Über das Wesen der Ehrlichschen Diazoreaktion.

II. Mitteilung.

Von

Leo Hermanns und P. Sachs.

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

In der ersten Mitteilung wurden zwei neue Methoden, die für die Aufklärung der Diazoreaktion Erfolg versprochen, geschildert. Im folgenden soll die Anwendung des einen Verfahrens gezeigt und zugleich der Beweis erbracht werden, daß die Ehrlichsche Diazoprobe keine einheitliche Reaktion ist, daß es sicherlich verschiedene Ausscheidungsprodukte gibt, welche kuppeln.

Der untersuchte Urin stammte von einer Patientin mit Leberkrebs, die unter fortschreitender Kachexie im Krankenhaus innerhalb 2 Monaten zugrunde ging. Er war eiweiß- und zuckerfrei. Das Sediment enthielt oxalsauren Kalk, sonst nichts Pathologisches. Die Indikanprobe war positiv, ebenso die Ehrlichsche Aldehydreaktion, ferner gab der Urin die sog. Uroroseinreaktion! Bei der Kuppelung mit Diazoreagens entstand eine auffallend scharlachrote Färbung, die beim Ansäuern der ammoniakalischen Lösung auch nach dem Kochen bestehen blieb. Demnach lag ein anderer Farbstoff vor.

Wir stellten aus dem Urin in der erwähnten Weise mittels einer Lösung von p-Dichlordiazobenzolchlorid den Azofarbstoff dar und extrahierten ihn mit Äther unter Zusatz von etwas Pyridin im Extraktionsapparat. Durch Reinigen und mehrmaliges Umkristallisieren aus heißem Alkohol gewinnt man ihn in schönen dunkelrot gefärbten Nadelchen, die an der

Oberfläche Metallglanz zeigen. Die Substanz ist in Wasser unlöslich, löst sich dagegen in verdünnter Sodalösung mit dunkelroter Farbe. Setzt man zu der alkalischen Lösung konzentrierte Salzsäure zu, so entsteht eine intensive Violettfärbung.

Wie die Elementaranalyse ergab, hat der Farbstoff die Zusammensetzung: $C_{16}H_{11}N_3O_3Cl_2$. Es handelt sich also um einen Monoazofarbstoff. Nach Abzug des angekuppelten Dichlordiazobenzols bleibt für die kuppelnde Substanz die Zusammensetzung: $C_{10}H_9NO_3$. Diese Formeln waren zunächst nur aus der C-H- und N-Bestimmung errechnet worden. Sie fanden später durch die Mikrochlorbestimmung, die wir Herrn Dr. Lieb in Graz verdanken, ihre endgültige Bestätigung. Letztere diente zugleich als Bestimmung der Molekulargröße.

Die Konstitution ließ sich folgendermaßen aufklären. Die Formel $C_{10}H_9NO_3$ enthält drei Sauerstoffatome. Davon gehören, wie aus dem sauren Charakter des Farbstoffs hervorgeht, zwei einer Karboxylgruppe an, das dritte Sauerstoffatom einer Phenolgruppe, zu der in Parastellung die Kuppelung stattfindet. Die sonstige Zusammensetzung des Körpers weist auf ein Ringsystem hin, sie entspricht einem Chinolin- oder Indolderivat. Für die letztere Annahme sprechen das Verhalten des Urins und das des Farbstoffes bei der Reduktion mit Zinnchlorür. Die im Urin und in der Reduktionsflüssigkeit festgestellten Reaktionen stimmen miteinander überein. In beiden Fällen sind die Uroroseinreaktion und die Ehrlichsche Aldehydreaktion positiv. Dieses Verhalten stimmt zudem mit den Reaktionen der Indolessigsäure überein, wie sie von Salkowski und Ellinger beschrieben sind.

Es ist bekannt, daß das Indol und seine α -substituierten Derivate imstande sind, mit Diazoniumsalzen Farbstoffe zu bilden, dabei findet die Kuppelung in der β -Stellung statt. Das Methylketol gibt also einen Azofarbstoff. Dagegen geben das Skatol sowie die von A. Ellinger¹⁾ dargestellte und von Herter²⁾

¹⁾ Ber. Bd. 37, S. 1801.

²⁾ Journ. biol. Chem. Bd. 4, S. 238.

im Urin eines Patienten gefundene Indolelessigsäure keine Diazoreaktion.

Die angeführten Tatsachen zwingen zu der Annahme, daß es sich im vorliegenden Falle um den Azofarbstoff (II) einer Oxyindolelessigsäure (I) von folgender Konstitution handelt¹⁾:

Sie stellt zweifellos ein Abbauprodukt des Tryptophans dar, das bisher noch nicht beschrieben und über dessen Vorkommen in pathologischem Urin nichts bekannt ist. Dagegen findet sich im Urin des Hundes bekanntlich fast regelmäßig die γ -Oxychinolincarbonsäure, die sog. Kynurensäure (III), die, wie A. Ellinger nachgewiesen hat, aus dem Tryptophan stammt. In einer jüngst erschienenen Arbeit zeigen Ellinger und Matsuoka²⁾, daß auch die Indolbrenztraubensäure beim Kaninchen in Kynurensäure übergeht, und stellen ein Schema für die merkwürdige Umwandlung des Tryptophans, bei der aus einem Indol- ein Chinolinring gebildet wird, auf. Diese Umwandlung konnte bisher nur beim Hunde und beim Kaninchen festgestellt werden. Es ist deshalb anzunehmen, daß das Tryptophan beim Menschen auf einem andern Wege abgebaut wird. Unser Befund

¹⁾ Die Stellung der Phenolgruppe im Benzolkern ist zunächst noch hypothetisch.

²⁾ Diese Zeitschr. Bd. 109, S. 259.

würde darauf hindeuten, daß hier zunächst nicht der Pyrrol-, sondern der Benzolring der Oxydation unterliegt. Der Oxydationsmechanismus wäre im Prinzip in beiden Fällen der gleiche, wie ein Vergleich des von Ellinger für das Tryptophan aufgestellten Schemas mit dem von Fromherz und Hermanns¹⁾ seinerzeit für das Tyrosin angenommenen dartut.

So bietet die Oxyindoleessigsäure nicht nur als Ursache der Diazoreaktion, sondern auch als Abbauprodukt des Tryptophans Interesse.

Experimenteller Teil.

Es standen uns von der Patientin im ganzen 35 l Urin zur Verfügung, die im Vakuum auf 2000 ccm eingedampft wurden. Wie ein Versuch zeigte, war zur Darstellung des Farbstoffes die Klärung mit Bleizucker nicht erforderlich.

400 ccm konzentrierten Urins wurden mit 30 ccm 33%iger Natronlauge versetzt, so daß ein Überschuß an Alkali vorhanden war. Dann läßt man eine salzsaure Lösung von Dichlordiazobenzolchlorid unter Umrühren einlaufen, bis eine Probe im Auslauf gegen alkalische R-Salzlösung durch Rotfärbung einen Überschuß an Diazolösung verrät. Es wurden 3,2 g Dichloranilin verbraucht. Der bei der Kuppelung entstandene rote Farbstoff bleibt in Lösung. Er läßt sich durch Einleiten von Kohlensäure ausfällen.

Wir zogen es vor, ihn mit Äther, dem wir einige Kubikzentimeter Pyridin zusetzten, im Extraktionsapparat zu extrahieren; dies dauerte mehrere Tage. Der Farbstoff geht wohl deshalb schwer in Äther, weil das Farbstoffsalz nur bis zu einem gewissen Grad dissoziiert ist. Nach dem Abdampfen des Äthers und Pyridins scheidet er sich in Form von metallisch glänzenden, dunkelroten Schuppen ab, daneben sind noch lange farblose Nadeln vorhanden. Zur Reinigung wird der ganze Rückstand in Wasser aufgenommen und auf dem Wasserbade erwärmt. Dabei gehen die farblosen Kristalle in Lösung, der Farbstoff bleibt ungelöst. Er wird abfiltriert und aus

¹⁾ Fromherz und Hermanns, Diese Zeitschr. Bd. 91, S. 194.

95%igem Alkohol umkristallisiert. Er kristallisiert in kurzen dunkelroten Nadeln, die zu Büscheln beisammen liegen. In heißem Alkohol, Pyridin und Aceton ist er leicht löslich, ferner in verdünnter Sodalösung.

Wir beobachteten daneben noch ein Isomeres, das in kleinen Keilen kristallisierte und sich infolge seiner Schwerlöslichkeit in Alkohol von den Nadeln trennen ließ. Die Analyse ergab dieselbe Zusammensetzung (Nr. 2).

In konzentrierter Schwefelsäure löst sich der Farbstoff mit tief violetter Farbe. Sein Zersetzungspunkt liegt bei 246°. Die Pyridinlösung löscht das ganze Spektrum vom Violett bis zum Rot, d. i. bis zur Wellenlänge 600 $\mu\mu$ aus.

Mikroanalysen nach Pregl:

1. 5,314 mg Substanz: 10,303 CO_2 , 1,597 H_2O .
 2. 5,690 mg Substanz: 11,14 mg CO_2 , 1,796 mg H_2O .
 3. 4,236 mg Substanz: 8,21 mg CO_2 , 1,285 mg H_2O .
 4. 3,600 mg Substanz: 0,39788 ccm N_2 (20° und 721 mm).
- $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_5\text{Cl}_2$ Ber.: C = 52,75% H = 3,04% N = 11,55%
 Gef.: C = 52,88% H = 3,36% (1) N = 11,92% (4)
 = 52,79% = 3,43% (2)
 = 52,86% = 3,40% (3)

Diese Zusammensetzung wurde durch die Chlorbestimmung bestätigt:

5,332 mg Substanz: 4,125 mg AgCl
 Ber.: 19,24% Gef.: 19,48%.

Reduktion des Azofarbstoffes: Dazu wurden 0,5 Farbstoff in 200 ccm Alkohol gelöst und unter Erwärmen Zinnchlorürlösung so lange zugegeben, bis Entfärbung eintrat. Nach dem Abdunsten des Alkohols wird mit Wasser verdünnt, die Lösung durch Einleiten von H_2S entzint und filtriert. Beim Eintrocknen färbt sich das Filter blau. Das klare Filtrat gibt folgende Reaktionen:

1. Auf Zusatz von Chlorkalklösung bildet sich ein blauer Farbstoff,

2. die Uroroseinreaktion: mit einigen Tropfen Natriumnitritlösung entsteht Rotfärbung,

3. mit verdünnter Eisenchloridlösung färbt sich die Lösung rotbraun.

Macht man sie alkalisch, so tritt beim Stehen braune Verfärbung und Zersetzung ein. Die saure Lösung setzt beim Stehen an der Luft den blauen Farbstoff ab, der auch durch Oxydation mit Chlorkalklösung entsteht. Er ist amorph und läßt sich mit Natriumhydrosulfit reduzieren. In Chloroform ist er nicht löslich. Beim Versuch ihn zu reinigen, ging er in ein braunes Pigment über. Dieses Verhalten wäre aus der angenommenen Konstitution leicht zu erklären, da er ein Aminophenolderivat ist, die sich leicht zu Chinonimiden oxydieren und leicht Indophenolfarbstoffe bilden.

Es soll der Versuch gemacht werden, Oxyindolessigsäure synthetisch darzustellen, denn die geringe Substanzmenge, die aus dem Urin dargestellt wurde, reicht zu ausgedehnten Versuchen nicht hin.

Es wäre noch zu erwähnen, daß sich der Farbstoff mit Dimethylsulfat in alkalischer Lösung methylieren läßt. Er geht dabei in einen amorphen Farbstoff von braunroter Farbe über; wahrscheinlich entsteht ein Gemisch von methylierten Produkten.