

Zur Kenntniss der Ehrlich'schen Dimethylamido- benzaldehydreaction.

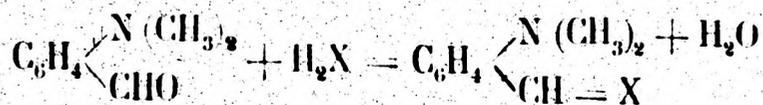
Von
Dr. Pröschel.

Mit einer lithographischen Tafel.

(Aus dem Institut für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M.)

(Der Redaction zugegangen am 2. December 1900.)

Vor etwa zwei Jahren beobachtete Ehrlich, dass normaler Harn bei Zusatz von Dimethylamidobenzaldehyd in saurer Lösung eine schwache Rothfärbung zeigt. Auf Veranlassung von Geh. Rath Ehrlich habe ich versucht, den dieser Reaction zu Grunde liegenden Bestandtheil des Harns zu isoliren. Im Voraus möchte ich mittheilen, dass von den bekannten Bestandtheilen des Urins keiner die Reaction zeigt und der isolirte Körper einen bis jetzt unbekanntem Bestandtheil des normalen Harns bildet. Ehe ich zur Beschreibung der Isolirung dieses Körpers übergehe, möchte ich etwas näher auf den Chemismus der Reaction eingehen. Die Reaction mit dem Dimethylamidobenzaldehyd verläuft im Sinne folgender Gleichung:



Die Aldehydgruppe reagirt wahrscheinlich mit einer Methylen- oder Amidogruppe des noch unbekanntem Körpers. Zur Ausführung der Reaction bedarf man einer etwa 2%igen salzsauren Lösung von Dimethylamidobenzaldehyd.¹⁾

1) Der Dimethylamidobenzaldehyd war von Geigy & Co. in Basel bezogen.

Von dieser Lösung fügt man einige Tropfen dem Urin zu: nach wenigen Secunden färbt sich der Harn je nach der Menge des vorhandenen Körpers schwach oder stark hell kirschroth. Im normalen Urin schwankt die Intensität der Reaction sehr beträchtlich, fehlt aber nur sehr selten. Man kann den rothen Farbstoff sehr leicht mit Di- oder Epichlorhydrin ausziehen: ebenso mit Chloroform, in dem er aber etwas schwerer löslich ist. Als Contrastprobe¹⁾ kann man auch noch folgenden Versuch anstellen: Man nimmt gleiche Volumina Harn in zwei Reagensgläsern, gibt in das eine einige Tropfen Formaldehyd, schüttelt gut um und füge dann zu beiden Dimethylamidobenzaldehyd zu. Der mit Formaldehyd versetzte Harn behält seine ursprüngliche Farbe, während der andere schön roth gefärbt ist. Durch Zufügen von Formaldehyd ist die Gruppe, die mit dem Aldehydrest reagirt, verstopft worden, kann also mit dem Dimethylamidobenzaldehyd nicht mehr in Action treten. Die Condensation lässt sich mit jedem Aldehyd ausführen, doch eignen sich zur Farbenreaction nur solche Aldehyde, die einen aromatischen Rest und auxochrome Gruppen enthalten, wie dies beim Dimethylamidobenzaldehyd der Fall ist. Auch das Chlorderivat des Dimethylamidobenzaldehyds ist zur Reaction geeignet. Diäthylamidobenzaldehyd zeigt im Vergleich zum Dimethylamidobenzaldehyd eine viel schwächere Rothfärbung.

Zur Isolirung dieses Körpers kommt normaler Harn nicht in Betracht, da die Mengen desselben zu gering sind und viele Hunderte Liter von Harn nothwendig wären, um nur einige Centigramme des Körpers zu erhalten. Durch zahlreiche Untersuchungen pathologischer Harne habe ich gefunden, dass der Urin von Kranken, die an Typhus, Phthise, chronischen Enteritiden leiden, die Reaction in verstärktem Maasse gibt und zur Gewinnung des Körpers sich am besten eignet. Man verarbeite nur Harne, die eine starke rothe Reaction geben. Von der direkten Isolirung des Körpers

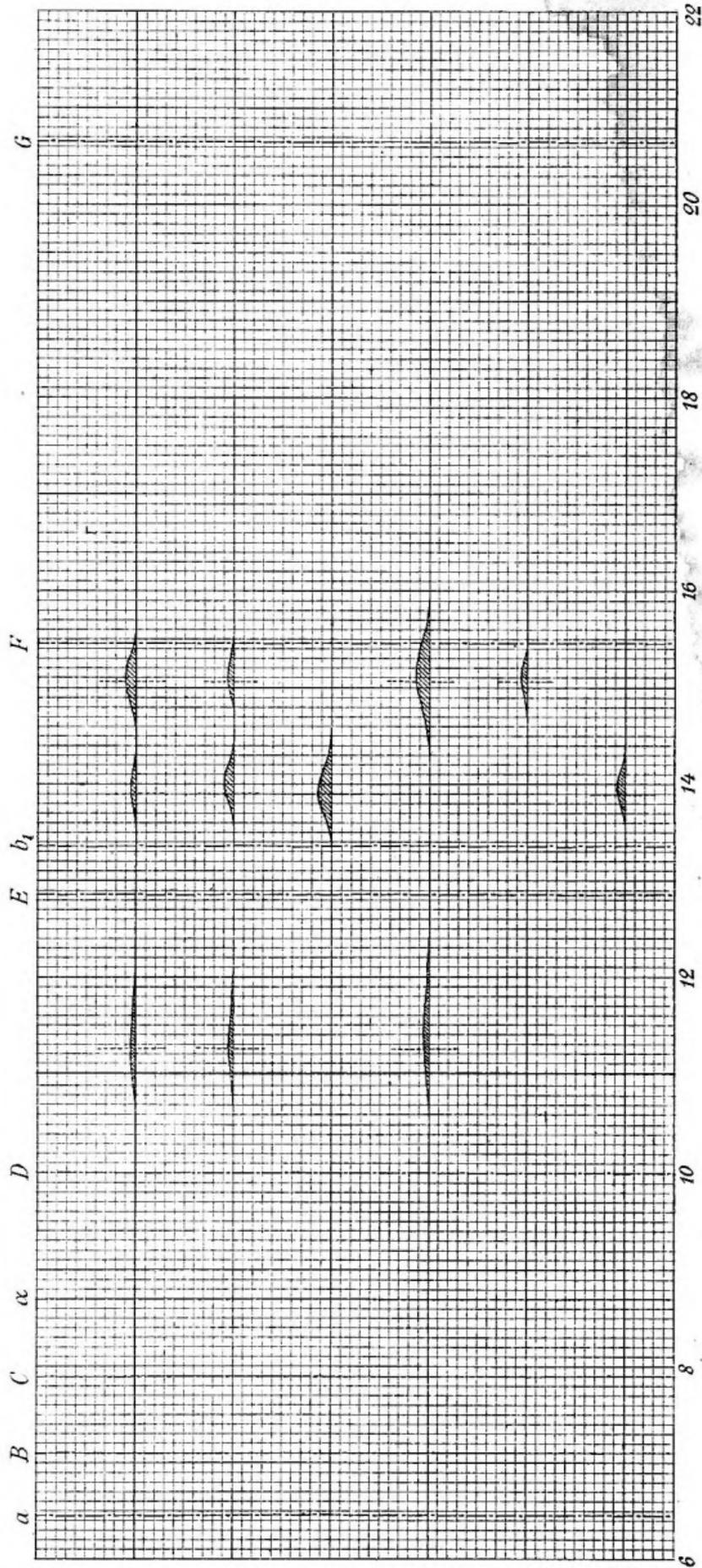
1) Dieser Versuch ist unabhängig von uns von Prof. Nicolai in Göttingen gefunden worden, wie er uns brieflich mitgetheilt hat.

habe ich abgesehen, da brauchbare Extractions- und Fällungsmittel fehlen. Mit Amylalkohol kann man aus dem Harn, nach Sättigung mit Ammonsulfat, denselben theilweise ausschütteln, doch ist diese Methode zur Gewinnung grösserer Quantitäten ungeeignet. Ich habe deshalb versucht, den rothen Farbstoff zu isoliren und den unbekanntem Körper vom Dimethylamidobenzaldehyd abzuspalten, sobald grössere Mengen desselben mir zur Verfügung stehen. Der neue Harnbestandtheil kommt selbst in pathologischen Fällen, wo er gegen die Norm bedeutend vermehrt ist, doch immer in sehr geringer Menge vor, so dass zur Gewinnung von ca. 1 g des Farbstoffes ca. 100 Liter Harn, der die Reaction stark geben muss, nothwendig sind.

Zu 3 Liter Harn setzt man 20–30 cem. Dimethylamidobenzaldehydlösung,¹⁾ gibt 100 cem. concentrirte Salzsäure zu, lässt einige Zeit stehen, sättigt die Flüssigkeit mit Ammonsulfat und schüttelt mit Chloroform aus. Das Chloroform wird im Scheidetrichter vom Harn getrennt und ein- bis zweimal mit gesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen. Die beim Schütteln mit Chloroform entstehende Emulsion verarbeitet man am besten folgendermassen :

Nachdem die Chloroformlösung mit gesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen und von derselben getrennt ist, gibt man frisches Chloroform zu und schüttelt gut durch. Die vom Chloroform eingeschlossene Flüssigkeit trennt sich dann glatt von derselben und wird im Scheidetrichter abgetrennt. Vollkommen wird der rothe Farbstoff nicht extrahirt, geringe Mengen desselben bleiben noch in der Flüssigkeit zurück. Nachdem die Chloroformauszüge vereinigt, filtrirt man durch ein trockenes Faltenfilter und trocknet die Chloroformlösung mit geschmolzenem Glaubersalz. Nachdem dasselbe getrocknet ist, filtrirt man, wäscht das Glaubersalz mit geringen Mengen Chloroform nach und dunstet dasselbe im Vacuum bei ca. 35–40° ab. Ist die Hauptmenge desselben abge-

¹⁾ Man löst ca. 20 g Dimethylamidobenzaldehyd in 500 cem. concentrirter Salzsäure und gibt dann 500 cem destillirtes Wasser zu.



Farbstofflösung I. Phase

" II. Phase

" III. Phase

Farbstofflösung u. Salpetersäure

" u. Ammoniak

" u. alkoholische Kalilauge

dunstet, so bringt man den Rest desselben in flache Schalen und lässt denselben im Vacuumexsiccator, der mit Paraffin und Schwefelsäure beschickt ist, absorbieren. Die vollkommen trockene, krystallinisch erstarrte Masse, die den rothen Farbstoff einschliesst, und die der Hauptmenge nach aus unverändertem Dimethylamidobenzaldehyd besteht, wird fein zerrieben und mit Ligroin ausgezogen. Nach 3—4maligen Ausziehen mit Ligroin gibt man Toluol oder Benzol zu und extrahirt damit so lange, bis dasselbe beinahe farblos ist. Der Farbstoff hinterbleibt als schmierige, dunkelrothe Masse, die noch geringe Mengen Dimethylamidobenzaldehyd einschliesst. Nachdem das Toluol oder Benzol mit Aether verdrängt ist, löst man den Rückstand in wenig Alkohol, worin er sich mit dunkelkirschrother Farbe leicht löst. Um geringe Mengen Dimethylamidobenzaldehyd, die mit in die alkoholische Lösung übergehen, zu entfernen, wird der rothe Farbstoff ausgefällt. Man stellt sich zunächst ein Gemisch von einem Volumen Ligroin, 2 Volumen Benzol oder Toluol und 2 Volumen Aether her. Diese Mischung gibt man dem in möglichst wenig Alkohol gelösten rothen Farbstoff zu, schüttelt gut durch und lässt zwei bis drei Tage im Dunkeln stehen. Die Hauptmenge des Farbstoffes ist nach zwei Tagen vollkommen ausgefällt und klebt an den Wandungen des Gefässes fest. Man giesst die schwach roth gefärbte Lösung ab, spült mit Aether nach, löst den rothen Farbstoff in absolutem Alkohol, filtrirt und dunstet den Alkohol im Vacuum über Phosphorsäureanhydrid vollkommen ab. Zur vollkommenen Entfernung des Dimethylamidobenzaldehyd fällt man den Farbstoff mit dem Ligroin-Toluol-Aethergemisch zweimal aus. Der Vacuumexsiccator muss dunkel gehalten werden, da der rothe Farbstoff durch das Sonnenlicht leicht zerstört wird. Nach 1—2 Tagen ist der Alkohol verdunstet und haftet der Farbstoff als dünne Haut an dem Glas. Zur leichteren Entfernung desselben von der Glasschaale stellt man dieselbe in den Trockenkasten und lässt die Temperatur nicht über 70° steigen. Nach 1—2 Stunden ist die letzte Spur Alkohol verschwunden und man kann mit einem dünnen Glas-

spatel den rothen Farbstoff leicht abkratzen. Um ihn vollkommen zu trocknen, verreibt man denselben im Achatmörser zu einem feinen Pulver und trocknet bei 70° bis zur Gewichtsconstanz. Der Farbstoff ist in Alkohol, Chloroform, Essigsäure, Epi- und Dichlorhydrin leicht löslich, schwerlöslich in Wasser, unlöslich in Benzol, Toluol, Ligroin, und Aether. Mit alkoholischer Pikrinsäurelösung wird er als amorpher braunrother Niederschlag ausgefällt. In Ammoniak und Kalilauge ist er mit gelber Farbe löslich, neutralisirt man die alkalische Lösung mit Salzsäure oder Essigsäure, so erscheint die rothe Farbe wieder. Durch Kochen mit concentrirter Salzsäure oder verdünnter Schwefelsäure wird der Farbstoff sehr langsam zersetzt, mit Zink und Salzsäure vollkommen zerstört.

Die Elementaranalyse des rothen Farbstoffes ergab folgende Werthe :

- | | |
|--|--|
| 1) 0.1106 g Substanz gaben 8 ccm. N bei 755 mm. und 16° | |
| 0.1376 g | 0.2842 CO ₂
und 0.0888 H ₂ O. |
| 2) 0.0534 g Substanz gaben 3.95 ccm. N bei 764 mm. und 16.9° | |
| 0.0316 g | 0.0651 CO ₂
und 0.0198 H ₂ O. |

1)	2)
C 56,31%	56,19%
H 7,23%	6,96%
N 8,39%	8,62%

Die daraus berechnete Formel C₈H₁₂O₃N, für eine solche Formel berechnet C 56,49%, H 7,06%, N 8,28%.

Die Molekularbestimmung ergab 275, die theoretisch berechnete 170.

1) Angewandte Substanz 0,3198	2) Angewandte Substanz 0,133
Siedepunkterhöhung 0,079	Siedepunkterhöhung 0,04
Lösungsmittel (Alkohol) 17,28	Lösungsmittel (Alkohol) 13,6
Molekulargewicht 269.	Molekulargewicht 281.
	Durchschnitt : 275.

Wie aus der experimentell gefundenen Molekulargewichtsbestimmung zu ersehen ist, muss die einfache Formel verdoppelt werden, ergibt sich also zu C₁₆H₂₄O₆N₂. Das Molekulargewicht für eine solche Formel berechnet gleich 340. Das durch den Versuch gefundene Molekulargewicht stimmt mit

dem theoretisch berechneten Werthe nicht überein. Der Grund für diesen Fehler liegt wohl darin, dass geringe Mengen des Farbstoffes ungelöst blieben und so die Bestimmung zu niedrig ausfiel. Welche Formel kommt nun dem neuen Körper zu? Betrachten wir zunächst den Verlauf der Reaction näher, so finden wir, dass der Dimethylamidobenzaldehyd sich mit dem unbekanntem Körper unter Wasseraustritt zu dem rothen Farbstoff vereinigt. Wir brauchen also nur den Rest $C_9H_{11}N$ (Dimethylamidobenzaldehyd $-O$) von $C_{16}H_{21}O_6N_2$ abzuziehen und 2 Atome Wasserstoff dazu addiren, um zu der Formel des unbekanntem Körpers zu kommen. Die Formel ergibt sich dann zu $C_7H_{13}O_6N$. Welche Constitution dem Körper zukommt, darüber lassen sich vorläufig nur Vermuthungen aufstellen. Die Formel $C_7H_{13}O_6N$ steht der des Glucosamins $C_6H_{13}O_5N$ am nächsten und unterscheidet sich nur durch einen Mehrgehalt von COH_2 von derselben. Ob der Körper ein Formylglucosamin oder das Acetylderivat des noch unbekanntem Pentosamins darstellt, darüber müssen weitere Untersuchungen entscheiden.

Zum Schlusse füge ich noch die spektroskopische Untersuchung des rothen Farbstoffes an, die ich der Güte des Herrn Dr. Formánek in Prag verdanke und dem ich auch an dieser Stelle bestens dafür danke. Herr Dr. Formánek theilte mir darüber Folgendes mit: Als ich die Lösung in die Eprouvette gebracht und vor den Spalt des beleuchteten Spektroskops gestellt habe, so beobachtete ich ein Absorptionsspektrum mit drei Stufen, und zwar auf λ 559, λ 510 und λ 492 (der stärkste Streifen). Es war die erste Phase des Spektrums. Allmählich aber änderte sich das Spektrum von selbst. Die Stufe λ 510 wurde stärker und die Stufe λ 492 wurde schwächer (II. Phase), bis endlich nach längerem Stehen die Stufen λ 559 und λ 492 verschwanden, während die Stufe λ 510 in verstärktem Maasse stehen blieb (III. Phase). Ich habe die Flasche im Dunkeln aufbewahrt und die Lösung nach einigen Tagen wieder untersucht; der Vorgang war derselbe und das Spektrum änderte sich genau wie im ersten Falle. Ich kann mir diese Erscheinung nur dadurch erklären,

dass vielleicht in Folge der Durchstrahlung mit dem starken Lichte durch die Eprouvette der Farbstoff sich veränderte und dadurch sein Spektrum. Die Lösung war rosaroth und fluorescirte grün. Als ich diese Lösung mit verdünnter Salpetersäure versetzte (auf 5 ccm. Farbstofflösung 3 Tropfen Salpetersäure 1 : 3), so wurde die Farbe intensiver und die Fluorescens verschwand. Im Spektrum zeigten sich 2 starke Absorptionsstreifen auf λ 559 und λ 492. Nach Zusatz von verdünntem Ammoniak (specifisches Gewicht 0,96, 1 : 5), und zwar auf 5 ccm. Farbstofflösung 3 Tropfen Ammoniak, wurde die Flüssigkeit orangegelb und im Spektrum zeigte sich ein schwacher Streifen auf 592,7.

Nach Zusatz von alkoholischer Kalilauge (1 : 10) wurde die Flüssigkeit gelb und es zeigte sich im Spektrum eine Stufe auf λ 492.

In der Zeichnung λ 559 = 11,25 der Millimeterskala

„ „ λ 510 = 13,90 „ „

„ „ λ 492 = 15,05 „ „