschen Diazoreaktion.

I. Mitteilung.

Von

Leo Hermanns und P. Sachs.

(Aus der II. medizinischen Klinik in München.)
(Der Redaktion zugegangen am 16. Februar 1921.)

Paul Ehrlich¹⁾ machte bekanntlich im Anschluß an die Arbeiten von Peter Grieß über die Diazoverbindungen die Entdeckung, daß auch der menschliche Harn bei gewissen Krankheiten mit Diazobenzolsulfosäure unter Bildung eines roten Farbstoffes reagiert. Diese Farbstoffbildung findet in alkalischer Lösung, am deutlichsten bei Zusatz von Ammoniak, statt.

Beim Verfolgen dieser Reaktion konnte er beobachten, daß andere Urine mit einer sauren Lösung von Diazobenzolsulfosäure sich orangegelb färbten. Er führte diese Eigelbreaktion auf die Anwesenheit eines Gallenfarbstoffderivates zurück. Wie spätere Untersuchungen ergaben²⁾, beruht sie in der Tat auf dem Vorhandensein von Urobilinogen im Harn von Leberkranken.

Auch der Urin von Ikterischen gab eine Diazoreaktion. Es zeigte sich, daß der Gallenfarbstoff in saurer Lösung mit Diazoniumsalzen kuppelt. Setzt man, wie dies Ehrlich vorschreibt, zu einer Lösung von Bilirubin in Chloroform eine stark saure

¹⁾ Charité-Annalen Bd. 8 (1883). Literatur bei Clemens: Deutsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 63, S. 74 ff.; ferner E. Huber, Die Ehrlichsche Diazoreaktion, Diss. Bern 1910.

²⁾ Thomas, Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 64, S. 247; Hans Fischer, Habilitationsschrift München 1912.

Lösung von Diazobenzolsulfosäure und etwas Alkohol, so entsteht Rotfärbung, die bald über Violett in ein intensives Blau übergeht. Der dabei entstehende Azofarbstoff wurde von Pröscher¹⁾ und von Orndorff und Tepple²⁾ in kristallinischem Zustand dargestellt und als Disazofarbstoff charakterisiert. Die neutrale Lösung ist rot, die alkalische grün, die saure blau.

Das Wesen der ursprünglichen Diazoreaktion, die nur in alkalischer Lösung stattfindet, ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen und Betrachtungen gewesen, konnte aber bisher nicht aufgeklärt werden. Bekanntlich reagieren eine sehr große Anzahl Substanzen, vor allem die Phenole und die aromatischen Amine, in alkalischer Lösung mit Diazoniumsalzen unter Bildung von roten Azofarbstoffen. Es besteht deshalb die Vermutung zu Recht, daß es sich bei der Diazoreaktion um verschiedene kupplungsfähige Körper handelt und daß im Harn der Tuberkulösen ein anderer enthalten ist, wie z. B. in dem der Trichinose.

Auch im normalen Urin sind zahlreiche Verbindungen vorhanden, die imstande wären, mit dem Diazoreagens zu kuppeln. Clemens³⁾ gibt eine Übersicht über die Verbindungen, die hier in Betracht kämen. Ich erinnere nur an das Phenol, an die Kresole und die Oxysäuren, an das Brenzkatechin. Das Hydrochinon und seine Derivate besitzen nicht die Fähigkeit zu kuppeln. Dagegen ist an das Histidin zu denken, das nach Engeland⁴⁾ im normalen Urin in geringen Mengen vorhanden ist. Er äußert die Vermutung, daß das Histidin der Träger der Ehrlichschen Diazoreaktion ist. Der normale Harn würde demnach keine Diazoreaktion geben, weil die Konzentration dieser Verbindungen eine zu geringe ist. Wie Clemens schon erwähnt, verschwindet die positive Reaktion häufig, wenn Polyurie auftritt. Andererseits habe ich gefunden, daß man die Reaktion auch beim normalen Urin

¹⁾ Diese Zeitschr. Bd. 29, S. 411.

²⁾ Amer. chemic. Journ. Bd. 33, S. 215.

³⁾ a. a. O.

⁴⁾ Münchn. mediz. Zeitschr. Bd. 55, S. 1643.

dadurch, daß man ihn im Vakuum stark eindampft, erzeugen kann.

Von dem bei der Reaktion entstehenden roten Farbstoff ist nichts bekannt, von seiner Isolierung ist in der Literatur nichts erwähnt. Wir machten die Beobachtung, daß in den meisten Fällen durch Zusatz von einigen Tropfen Salzsäure oder Eisessig die Rotfärbung verschwindet. Der Farbstoff ist demnach nicht säureecht. Dieses gilt für viele Azofarbstoffe, z. B. auch für den des Histidins.

Über das chemische Prinzip der Diazoreaktion und dessen Isolierung stellte bereits Paul Ehrlich zusammen mit Brieger mehrere Untersuchungen an. Er beschreibt die Darstellung eines leichtzerfließlichen Zinksalzes. Es war ihm nicht möglich, das Salz in einen analysierbaren Zustand zu bringen. Auf Grund der Erfahrungen, die Bondzynski, Dombrowski und Panek¹⁾ bei ihren Untersuchungen über die Protein-säurefraktion des Urins machten, gibt die Antoxyproteinsäure die typische Diazoreaktion.

In den letzten Jahren sind zahlreiche Arbeiten von M. Weiß²⁾ erschienen, in denen das Urochromogen als der Träger der Diazoreaktion bezeichnet wird. Das Urochromogen ist andererseits die Vorstufe des normalen Harnfarbstoffes. Auf diese Weise werden zwei Probleme miteinander verknüpft und keines wird gelöst. Weder das Urochrom noch das Urochromogen oder das chemische Prinzip der Diazoreaktion werden von ihm genügend chemisch charakterisiert, um so weitgehende Schlußfolgerungen, wie sie insbesondere die letzte Publikation enthält, zu gestatten. Auf diese werden wir an geeigneter Stelle eingehen und wollen hier nur erwähnen, was M. Weiß über die Zersetzlichkeit des Chromogens sagt: „Es kann keinem Zweifel unterliegen, daß die Labilität des Urochromogens eine derartige ist, daß man seine Reaktionen nicht als feststehend betrachten kann. Dieser Farbstoff befindet sich in einer kontinuierlichen Änderung, sodaß im Endprodukt schon eine

¹⁾ Diese Zeitschr. Bd. 46, S. 83.

²⁾ Biochem. Zeitschr. Bd. 102, S. 228 und Bd. 112, S. 61. Dort auch die früheren Arbeiten zitiert.

völlige Umkehrung der Ausgangseigenschaften vorhanden sein kann . . . Diese besonderen Umstände haben die Verfolgung des die Diazoreaktion verursachenden Körpers so schwierig und seine Darstellung beinahe unmöglich gemacht.“

Es ist demnach mit den bisher angewandten Methoden nicht gelungen, das kuppelnde Prinzip zu fassen. Auch ich ging zunächst denselben Weg und versuchte mit Fällungsmethoden zum Ziel zu gelangen. Dabei stellte sich aber bald heraus, daß im Laufe der Fraktionierung sich die kuppelnde Substanz zersetzte. Dies ließ sich durch kolorimetrischen Vergleich der Farbstärken der einzelnen Diazoreaktionen sehr gut feststellen. Bei fortgeschrittener Zersetzung nimmt die Reaktion anstelle der Rotfärbung einen braunen Ton an.

Zwei neue Darstellungsmethoden.

Die erste Methode verzichtet auf die direkte Isolierung des kuppelnden Prinzips, sie ist auf die Darstellung des bei der Reaktion entstandenen Farbstoffes gerichtet. Sie geht von der Voraussetzung aus, daß ein einziger einheitlicher Farbstoff bei der Kupplung gebildet wird, daß das zugesetzte Diazoniumsalz eine Auswahl unter den Verbindungen trifft. Daß dies der Fall ist, darauf weist schon Clemens¹⁾ hin. In einem Gemisch von 5 Teilen Phenol und 1 Teil Naphthol entsteht mit Diazobenzolsulfosäure nur der rote Farbstoff des Naphthols, wenn man die dem Naphthol äquivalente Menge Diazolösung zusetzt. Allgemein entsteht zunächst ausschließlich derjenige Farbstoff, der die intensivste Farbe hat. Dasselbe gilt auch für das Gemisch „Urin“.

Die Diazobenzolsulfosäure ist für die Farbstoffisolierung ungeeignet, da sie als Sulfosäure stets wasserlösliche Farbstoffe gibt. Ich wählte aus diesem Grunde das von Hans Fischer²⁾ zur Darstellung von Purinfarbstoffen schon früher benutzte Dichlorazobenzol, das durch Diazotieren des Dichloranilins erhalten wird. Auf diese Weise erhielten wir

¹⁾ a. a. O.

²⁾ Diese Zeitschr. Bd. 60, S. 69.

Farbstoffe, die sich aus dem Urin mittels Äther und anderer Lösungsmittel extrahieren ließen.

Der verarbeitete Urin stammte von Patienten mit vorgeschrittener Tuberkulose und durfte höchstens Spuren von Eiweiß enthalten. Die Ehrlichsche Diazoreaktion war typisch positiv, der entstehende rote Farbstoff war säureempfindlich. Zunächst wurde der Harn im Vakuum bei 60—70° so stark eingedampft, daß 30 l auf 2 l gebracht wurden. Von den ausfallenden Salzen und dem Harnstoff wurde scharf mittels Stoffilter abgesaugt und das Filtrat mit neutralem Bleiacetat geklärt. Der dabei entstehende massige Niederschlag wird auf der Nutsche gut ausgewaschen, das Filtrat durch Einleiten von Schwefelwasserstoff vom überschüssigen Blei befreit und dann auf dem Wasserbade, oder besser im Vakuum, wieder auf das ursprüngliche Volumen gebracht.

Zur Darstellung des Farbstoffes benutzten wir jeweils eine salzsaure Lösung von Dichlordiazobenzol, die wir uns durch Diazotieren von Dichloranilin frisch hergestellt hatten. Der Harn wurde zunächst mit Sodalösung oder verdünnter Natronlauge alkalisch gemacht und beim Einlaufen der Diazolösung sorgfältig darauf geachtet, daß die Lösung alkalisch blieb. Die Kupplung wurde mit R-Salz kontrolliert und aufgehört, sobald dieses einen Überschuß anzeigt. Der auf diese Weise aus dem Urin gewonnene Farbstoff läßt sich mit Äther-Pyridingemisch extrahieren. Der nach dem Abdestillieren des Äthers zurückbleibende Farbstoff ist in Pyridin mit dunkelroter Farbe sehr leicht löslich, weniger leicht in Alkohol, Äther und Essigester. Er enthält Schwefel! Die Aufklärung seiner Zusammensetzung soll in einer der folgenden Mitteilungen geschehen. Dort wird auch auf die Frage eingegangen werden müssen, ob bei der Tuberkulose mit dem Diazoreagens stets derselbe Farbstoff entsteht, oder ob diese Farbstoffe auch noch verschieden sind. Im folgenden soll dagegen die 2. Darstellungsmethode geschildert werden.

* * *

Im Laufe der Untersuchungen ergab sich nämlich die überraschende Tatsache, daß es unter gewissen Bedingungen gelingt, die kuppelnde Substanz dem Harn mit Äther zu entziehen. Dieses Extraktionsverfahren hat große Vorteile vor dem ersten Verfahren und bietet die Aussicht, die Substanz unzersetzt aus den Extrakten isolieren zu können. Es gründet sich auf folgende Beobachtungen:

1. 300 ccm im Vakuum konzentrierten Urins — aus 6 l nativen Urins — wurden mit Essigsäure angesäuert und 1 Stunde mit Wasserdampf destilliert. Da im Destillat nur schwache Diazoreaktion vorhanden war, wurde mit konz. Salzsäure vorsichtig bis zur kongosauren Reaktion angesäuert, dann wieder Wasserdampf durchgeschickt. Diesmal war ebenfalls im Destillat Diazoreaktion. Die Destillation wurde bis zum Verschwinden der Reaktion fortgesetzt. Die Prüfung des Kolbeninhaltes ergab unverändert starke Diazoreaktion. Dieser wurde im Schütteltrichter mit Äther extrahiert. Bei der Diazoprobe zeigte der Äther stark positive Reaktion. Die Ausschüttelung wurde 5mal wiederholt. Auch der 5. Extrakt zeigte noch deutliche Reaktion.

2. Ein anderer diazopositiver, konz. Urin wurde mit Äther ausgeschüttelt. Darauf wurde er mit Salzsäure kongosauer gemacht, wieder ausgeschüttelt. In beiden Fällen gab der Ätherauszug nur Rosafärbung bei der Diazoprobe. Hierauf wurde $\frac{1}{2}$ Stunde der Urin im Babotrichter gekocht, wobei die saure Reaktion durch Säurezusatz aufrecht zu erhalten ist, und nach dem Abkühlen wiederum extrahiert. Diese Extrakte zeigten starke Diazoreaktion. Dies änderte sich auch bei der mit den Extrakten vorgenommenen Wasserdampfdestillation nicht. Von dem Destillate waren nur die ersten 10 ccm diazopositiv.

3. Durch kolorimetrischen Vergleich der Diazoreaktion vor und nach dem Kochen des Urins mit Säuren ließ sich feststellen, daß keine Zerstörung des „Chromogens“ durch das Erhitzen stattfindet.

Aus diesen Versuchen ging hervor, daß das kuppelnde Prinzip im Harn chemisch gebunden sein muß.

Durch saure Hydrolyse gelingt es, diese Bindung zu lösen. Allerdings nimmt die Ätherextraktion sehr lange Zeit in Anspruch, da die Substanz außerordentlich leicht in Wasser, dagegen schwer in Äther löslich ist. Essigester extrahiert besser. Bis zur Erschöpfung des Harns bedarf es einer mehrwöchentlichen Ätherextraktion im Steudelschen Apparat. Selbst nach 6 Wochen zeigte der Ätherextrakt beim Wechseln der Vorlage immer wieder starke Diazoreaktion. Diese ist besonders deutlich in dem braunen Bodensatz, der sich in dem Extraktionskölbchen abzusetzen pflegt.

So erklärt es sich auch, daß der native, nicht eingedampfte Urin trotz Kochens mit Säure an Äther kaum etwas von der Substanz abgibt. Dies geschieht erst durch Sättigen des Urins mit Kochsalz oder besser, wie oben hervorgehoben wurde, durch Eindampfen auf den 30sten Teil des Volumens. Beim Schütteln des Ätherextraktes mit destilliertem Wasser geht fast alles ins Wasser über, wie sich durch die Diazoprobe leicht feststellen läßt.

Die Extraktion erfolgte, wie schon erwähnt, stets bei kongosaurer Reaktion des Urins. Einige Versuche wurden am alkalisch gemachten Harn angestellt, die dabei gewonnenen Extrakte zeigten eine viel schwächere Diazoreaktion als die sauren.

Die weitere Aufarbeitung geschah folgendermaßen: Nach dem Abdestillieren des Äthers wurde der zurückbleibende braungefärbte Sirup in wenig heißem Wasser aufgenommen und in den Eisschrank gestellt. Nach 24 Stunden wird von den ausgeschiedenen Kristallen, die größtenteils aus Benzoesäure und Hipursäure bestehen, abgesaugt. Zur Entfernung vorhandener Oxyssäuren wird das Filtrat auf dem Wasserbade mit 0,5 g Silberkarbonat erwärmt und nach dem Abkühlen vom entstandenen Niederschlag abfiltriert. Zur weiteren Klärung bedienten wir uns des Bleizuckers, und zwar setzt man zu dem Filtrat, solange noch eine Fällung erfolgt, neutrale Bleiacetatlösung zu. Es entsteht ein gelbgefärbter Niederschlag, der u. a. noch vorhandene Phenole, die ja ebenfalls bei der Diazoreaktion einen roten Farbstoff geben, ent-

halten mußte. Das Filtrat des Bleiniederschlages wurde mit Schwefelwasserstoff entbleit und durch Wasserdampfdestillation vom größten Teil der Essigsäure befreit, dann auf dem Wasserbade bis auf 10 ccm eingedampft. Dabei läßt sich die zunehmende Konzentration des kuppelnden Körpers sehr gut durch kolorimetrischen Vergleich der Diazoproben verfolgen.

Die so erhaltene hellgelb gefärbte Lösung gibt mit dem Ehrlichschen Reagens eine tiefrote Färbung. Es genügt hierzu, einen Tropfen mit der zehnfachen Menge des Reagens zu versetzen. Beim Stehen im Exsikkator bildet sich ein Sirup, der noch nach Monaten unveränderte tiefrote Reaktion gibt. Eine Zersetzung scheint demnach bei saurer Reaktion nicht stattzufinden. Diese tritt dagegen ein, wenn man die Lösung durch Zufügen von Ammoniak oder Natronlauge alkalisch macht. Die Lösungen verfärben sich dann dunkelbraun und geben schließlich keine Reaktion mehr. Dasselbe tritt ein, wenn man Fällungen mit alkalischer Blei- oder Quecksilberlösung vornimmt. Phosphorwolframsäure bewirkt Oxydation und Zerstörung der Substanz.

Die auf diese Weise gewonnenen Extrakte verschiedener Herkunft zeigen folgende Reaktionen:

1. Eine intensive dunkelrote Ehrlichsche Diazoreaktion, die beim Ansäuern verschwindet.
2. Bei vorsichtigem Zusatz von stark verdünnter Eisenchloridlösung tritt zunächst hellgrüne Färbung auf, die bei Zusatz einiger Tropfen Sodalösung in ein reines Dunkelrot umschlägt.

Ich erinnere daran, daß das Phenol eine violette Eisenchloridreaktion, die beiden Kresole und das Hydrochinon eine blaue, das Brenzkatechin eine tiefdunkelgrüne, das Resorzin eine dunkelviolette Färbung gibt.

3. Die Lösung verhält sich gegen Permanganat stark ungesättigt.

Auf diese Permanganatreaktion wird von M. Weiß¹⁾ großes Gewicht gelegt. Er zieht aus der dabei auftretenden

¹⁾ M. Weiß a. a. O.

Gelbfärbung, die wir an unseren Extrakten bestätigen konnten, den Schluß, daß dabei aus der Vorstufe „Urochromogen“ das Urochrom entsteht. Zugleich stellt er fest, daß diese Urochromogenreaktion in den meisten Fällen mit der Ehrlichschen Diazoreaktion parallel geht. Dieser interessante Befund wird von vielen Seiten bestätigt. Den Beweis, daß dabei Urochrom gebildet wird, halte ich nicht für erbracht. Die Permanganatreaktion zeigt allgemein Doppelbindungen an und ist demnach eine sehr vieldeutige Reaktion. Bekanntlich werden auch Ringsysteme von Kaliumpermanganat angegriffen. Wir erwähnen nur die Aufspaltung des Isochinolinringes des Emetins¹⁾ und anderer Alkaloide.

4. Die Ehrlichsche Aldehydreaktion tritt erst beim Erwärmen auf. Bekanntlich reagieren Urobilinogen und die Pyrrole bereits in der Kälte.
5. Ammoniakalische Silberlösung wird in der Kälte langsam reduziert.
6. Bromeisessiglösung wird beim Zufügen momentan entfärbt.
7. Die Knoopsche Histidinprobe ist negativ, ebenso die Biuretkreaktion. Mit Millons Reagens entsteht leichte Rosafärbung.

Auf Grund dieser Reaktionen und der hydrolytischen Aufspaltung durch Säuren gelangt man zu der Auffassung, daß das kuppelnde Prinzip des Tuberkuloseurins zu den Ätherschwefelsäuren gehört²⁾ und ein Oxydationsprodukt des Tyrosins ist. Doch bleibt dies vorläufig eine Hypothese.

¹⁾ A. Windaus und L. Hermanns, Untersuchungen über Emetin I, Ber. Bd. 47, S. 1470.

²⁾ Diese mögen als Monoäthersäuren ausgeschieden werden, die freie Phenolgruppe befähigt sie mit Diazoniumsalzen zu kuppeln.