

Zur Kenntnis der Diazoreaktion des Eiweißes.

Von

Herm. Pauly.

(Der Redaktion zugegangen am 26. Mai 1915.)

Nachdem ich im Jahre 1904 festgestellt hatte, daß das Histidin nicht, wie vordem Fränkel angenommen hatte, sich vom Pyrimidin herleitet, sondern, daß ihm auf Grund seiner Reaktionen und Derivate kein anderes Ringsystem, als das des Imidazols zugrunde liegen könne, habe ich als erster die ursprünglich von Wallach am Imidazol geprüfte Diazoreaktion auf das Histidin und im Anschluß daran auf die übrigen Aminosäuren und die Proteine überhaupt angewandt.¹⁾ Ich konnte

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 42, S. 512 (1904). Da über die Geschichte dieser Reaktion vereinzelt eine gewisse Unklarheit zu bestehen scheint, so sei kurz an Folgendes erinnert. Die Diazoverbindungen und ihre Kupplungsfähigkeit mit gewissen aromatischen Verbindungen zu sogenannten Azofarbstoffen wurde im Jahre 1860 von Peter Griess entdeckt. Das Verhalten heterozyklischer Substanzen gegenüber Diazolösungen ist dagegen nach ihm von anderen Chemikern untersucht worden, so, wie erwähnt, das des Imidazols 1886 durch Wallach (und seine Schüler Rung und Behrend). Später hat dann auch Burian Azokörper aus Imidazolen und den ihnen nahe verwandten Purinen dargestellt (Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 37, S. 696 (1904)). Auf der andern Seite empfahl schon im Jahre 1882 P. Ehrlich die Farbstoffbildung mit Diazobenzolsulfosäure zur Harnuntersuchung in gewissen pathologischen Fällen, ohne indes einen Anhalt zu haben, durch welcherlei Art von im Harn anwesenden Stoffen die erstere herbeigeführt werde. Dies ist auch heute bekanntlich noch ziemlich unaufgeklärt, wengleich in neuerer Zeit ermittelt worden ist, daß das sogenannte Urochromogen, das als der Träger der Ehrlichschen Harnprobe angesehen wird, von oxyproteinsäureähnlichem Charakter ist. Daher kann es wohl nicht zweifelhaft sein, daß mit klarer Einsicht in ihre chemische Wirkungsweise ich zuerst die Diazoreaktion auf das Gebiet des Eiweißes und seiner Spaltkörper übertragen habe. Wenn sich also z. B. in dem Biochemischen Handlexikon von Abderhalden (Bd. 4, S. 715) eine Bemerkung findet, wie: «das Histidin kann durch die Diazoreaktion von Ehrlich und Burian nachgewiesen werden, so ist eine solche schief und berichtigungsbedürftig».

zeigen, daß von allen bekannten Aminosäuren nur zwei befähigt sind, echte Farbstoffe zu bilden, nämlich das Histidin und das Tyrosin. Zugleich wies ich auf die chemische Ursache dieser Erscheinung hin, die in dem Vorhandensein eines ein bewegliches Wasserstoffatom tragenden «Heteroatomes» an den ungesättigten Ringsystemen, wie Phenol und Imidazol, zu suchen sei.¹⁾ Die Übertragung der Reaktion auf Proteine ergab dann, daß es möglich ist, Tyrosin und Histidin auch nachzuweisen, wenn sie sich noch im festen Verbands befinden, denn alle, eine der beiden oder beide Aminosäuren enthaltenden Eiweißkörper zeigten die Rotfärbung deutlich, die übrigen färbten sich gleich den anderen Aminosäuren rein gelb. Eine Unterscheidung zwischen Tyrosin und Histidin ermöglichte die Hinzuziehung der Reaktion von Millon.²⁾ Somit war in der Diazoreaktion eine neue, durch hohe Empfindlichkeit sich auszeichnende Eiweißprobe gefunden, die den bis dahin bekannten sich ebenbürtig an die Seite stellen konnte, denn Proteine, die kein Tyrosin oder Histidin enthielten, kennt man, sicher wenigstens, bis heute nur unter den eine Sonderklasse bildenden Protaminen.

Auf Grund der gemachten Feststellungen ergab sich als weiterer Schluß, daß die länger schon der Farbentechnik bekannten Färbungen, die tierische Wolle und Seide mit alkalischen Diazolösungen annehmen, in der Hauptsache auf den

¹⁾ Man sollte erwarten, daß auch bei dem ein derartiges Ringsystem führenden Tryptophan die Diazoprobe positiv ausfiel. Hier liegt aber die Sache so, daß man zwar mit dem Grundringsystem, dem Indol, eine Färbung bekommt, dagegen nicht mit den β -substituierten Derivaten desselben; infolgedessen ist der Alaninrest auch im Tryptophan der Reaktion hinderlich (Vgl. Pauly und Gundermann, Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 41, S. 4004, Anm. 3 (1909).

²⁾ Bei dieser Gelegenheit sei eine kleine, bisweilen vorteilhafte Abänderung der Millonschen Reaktion mitgeteilt. Sie besteht darin, daß man die Mischung (nach Nasse bereitet) in wenigen Tropfen vorsichtig über konzentrierte Schwefelsäure schichtet, wie bei der Prüfung auf Salpetersäure und dann von der fraglichen Substanz zugibt. Nach kurzer Zeit verrät sich anwesendes Tyrosin ohne vorheriges Erwärmen beim ruhigen Liegen des Reagensglases durch das Auftreten braunvioletter Färbungen an der Oberfläche der Flüssigkeit.

hohen Gehalt an Tyrosin in der Faser zurückzuführen sind.¹⁾ (Daß sich die auf der tierischen Faser mit frischbereiteter, sodaalkalischer Diazobenzolulfosäure erzeugten Färbungen zu einem recht augenfälligen Vorlesungsversuch für den Nachweis des Vorhandenseins von Tyrosin im Eiweiß der Faser eignen, bedarf kaum besonders hervorgehoben zu werden.)

Eine feinere analytische Ausbildung erfuhr die Diazo-reaktion in der Folge durch A. Kossel und seine Mitarbeiter. Er benutzte sie zunächst, um sein bekanntes Trennungsvor-
fahren von Histidin und Arginin bequemer zu gestalten.²⁾

Hirayama³⁾ führte dann in das Sturin die Benzol- oder Naphthalinsulfogruppe ein und fand, daß dadurch der von mir an dem genuinen Protamin festgestellte positive Ausfall der Reaktion ausblieb. Da einerseits nur Imidazole mit freier Imidgruppe kuppeln, andererseits Sulfochloride das Wasserstoffatom der Imidgruppe unter Ersatz durch den Sulfoest entfernt, so führte dies zu dem Schlusse, daß im Sturin die Imidazolkerne frei sind. Das deckte sich mit dem Ergebnis der gleichzeitig von mir vorgenommenen Jodierung des Sturins.

Inouye,⁴⁾ der sich mit der Unterscheidung von Histidin und Tyrosin befaßte, stellte die interessante Tatsache fest, daß Histidin im eiweißartigen Verbands bei der Benzoylierung nach Schotten-Baumann zerstört wird, dagegen im freien Zustande nicht. Infolgedessen kann man nach vorausgegangener Benzoylierung mit Hilfe der Diazo-reaktion wohl freies Histidin von freiem Tyrosin (das in ein nicht reagierendes Dibenzoylat übergeführt wird) unterscheiden, nicht jedoch gebundenes Histidin von gebundenem Tyrosin. Andererseits bietet die Methode einen Weg, fermentativ sich abspaltendes Histidin von noch verkettetem zu unterscheiden und so den Gang der Hydrolyse zu verfolgen.

Der Grund der Beständigkeit des ersteren ist nach A. Kossel und Edlbacher⁴⁾ in dem Vorhandensein der freien Carboxylgruppe zu suchen, die auf den Imidazolring eine noch

¹⁾ H. Pauly und A. Binz, Zeitschrift für Farben- und Textilindustrie, III, H. 20 (1904).

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 49, S. 301—321 (1907).

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 59, S. 285 (1909).

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 83, S. 79 (1913).

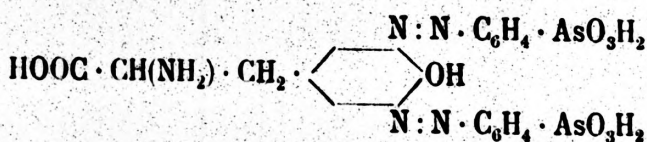
unaufgeklärte Schutzwirkung ausübt. Ist hingegen das Carboxyl aus irgend einem Grunde unwirksam geworden, sei es auf künstlichem Wege durch Veresterung oder auf natürlichem durch eiweißartige Verkettung, so erleidet der Ring die gleiche Auflösung bei der Benzoylierung, wie das Imidazol selbst und die Diazoreaktion bleibt infolgedessen aus.

Aus alledem erhellt wohl zur Genüge deren vielseitige Verwendungsmöglichkeit bei der qualitativen und quantitativen Untersuchung von Proteinen und ihren Abbaukörpern. Es schien deswegen wünschenswert, zu wissen, wie die aus Tyrosin und Histidin sich bildenden Azofarbstoffe zusammengesetzt sind. Nun hätte es zwar nahegelegen, aus den durch Diazobenzolsulfosäure erhältlichen Farbstofflösungen die zugehörigen Farbstoffe abzuscheiden, allein es erwiesen sich diese als ziemlich leichtlöslich, sodaß ihre Reinigung unbequem war.

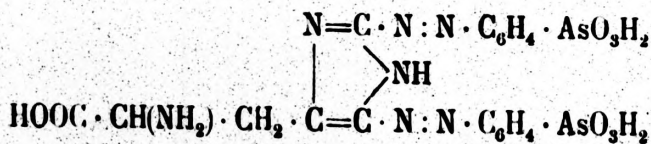
Nimmt man aber an Stelle von Diazobenzolsulfosäure Diazobenzolarsinsäure, die man aus dem im Handel befindlichen «Atoxyl», dem Natriumsalz der Arsanilsäure, sich leicht bereiten kann, so zeichnen sich die Azofarbstoffe der beiden Aminosäuren durch sehr geringe Löslichkeit in Wasser aus und kommen, soweit Analysen und Aussehen der mikrokristallinen Massen diesen Schluß gestatten, sofort bei der Abscheidung rein heraus.

Aus den erhaltenen Analysenwerten folgt, daß sowohl Tyrosin wie auch Histidin mit der Diazoverbindung im Verhältnis von 1 : 2 zusammentreten, und da beide Aminosäuren mehrere Angriffspunkte in ihrem Molekül besitzen, so fragt es sich, wo die farbstoffbildenden Radikale eintreten. Entweder können sie sich mit den Amin- und Imingruppen verbinden, dann liegen sogenannte Diazoaminverbindungen vor, oder sie ersetzen Wasserstoffe der Ringkohlenstoffatome, dann haben wir echte Azofarbstoffe, oder es kann endlich beides stattfinden unter Bildung gemischter Diazoazokörper. Ohne nähere Untersuchung ist diese Frage natürlich nicht definitiv zu entscheiden, doch spricht die Beständigkeit der Farbstoffe beim Kochen mit verdünnter Salzsäure dafür, daß sogenannte Kern-, d. h. C-Bindung erfolgt ist. Es ist nämlich gerade in neuerer

Zeit auf die außerordentliche Unbeständigkeit der mit aliphatischen Resten verknüpften Diazoaminoverbindungen hingewiesen worden,¹⁾ die schon bei der Berührung mit lauwarmem Wasser unter Entwicklung von gasförmigem Stickstoff zerfallen, mit verdünnter Mineralsäure dies aber schon in der Kälte tun. Auf den gleichen Umstand habe ich bezüglich der Verkettung an dem Imidazolimidrest schon früher hinzuweisen Gelegenheit gehabt.²⁾ Vielmehr deutet der kräftige Farbenton und die deutlich amphotere, an saure Aminosäuren, wie Asparaginsäure, erinnernde Natur der Farbstoffe ebenfalls auf Kohlenstoffbindung hin. Somit mögen den aus Tyrosin und Histidin hervorgegangenen Farbstoffen Formeln, wie

Tyrosin-*bis*-azobenzolarsinsäure

und

Histidin-*bis*-azobenzolarsinsäure

zukommen. Hinsichtlich ihrer Nuance gleichen sie den entsprechenden, bisher nur in Lösung erhaltenen Sulfonsäuren, indem (in saurem Bade) der Tyrosinfarbstoff auf Seide einen aurantiaähnlichen Goldton, derjenige aus Histidin ein stark nach Rot neigendes, mattes Gelb erzeugt. In Alkalien lösen sich die Farbstoffe mit bräunlichroter, bezw. kirschroter Farbe. Die Ausbeuten erreichen kaum 20% der Theorie; sie scheinen infolge von Nebenreaktionen und Bildung unbeständiger Verbindungen heruntergedrückt zu werden, denn sowohl bei der Bildung, wie bei der Abscheidung der Farbstoffe durch Säuren beobachtet man reichliche Stickstoffentwicklung.

Die Bereitung der Farbkörper geschah ziemlich in der gleichen Weise, indem eine aus 20 Millimolgramm (5,7 g) Atoxyl in 35 ccm Wasser hergestellte Lösung erst mit 36 ccm

¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 36, S. 911 (1903).

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 44, S. 159 (1905).

n-Salzsäure (Ausscheidung freier Säure) und dann tropfenweise mit 90 ccm $\frac{n}{5}$ -Natriumnitritlösung versetzt, und die so nach einhalbstündiger Einwirkung entstandene Diazomischung zu der alkalischen Lösung von 10 Millimolgramm der betreffenden Aminosäure gegeben wurde. Letztere war im Falle des Tyrosins bereitet aus 1,8 g desselben, 10 ccm n-Natronlauge und 20 ccm gesättigter Natriumacetatlösung, im Falle des Histidins aus 2 g Chlorhydrat, 35 ccm gesättigter Soda- und 20 ccm gesättigter Natriumacetatlösung. Nach etwa 2 Stunden wurden die entstandenen Farbstofflösungen in verdünnte Salzsäure einlaufen gelassen, wodurch sich die Farbstoffe abschieden. Es darf hierbei die Konzentration der Säure, namentlich zu Anfang, nicht zu groß sein; auch muß ihre Menge eine begrenzte sein, weil die Farbstoffe infolge ihres amphoteren Charakters sich sonst wieder lösen. Es kamen zur Verwendung im Falle des Tyrosins 45 ccm n-Salzsäure, im Falle des Histidins 25 ccm $\frac{n}{5}$ -Salzsäure, von denen ein kleiner Teil zu Anfang etwas stärker verdünnt benutzt wurde, weil sonst der Farbstoff sich leicht harzig abscheidet. Nach dem Absaugen wurden beide Farbstoffe gut mit Wasser und schließlich mit Alkohol und Äther ausgewaschen. Sie kamen dann nach mehrtägigem Verweilen im Vakuum über Schwefelsäure zur Analyse. Erhalten wurden jeweils 1,2–1,5 g. Die Substanzen waren chlor- und natriumfrei.

Tyrosin-bis-azobenzolarsinsäure:

0,1120 g gaben 0,0512 g $Mg_2As_2O_7$;

0,1826 g gaben 0,0846 g $Mg_2As_2O_7$;

0,2028 g gaben 0,0928 g $Mg_2As_2O_7$;

0,1767 g gaben 0,2391 g CO_2 und 0,0584 g H_2O ;

0,4106 g verloren bei 103° 0,0216 g H_2O .

Berechnet für $C_9H_9O_3N$ ($N:N \cdot C_6H_4 \cdot AsO_3H_2$)₂ + 2 H_2O :

As 22,3%, C 37,4%, H 3,7%, H_2O 5,3%.

Gefunden: As 22,1%, 22,4%, 22,0%; C 36,9%; H 3,7%; H_2O 5,3%.

Histidin-bis-azobenzolarsinsäure.

0,1974 g gaben 0,1014 g $Mg_2As_2O_7$;

0,2589 g gaben 0,3428 g CO_2 und 0,0825 g H_2O .

Berechnet für $C_8H_9O_2N_3$ ($N:N \cdot C_6H_4 \cdot AsO_3H_2$)₂:

As 24,5%, C 35,4%, H 3,1%.

Gefunden: As 24,8%, C 36,0%, H 3,5%.

Beide Farbstoffe bilden hellbraune in Wasser sehr wenig, in organischen indifferenten Lösungsmitteln nicht lösliche mikrokristallinische Pulver. Sie sind in mehr als 6fach normaler Salzsäure mit gelbbrauner Farbe klar löslich, mit Alkalien bilden sie kräftig rotgefärbte Lösungen. Beim Kochen mit stärkerer Säure entwickeln sie keine nennenswerte Menge Stickstoff und verändern auch den Farbenton nicht.

Bei diesen Versuchen bin ich von Herrn Karl Lockemann in dankenswerter Weise unterstützt worden.

Würzburg, im Mai 1915.
