

Über den Nachweis von nativem Eiweiss mit pH-Indicatoren. II.⁽¹⁾

Von Morizo ISHIDATE und Takeichi SAKAGUCHI.

(Eingegangen am 7. März 1942.)

Um den Mechanismus der Nachweisreaktion von nativem Eiweiss mit Farbstoffen näher zu studieren, haben wir nun von neuem etwa 30 verschiedene Farbstoffen, welche in bestimmtem pH-Bereiche einen deutlichen Farbumschlag aufweisen, mit derselben Reaktionsbedingung wie vorher untersucht. Hierbei erweisen sich die halogenierten Fluorescein-abkömmlinge, Eosin, Cyanosin, Erythrosin, Phloxin, Rose Bengale, und die halogenierten Oxyphenylmethanderivate wie Tetrabrombenzaurin und Tetrabromrosolsäure, und noch dazu Hexanitrodiphenylamin (Aurantia) als hoch empfindliche Indikatoren gegen Eiweissklassen. Dagegen auf Pepton, Aminosäuren sowohl auch auf die anderen makromolekularen Substanzen zeigen sie weit geringere Affinität, weshalb sie fast ebenso wie das Feiglschen Reagenz (Tetrabromphenolphthaleinäthylester) zweckmässige Eiweissindikatoren darstellen (vergl. Tafel 1 bezw. 2). Die Anwendbarkeit dieser Farbstoffe zum Nachweis der Eiweissstoffe ist damit eng verbunden, dass sie bekanntlich zum Farben von Seide und zum Wolldruck Verwendung finden.

Es wird dieses Mal auch angenommen, dass die reaktionsfähigen Farbstoffe ihre Umschlagsgebiete ausnahmslos in saurerer Seite besitzen. So ist es nicht verwunderlich, dass unter den Phenolphthaleinabkömmlingen Phenolphthalein selbst ($\text{pH}=8.3-10.0$), sein Methylester (8.0-9.4) und Tetrabromphenolphthalein (6.8-7.8) (I) gegen Eiweiss ganz negative Reaktion ergeben, dagegen Tetranitrophenolphthalein (1.6-3.0) (III) wie auch sein Ester (1.6-3.2) (IV) eine deutliche positive Reaktion aufweisen, und Tetrabromphenolphthalein-äthylester sowie methylester (3.5-4.9) (II) sehr wertvolle Indikatoren darstellen. Dieselbe Verhältnisse weisen auch die Fluorescein-derivate und die Oxyphenylmethanfarbstoffe auf. Also in Gegensatz zu Fluorescein (3.6-5.6) und seinen Methylester (4.0-6.2) bezw. Benzaurin (6.5-8.6) und Rosolsäure (6.9-8.0) sind ihre halogenierte Abkömmlinge Eosin (VI), Eosinmethylester (VII), Cyanosin, Erythrosin u.s.w. bezw. Tetrabrombenzaurin (V) und Tetrabromrosolsäure stark reaktionsfähig.

Der Eintritt von Halogenen bzw. Nitrogruppen in die zwei Phenolkerne befördert die Dissoziation des betreffenden Phenols, infolgedessen wird der Farbumschlag des Farbstoffs stark nach der saueren Seite hin verschoben. Wenn einmal eines der beiden Hydroxyle methyliert wird, so wandelt sich der Farbstoff in einen reaktionslosen Stoff um. Es ist daher höchst wahrscheinlich, dass dieser geförderte Dissoziationsgrad des phenolischen Hydroxyls zur Funktion der Eiweissreaktion eine wesentliche Rolle spielt. Ob das Carboxyl am Phthalsäurereste frei oder methyl-

(1) M. Ishidate und T. Sakaguchi, *Ber.*, **74** (1941), 163.

Tafel 1.

Nr.	Indikator	Umschlagsgebiet (pH)		Grenzkonzentration (%)				Verratlösung des Indik. (A= Alkohol, W= Wasser) und der geeign. Säure.
		Farbe Sauer	Alkalisch	Casein	Hämog- lobin	Oval- bumin	Gelatin	
1.	Tetrabromphenol- phthaleinmethyl- ester (Aut.)	3.5 — 4.9*) gelb	— 4.9*) blau	0.004	0.004	0.005	0.004	0.1% A 0.2 N CH ₃ COOH
2.	Eosin (Merck)	0.0 — 3.0 orange	— 3.0 rosarot	0.0025	0.0025	0.005	0.005	0.1% W 0.1 N HCl
3.	Phloxin (Merck)	1.4 — 3.6*) farblos	— 3.6*) rot	0.0005	0.0025	0.005	0.0025	0.05% W 0.1 N HCl
4.	Cyanosin (Grüber)	1.5 — 3.0 farblos	— 3.0 rot	0.0005	0.0025	0.005	0.005	0.05% W 0.1 N HCl
5.	Erythrosin (Merck)	0.0 — 3.6*) farblos	— 3.6*) rot	0.001	0.005	0.005	0.0025	0.05% W 0.1 N HCl
6.	Rose Bengale (Grüber)	2.2 — 2.8*) farblos	— 2.8*) rot	0.001	0.0025	0.005	0.005	0.05% W 0.1 N HCl
7.	Eosinmethylester (Aut.)	1.4 — 3.0*) farblos	— 3.0*) rot	0.005	0.005	0.005	0.005	0.1% W 0.1 N HCl
8.	Jodeosin (Takeda)	0.5 — 5.5*) orange	— 5.5*) rot	0.01	0.005	0.005	0.01	0.1% W 0.1 N HCl
9.	Tetranitrophenol- phthalein (Aut.)	1.6 — 3.2*) farblos	— 3.2*) gelb	0.02	0.02	0.02	1.0	0.1% W 0.2 N CH ₃ COOH
10.	Tetranitrophenol- phthaleinmethyl- ester (Aut.)	1.6 — 3.2*) farblos	— 3.2*) gelb	0.05	0.02	0.05	0.2	0.1% W 0.2 N CH ₃ COOH
11.	Tetrabrombenz- aurin (Aut.)	3.9 — 5.4*) gelb	— 5.4*) blau	0.005	0.01	0.005	0.02	0.1% A 0.2 N CH ₃ COOH
12.	Tetrabromrosol- säure (Aut.)	2.7 — 5.2*) gelb- orange	— 5.2*) violett	0.01	0.01	0.005	0.005	0.04% W 0.2 N CH ₃ COOH
13.	Aurantia (Grüber)	1.5 — 2.8*) gelb	— 2.8*) orange	0.001	0.0025	0.005	0.005	0.05% W 0.1 N HCl

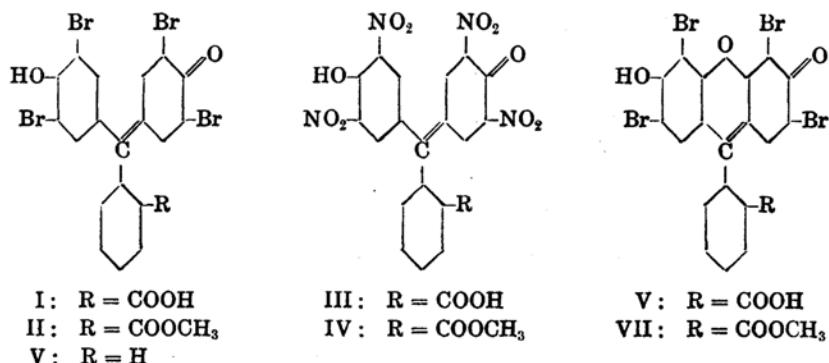
*) Das Umschlagsgebiet wurde von uns colorimetrisch mit der Pufferlösung bestimmt.

Tafel 2.

Indikator	Grenzkonzentration (%)									
	Nr.	Pepton	Glycyl- glycin	Glyko- koll	Phenyl- alanin	Tyro- sin	<i>l</i> -Trypto- phan	Seife	Gummi- arabi- cum	Stärke Agar-Agar u. Lecithine
1	0.2	0.5	5.0	0.5	0.1	0.25	0.5	2.0	2.0(—)
2	0.2	1.0	2.0	1.0	0.7	0.05	0.5	0.5	2.0(—)
3	0.05	0.25	1.0	1.0	0.1	0.25	1.0	0.25	2.0(—)
4	0.05	0.1	0.5	0.5	0.25	0.05	0.5	0.25	2.0(—)
5	0.05	0.5	2.0	1.0	0.3	0.25	0.5	0.25	2.0(—)
6	0.05	0.25	1.0	1.0	0.25	0.25	0.5	0.5	2.0(—)
7	0.05	2.5	2.0	1.0	0.1	0.1	0.5	0.5	2.0(—)
8	0.1	5.0	2.0	1.0	0.25	0.1	2.5	2.0	2.0(—)
11	0.25	2.0	5.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0(—)
12	0.1	1.0	1.0	1.0	1.0	0.5	0.2	0.5	2.0(—)
13	0.1	0.5	1.0	1.0	0.025	0.05	0.5	0.5	2.0(—)

(—): Zeigt eine ganz negative Reaktion bei der betreffenden Konzentration.

iert, ob der Phthalsäurerest halogeniert ist oder nicht, übt keinen nennenswerten Einfluss auf das Wesen der Reaktion, mit der Voraussetzung davon, dass durch Esterifizierung des Carboxyls der Umschlagsbereich des betreffenden Farbstoffs sich nicht weiter hin verschiebt, was in der Regel der Fall ist. Überdies dass das Vorhandensein von der Carboxylgruppe am Phthalsäurerest funktionell wenige Bedeutung hat, ist daraus ersichtlich, dass bromierte Benzaurin und Rosolsäure sich auch als die stark reaktionsfähigen Farbstoffe vorstellen.



In der vorigen Abhandlung⁽¹⁾ haben wir schon die Annahme geäussert, dass die Reaktionsintensität zwischen Protein und Indikatoren viel mehr mit dem dissoziierten Anteil des gelösten Proteinmoleküls als mit der gesammten Konzentration der beiden Komponenten in Zusammenhang steht. Hiermit kann man den Mechanismus der Reaktion so erklären, dass sich der alkalisch gefärbte Farbstoff vornehmlich an der Stellung seines dissozierten Anions (Phenolanion und derartigen) mit dem kathionischen Zentrum des dissozierten Eiweismoleküls verbindet, wobei die Bindung genug beständig ist, in mässig saurer Lösung noch einen ursprünglichen alkalischen Farbton zu behalten. Die Bindungsform dürfte wohl folgendermassen als eine ionische Verbindung angesehen werden sein, die einen verhältnismässig schwachen Dissoziationsgrad besitzen.



Bei der Ausführung der Tüpfelreaktion sauert man in der Regel das Gemisch von Eiweisslösung und Farbstoffen an. Sauert man dagegen Eiweisslösung zuerst an und fügt dann Farbstoffe hinzu, so wird die Empfindlichkeit der Reaktion stark verringert. Diese Tatsache würde für die erwähnte Erklärung eine wertvolle Stütze liefern können.

Fast alle genannten Eiweissindikatoren zeigen auch eine ähnliche Affinität sowohl gegen kolloidale Silber-halogenide und -cyanide, als auch gegen Silberion selbst. Es ist bekannt, dass Flourescein,⁽²⁾ Dichlorfluorescein⁽³⁾ und Eosin⁽²⁾ bei Argentmetrie zum Adsorptionsindikator Anwen-

(2) Fajans u. Wolff, *Z. anorg. allg. chem.*, **137** (1924), 221.

(3) Kolthoff u. Laur, *J. Am. Chem. Soc.*, **51** (1929), 3273.

dung finden und zwar die letzteren zwei wohl in schwach saurerer Lösung verwendet werden. Die Eiweissindikatoren lassen sich ohne weiteres in mehr oder weniger saurerer Lösung als geeignete Adsorptionsindikatoren aufweisen, was darauf beruht, dass die am Titrationssende entstehende Verbindung $(\text{AgCl} \cdot \text{Ag})^+$, $(\text{I})^-$ bzw. $(\text{Ag})^+ + (\text{I})^-$ in mässig sauerem Medium recht beständig ist, folglich die Lösung bzw. die Fällung am Titrationsspunkt scharf angefärbt wird. Über deren praktische Anwendung werden wir später eingehend berichten. Dieses Verhalten der Farbstoffe gegen Silbermizellen würde die Annahme weiter stützen, dass bei der Eiweissreaktion der aktive Stellung im Proteinmolekül eine positiv geladene Stickstoffgruppe ist.

Endlich wollen wir noch zufügen, dass diese Affinität des Proteinmoleküls mit Farbstoffen, wenn auch in schwächeren Grad, auch nach Desaminieren mittels Salpetrigsäure erhalten bleibt.

Beschreibung der Versuche.

1. Bestimmung der Grenzkonzentration der Eiweissarten (Tafel 1). Die Bestimmung wurde wie vorher mittels der Tüpfelreaktion durchgeführt. Tetrabromphenolphthalein (Umschlagsgebiet $\text{pH}=6.8-7.8$), Phenolphthaleinmethylester (8.0-9.4), Fluorescein (3.6-5.6), Fluoresceinmethylester (4.0-6.2) lassen sich gegen 0.2% Ovalbumin, Casein und 1% Gelatin-lösung, und Benzaurin (6.5-8.6), Rosolsäure (6.9-8.0) und Dichlorindophenol (4.2-6.3) gegen 1% Ovalbumin, Casein, Hämoglobin und 5% Gelatin als reaktionsnegativ erweisen. Bei den folgenden Farbstoffreihen, die in einer sauren oder alkalischen Seite ein Umschlagsgebiet besitzen, wurde die Reaktion gegen 0.2% Ovalbumin auch als wirkungslos nachgewiesen: Alizarinrot, Anilinbraun, Benzpurpurin B, Brilliant-Kresilblau, Buttergelb, Chrysoidin, Cyanin, Hämatoxylin, Indigocarmin, Neutralviolet, Nilblau A, Orang G, Patentblau A, Protsil Sol, Pyronin G, Säurefuchsin und Wasserblau.

2. Tafel 2. ergibt die Grenzkonzentration des Peptons und der einigen Aminosäuren, und auch die Empfindlichkeiten gegen den einigen kolloidalen Lösungen. Wobei zeigt Pepton verhältnismässig höhere Affinität, was möglich darauf zurückzuführen ist, dass das Präparat noch gewissermassen Eiweiss enthält.

3. Darstellung der Farbstoffen. *Tetrabromphenolphthalin:* Dargestellt nach Baeyer⁽⁴⁾. Die farblose Kristalle, umgelöst mehrmal aus Alkohol, schmelzen bei 294°. (nach Baeyer: Schmp. 220-230°). $C_{20}\text{H}_{10}\text{O}_4\text{Br}_4$ Ber. Br 50.44, Gef. Br 50.48, 50.58.

Kaliumsalz des Tetrabromphenolphthaleinmethylesters: Hergestellt durch Oxydation des Tetrabromphenolphthalinmethylester mit alkalischen Ferricyankalium. Es stellt ein tief blauviolettes, in Wasser schwer lösliches Pulver dar. Das ausgangsmaterial Tetrabromphenolphthalinesters wurde durch Bromierung des Phenolphthaleinesters in Eisessig dargestellt. Es stellt prismatische Kristalle von Schmp. 193° ($C_{21}\text{H}_{12}\text{O}_4\text{Br}_4$: Ber. Br 49.18, Gef. Br 49.38).

chinoid-Tetrabromphenolphthaleinmethylester-monomethyläther: Dargestellt durch Einwirkung von Diazomethan mit Tetrabromphenolphthalein methylester in der Aetherlösung. Das Substanz der Reinigung schwer zugänglich, schmilzt bei etwa 130-135° u. Zers., $C_{22}\text{H}_{14}\text{O}_4\text{Br}_4$: Ber. Br 48.29, Gef. Br 44.14.

Tetranitrophthalinmethylester. Phenolphthaleinmethylester wurde mit konz. Schwefelsäure und Salpetersäure behandelt. Beim Zusatz von Wasser scheidet der Nitrokörper ab, der beim Umlösen aus Eisessig einen gelblichen feinen Kristall von Schmp. 266° liefert. $C_{21}\text{H}_{12}\text{O}_{12}\text{N}_4$ Ber. N 10.94, Gef. N 11.26.

(*Pharmazeutisches Institut der kaiserl. Universität Tokio.*)