

Über Aminosäure-(phenylazo)-phenyl-Derivate. XIX¹⁾

Lichtabsorption und Struktur von Aminosäure-4-(phenylazo)-phenylamiden

Von A. BARTH und K.-H. HOFFMANN

Mit 1 Abbildung

Inhaltsübersicht

PAP-amin erfährt durch Ansäuern eine Farbvertiefung von gelb nach rot. Die sauren Lösungen absorbieren bei 500 nm maximal. Bei den Aminosäure-PAP-amiden erfolgt der gleiche Übergang durch Ansäuern in wäßriger Lösung nur schwer, in schwächer polaren Lösungsmitteln dagegen leichter. Das Absorptionsmaximum im sauren Bereich liegt hier bei 470 nm. Die Rotfärbung der Aminosäure-PAP-amide in saurer Lösung sowie die ebenfalls rote Farbe der Aminosäure-PAP-amid-hydrobromide wird auf eine durch Protonisierung an der Azogruppe stabilisierte chinoide Struktur zurückgeführt.

Nachdem BARTH und SCHWENK²⁾ die enzymatische Hydrolyse von L-Alanin-4-(phenylazo)-phenylamid (L-Ala-PAP-amid) histochemisch festgestellt hatten, lag es nahe, diese Substanz methodisch für die Aktivitätsbestimmung von Proteasen nutzbar zu machen³⁾⁴⁾. Das bei der proteolytischen Spaltung des genannten Substrats freigesetzte PAP-amin (p-Aminoazobenzol) besitzt gleich vielen anderen aromatischen Azoverbindungen, welche saure oder basische Substituenten enthalten, eine Indikatorwirkung. Die gelbe Lösung des PAP-amins erfährt beim Ansäuern einen Farbumschlag nach rot. Diese Tatsache bildet die Voraussetzung zur quantitativen Bestimmung des Hydrolysegrades der Aminosäure-PAP-amide. Die sauren PAP-amin-Lösungen besitzen ein Absorptionsmaximum bei 500 nm, dessen Höhe der Wasserstoffionenkonzentration proportional ist, während die Absorption der Substrate in gewissen Grenzen davon unabhängig ist. Die

¹⁾ XVIII. Mitt.: A. BARTH u. K.-H. HOFFMANN, *Flora (Jena) Abt. A* **158**, 114 (1967).

²⁾ A. BARTH u. P. SCHWENK, *J. prakt. Chem.* (4) **32**, 130 (1966).

³⁾ A. BARTH, K.-H. HOFFMANN u. I. PILCH, *Biol. Chem. Zbl.* im Druck.

⁴⁾ A. BARTH, K.-H. HOFFMANN u. I. PILCH, *Acta biol. med. german.* **16**, 575 (1966).

Bandenlage des Farbstoffs hängt nicht vom Anion ab. Seine Grünabsorption in saurer Lösung ist somit lediglich eine Frage der Protonisierung, die nach heutiger Kenntnis an der Azogruppe unter Ausbildung einer chinoiden Struktur erfolgt und somit den Farbumschlag erklärt.

Es wurde versucht, die Ermittlung der Ursache eines analogen Verhaltens der Aminosäure-PAP-amide zur Klärung der Struktur der als Substrate eigentlich eingesetzten festen, roten, im allgemeinen leicht wasserlöslichen Hydrobromide dieser Verbindungen zu benutzen.

Mittels peptidsynthetischer Methoden wurden die Hydrobromide der PAP-amide folgender Aminosäuren hergestellt: Glycin, L-Alanin, β -Alanin, α -Aminoisobuttersäure, L-Valin, L-Norvalin, L-Leucin, L-Phenylalanin, L-Glutaminsäure (α), S-Benzyl-L-cystein, L-Lysin und α -Aminocyclohexancarbonsäure. Obwohl auf ein Molekül Aminosäure-PAP-amid durchschnittlich zwei Moleküle Bromwasserstoff entfallen, ist die Stöchiometrie meist nicht ganzzahlig⁵⁾. Es war festzustellen, daß sich mit zunehmendem Bromwasserstoffgehalt die rote Farbe der Hydrobromide vertieft, welche beim Benetzen der festen Substanzen mit Wasser sofort in gelb umschlägt. Dieser Tatsache entspricht eine vom kurz- zum langwelligen Bereich abnehmende Lichtabsorption. Bei 500 nm überschreiten die molaren Extinktionskoeffizienten in keinem Fall 300 cm²/mMol. Damit ist auch die Voraussetzung zur möglichst genauen Bestimmung des freigesetzten Farbstoffs neben nicht umgesetztem Substrat gegeben.

Das Absorptionsspektrum der Aminosäure-PAP-amide verändert sich in wäßriger Lösung durch Trichloressigsäure in Konzentrationen bis zu 10% nicht. Verglichen mit dem Ansteigen der Absorption des PAP-amins mit zunehmender Säurekonzentration drängte sich die Vermutung auf, daß das andersartige Verhalten der Aminosäure-PAP-amide hauptsächlich eine Frage der Basizität in Abhängigkeit von der Polarität des Lösungsmittels ist.

Zur Überprüfung wurde freies DL-Phenylalanin-PAP-amid in absol., 98- und 70%iger Essigsäure gelöst. Die Lösungen besaßen eine gelbe Farbe. Dann wurde mit Bromwasserstoff/Eisessig mit steigendem Bromwasserstoffgehalt versetzt. Dabei ergab sich allmählich Rotfärbung der Lösungen und die Herausbildung einer Absorptionsbande bei 470 nm. In Abhängigkeit vom Charakter des Mediums wurden aber Unterschiede festgestellt (Abb. 1).

Mit zunehmendem Wassergehalt im Lösungsmittel sind höhere Bromwasserstoffkonzentrationen nötig, um die Ausbildung des Absorptionsmaximums bei 470 nm und eine Erhöhung der Absorptionsintensität bei dieser

⁵⁾ A. BARTH u. K.-H. HOFFMANN, Flora (Jena) Abt. A 157, 524 (1967).

Wellenlänge zu erreichen. Dabei ist charakteristisch, daß schon ein geringer Wasseranteil (verglichen mit 30%) die Rotfärbung durch Bromwasserstoff erheblich mehr erschwert als weitere Erhöhung des Wasseranteils.

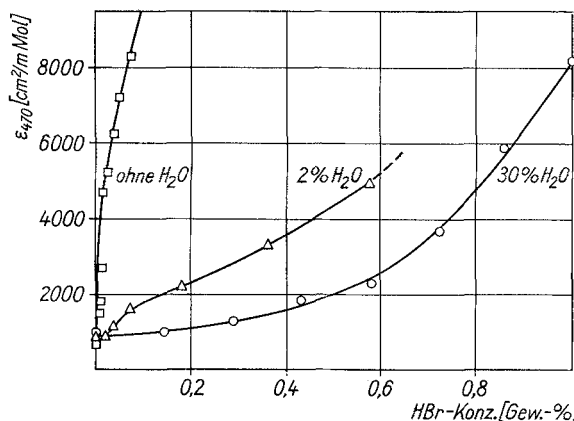


Abb. 1.
Abhängigkeit der ϵ_{470} -Werte von freiem DL-Phe-PAP-amid, $10^{-4}M$, in Eisessig, 98- sowie 70proz. Essigsäure von der Bromwasserstoffkonzentration

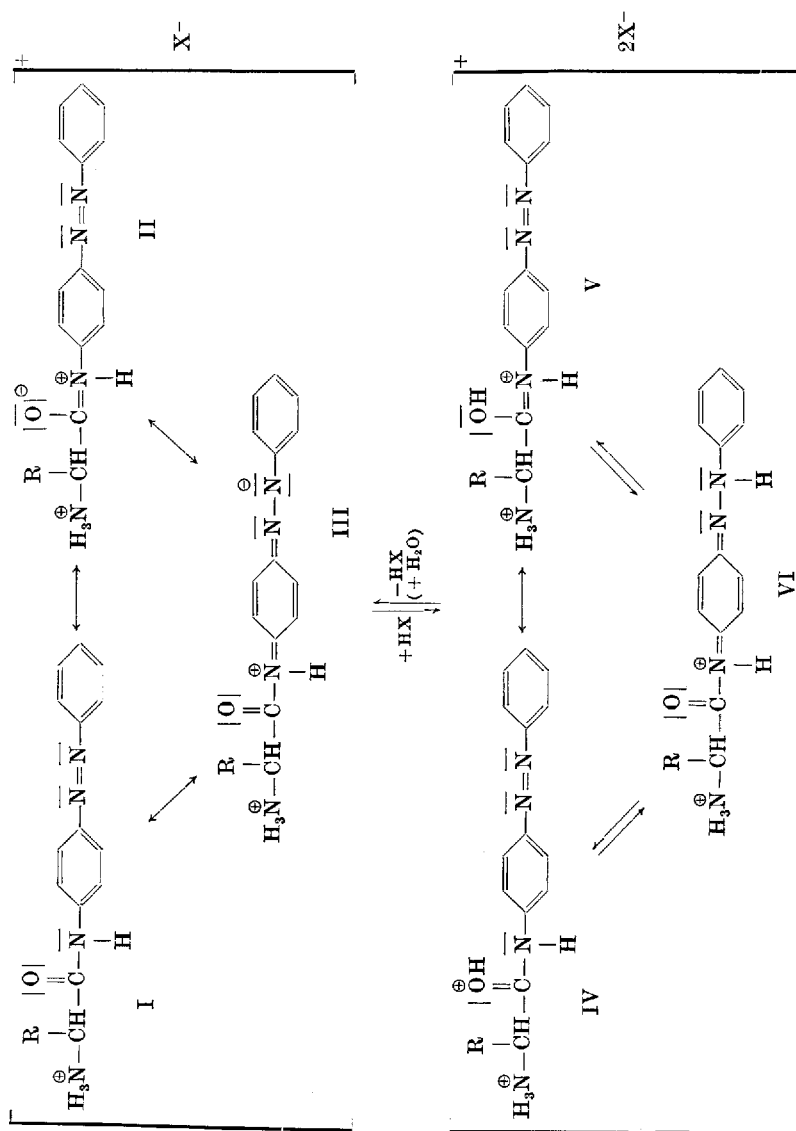
Diese Ergebnisse beweisen zunächst, daß die rote Farbe der Aminosäure-PAP-amid -hydrobromide strukturell in Analogie zum PAP-amin in der Protonisierung der farbgebenden Komponente, des PAP-amid-Restes, begründet ist, ferner daß deren Farbtiefe ursächlich mit dem Bromwasserstoffgehalt zusammenhängt.

Es erhebt sich nun die Frage, worin die rote Farbe der Aminosäure-PAP-amid-hydrobromide strukturell begründet liegt.

Ein erstes Molekül Bromwasserstoff wird wegen der relativ starken Basizität der aliphatischen α -Aminogruppe des Aminosäurerestes an diese gebunden sein. Dieser Fall liegt auch im L-Ala-PAP-amid-sulfat vor, wo konstant ein Molekül H_2SO_4 an zwei Moleküle Amid gebunden bzw. ein Amidmolekül einmal protonisiert ist²⁾. Da L-Ala-PAP-amid-sulfat gelb ist, muß bei den Hydrobromiden eine zweite Protonisierung des Aminosäure-PAP-amid-Moleküls die Farbvertiefung hervorrufen. Die Bindung des zweiten Bromwasserstoffmoleküls setzt dessen Dissoziation voraus, weil aus zwei Gründen eine Erhöhung der Polarität des Moleküls bei weiterer Bromwasserstoffanlagerung gefordert wird. Den ersten Grund stellt die Feststellung dar, daß die Löslichkeit der Aminosäure-PAP-amid-Salze mit zunehmender Protonisierung steigt. Die andere Ursache der Polaritätssteigerung bei Anlagerung eines zweiten Moleküls Bromwasserstoff ist in der dabei stattfindenden Farbvertiefung begründet, die eine chinoide Struktur mit entsprechender Polarisierung voraussetzt (Schema).

Schema

Für die Aminosäure-PAP-amide sind die drei Grenzstrukturen I—III möglich. Sie sind von einer Protonisierung an der α -Aminogruppe unabhängig. COREY und Mitarbb.^{6) 7)} haben auf Grund von Röntgenstrukturanalysen



⁶⁾ R. B. COREY u. J. DONOHUE, J. Amer. chem. Soc. **72**, 2899 (1950).

⁷⁾ R. B. COREY, Fortschr. Chem. org. Naturst. **8**, 310 (1951).

in den Säureamiden eine beträchtliche Bindungsverkürzung der C—N-Bindung gegenüber einer normalen C—N-Einfachbindung festgestellt, aus der nach Berechnung mit der JENKINSchen Formel⁸⁾⁹⁾ ein etwa 40%iger „Doppelbindungscharakter“ geschätzt wurde. Dieser Tatsache trägt die Beteiligung der Grenzstruktur II am Grundzustand Rechnung. Sie kommt durch den negativen Induktionseffekt der Carbonylgruppe zustande. Im Fall der PAP-amide von Aminosäuren ist jedoch der (—)I-Effekt der Azo-Gruppe zu beachten, der über das leichtbewegliche π -Elektronensystem der Benzolkerne zu einem entgegengesetzten Elektronenabzug von der Amid-C—N-Bindung im Sinne der Ausbildung eines chinoiden Systems, Grenzstruktur III, führt. Beiden Grenzstrukturen II und III wird jedoch nur ein geringer Anteil am Grundzustand des Moleküls wegen der sich hinsichtlich der C—N-Bindung zum Teil kompensierenden induktiven Effekte zukommen. Demzufolge wird die Struktur I den Hauptanteil ausmachen. Ein gewisser Anteil wird jedoch der Struktur II zukommen, was daran zu ermessen ist, daß die Aminosäure-PAP-amide in kürzerem Wellenlängenbereich absorbieren als PAP-amin.

Für die Bindung des zweiten Moleküls Bromwasserstoff sind demnach zwei Möglichkeiten offen. Erstens: Protonisierung an der Amidbindung. Untersuchungen an Amidiniumionen hatten ergeben, daß die Protonisierung nicht am Stickstoffatom, sondern am Carbonylsauerstoffatom erfolgt^{10–12)}. Diesen Fall stellen die Grenzstrukturen IV und V dar, die in der Elektronenverteilung des ganzen Moleküls den Strukturen I und II entsprechen. Zweitens: Protonisierung am äußeren Azostickstoffatom, in Analogie zum PAP-amin. Diese Möglichkeit erscheint auch dadurch gegeben, daß KORCZYNSKI¹³⁾ von PAP-amin ein Dihydrochlorid erhalten hat. Struktur IV dürfte von untergeordneter Bedeutung sein, da eine Protonisierung am Sauerstoffatom natürlich durch die zwitterionische Struktur II begünstigt wird, so daß Struktur V gegenüber IV dominieren würde. Jedoch bestehen ernsthafte Argumente, daß die Grenzstruktur VI den Hauptanteil zur wirklichen Elektronenverteilung zumindest im Anregungszustand beiträgt: Erstens erklärt diese Struktur mit ihrem chinoiden System die Farbvertiefung bei Bromwasserstoffanlagerung. Zweitens weist die Struktur VI auf Grund der zwischen chinoiden System und Carbonylgruppe möglichen Konjugation eine zusätzliche Stabilität auf. Der Energiegewinn bei der Ausbildung von VI ist

⁸⁾ H. O. JENKINS, J. Amer. chem. Soc. **77**, 3168 (1955).

⁹⁾ H. O. JENKINS, Trans. Faraday Soc. **51**, 1042 (1955).

¹⁰⁾ R. HUISGEN u. H. BRADE, Chem. Ber. **90**, 1432 (1957).

¹¹⁾ R. HUISGEN, H. BRADE, H. WALZ u. I. GLOGGER, Chem. Ber. **90**, 1437 (1957).

¹²⁾ G. FRAENKEL u. C. NIEMANN, Proc. nat. Acad. Sci. USA **44**, 688 (1958)

¹³⁾ A. KORCZYNSKI, Ber. dtsh. chem. Ges. **41**, 4379 (1908).

somit größer als der mit der Stabilisierung von II durch Protonisierung am Carbonylsauerstoffatom zu Struktur V verbundene.

Hier bleibt nun aber immer noch die Frage offen, weshalb die Hydrobromide der Aminosäure-PAP-amide in trockener Substanz rot, in wäßriger Lösung dagegen gelb gefärbt sind. Schon HANTSCH¹⁴⁾ hatte festgestellt, daß die Farbe der Lösungen von Hydrochloriden von Aminoazobenzolen wesentlich von der Polarität der Lösungsmittel abhängt. Er führt das auf das durch die Lösungsmittel hinsichtlich seiner Lage beeinflusste Gleichgewicht zwischen azoidem und chinoidem Typ zurück, was also auf eine prototrope Tautomerie hinausläuft.

Generell wird eine langwellige Absorptionsverschiebung durch solche Effekte bewirkt, die den Bindungsausgleich, also die Symmetrie des Konjugationssystems, erhöhen. Dieser Bindungsausgleich erreicht hier nun seinen größten Wert in der durch Protonisierung an der Azogruppe stabilisierten, konjugationsfähigen Grenzstruktur VI. Wenn sich mit zunehmender Polarität des Lösungsmittels die Grünabsorption zugunsten der Blauabsorption verringert, muß der Anteil der Struktur VI am Grund- oder/und Anregungszustand abnehmen.

Die zusätzliche Protonisierung der Aminosäure-PAP-amide mit einem zweiten Molekül Bromwasserstoff zur Amidiniumstruktur wird ohne weiteres bereits in stark saurer, wäßriger Lösung erreicht. Die zur Stabilisierung der chinoiden Struktur VI notwendige Tautomerie, die über ein sich sehr schnell einstellendes Gleichgewicht erfolgen kann¹⁵⁾, ist somit offensichtlich die derart vom Lösungsmittel abhängige Reaktion, denn die Lage von Tautomeriegleichgewichten hängt sehr vom Charakter des Lösungsmittels ab¹⁶⁾¹⁷⁾.

Zunehmender Gehalt an Wasser im Lösungsmittel wird deshalb zu Wasserstoffbrücken zwischen Wassermolekülen und dem Wasserstoffatom der Azogruppe führen, was zu einer Zunahme der Elektronendichte am äußeren Azostickstoffatom im Sinne von Struktur III führt. Das bedeutet Verminderung der Stabilität der Struktur VI und somit kurzwellige Verschiebung der Lichtabsorption.

Bezüglich des prototropen Gleichgewichts hat das Wasser höchstwahrscheinlich die Bedeutung, daß die Knüpfung einer Wasserstoffbrücke zwi-

¹⁴⁾ A. HANTSCH u. F. HILSCHER, Ber. dtsh. chem. Ges. **41**, 1171 (1908).

¹⁵⁾ F. BÄR u. F. KUHN, Liebigs Ann. Chem. **561**, 143 (1935).

¹⁶⁾ L. N. JAKHONTOV, D. M. KRASNOKUTSKAJA, E. M. PERESLENI, JU. N. SHEINKER u. M. V. RUBTSOW, Tetrahedron **22**, 3233 (1966).

¹⁷⁾ R. MONDELLI u. L. MERLINI, Tetrahedron **22**, 3253 (1966).

sehen Wasserstoffatom der Azogruppe und Sauerstoffatom eines Wassermoleküls gleichzeitig die Knüpfung einer Wasserstoffbrücke von einem Wassermolekül zum Carbonylsauerstoffatom (Struktur VI) einschließt. Bei hohem Wasseranteil am Lösungsmittel kommt es schließlich zur Ablösung des Wasserstoffatoms von der schwach basischen Azogruppe, der die Protonisierung des Carbonylsauerstoffatoms folgt, wenn man Wasser als komplexes Wasserstoffbrückenassoziat betrachtet. Dieser Vorgang läuft somit also auf eine vollständige Tautomerie hinaus. Wesentlich scheint für diesen taufomeren Übergang auch die relative Basizität zwischen Carbonylsauerstoff und Azostickstoff in Abhängigkeit von der Polarität des Lösungsmittels zu sein. Hierüber existieren jedoch noch keine experimentellen Daten.

Der Vorgang der genannten Tautomerie, also der Ausbildung der Amidiniumstruktur, dürfte beim Lösen der Aminosäure-PAP-amid-hydrobromide in Wasser allerdings sofort von einer Protonendissoziation begleitet sein, da in der wäßrigen Lösung der Hydrobromide etwa ein pH-Wert von 3 herrscht, so daß die oben als Voraussetzung der Amidiniumstruktur angegebenen stark sauren Verhältnisse nicht gewährleistet sind. Die Primärprotonisierung an der α -Aminogruppe bleibt jedoch erhalten. Das folgt aus der Darstellung von L-Ala-PAP-amid $\cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{SO}_4$, welches durch Versetzen der wäßrigen Lösung des Hydrobromids mit einer Natriumsulfatlösung gewonnen werden kann²⁾.

Wegen der geringen Basizität der Azogruppe erklärt sich der schwankende Bromwasserstoffgehalt in den Aminosäure-PAP-amid-hydrobromiden, wobei die Bedingungen bei der Abspaltung der Carbobenzoxygruppe mit Bromwasserstoff/Eisessig¹⁸⁾ den Ausschlag geben werden (z. B. Bromwasserstoff/Eisessig-Menge, Reaktionszeit und Reaktionstemperatur). Auch die sich anschließende Ätherbehandlung zum Auswaschen von Eisessig, HBr und Benzylbromid kann wegen ihrer unterschiedlichen Intensität von Einfluß sein.

Beschreibung der Versuche

Darstellung der Aminosäure-PAP-amid-hydrobromide nach ²⁾18)19). Darstellung von L-Ala-PAP-amid-sulfat nach ²⁾.

Darstellung von freiem DL-Phenylalanin-PAP-amid: DL-Phenylalanin-PAP-amid-hydrobromid wird in Wasser gelöst. Die Lösung versetzt man mit überschüssigem Ammoniak. Das ausgefallene Produkt wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und anschließend im Vakuum über Ätzkali getrocknet. Schmp. 176–178 °C.

$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}$ (344,4)

ber.: C 73,23; H 5,87;
gef.: C 72,98; H 6,10.

¹⁸⁾ A. BARTH u. P. SCHWENK, Acta chim. Acad. Sci. hung. **49** (4), 405 (1966).

¹⁹⁾ A. BARTH u. P. SCHWENK, Z. Chem., im Druck.

Messungen:

Sämtliche Konzentrationsangaben beziehen sich auf das kolorimetrierte Volumen. Die Messungen erfolgten mit dem Spektalkolorimeter „Spekol“ (Zeiss Jena).

Bernburg/Saale, Institut für Naturwissenschaften der Hochschule für Landwirtschaft.

Bei der Redaktion eingegangen am 31. Januar 1967.