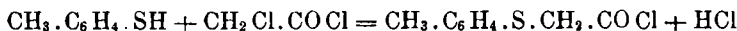


0.2213 g Sbst.: 17.55 ccm N (24°, 754 mm).

$C_{10}H_{11}ON$ . Ber. N 8.69. Gef. N 8.78.

Es lag nun nahe, auch die Darstellung von  $\alpha$ -Oxy-thionaphthenchinonen nach dieser Methode zu versuchen.

Als *p*-Thiokresol-chloracetyler,  $CH_3 \cdot C_6H_4 \cdot S \cdot CO \cdot CH_2Cl$ , haben K. Auwers und F. Arndt<sup>1)</sup> das bei 38° schmelzende Einwirkungsprodukt von Chloracetylchlorid auf Thiokresol angesprochen. Es stellt aber Tolyl-thioglykolsäure-chlorid dar,



und liefert bei der Verseifung die bekannte Tolyl-thioglykolsäure<sup>2)</sup> in farblosen Blättchen vom Schmp. 93°.

3.351 mg Sbst.: 7.302 mg  $CO_2$ <sup>3)</sup>, 1.648 mg  $H_2O$ . — 0.1696 g Sbst.: 0.2199 g  $BaSO_4$ .

$C_9H_{10}O_2S$ . Ber. C 59.34, H 5.49, N 17.6.

Gef. » 59.43, » 5.50, » 17.8.

Tolyl-thioglykolsäure läßt sich leicht auch durch längeres Erhitzen von Thiokresol mit Chloressigsäure auf etwa 160° darstellen.

Die Einwirkung von Aluminiumchlorid auf Tolyl-thioglykolsäurechlorid, bei der K. Auwers und F. Arndt<sup>4)</sup> je nach den Versuchsbedingungen keine Veränderung oder gänzliche Zersetzung feststellten, soll nochmals untersucht werden.

Hr. cand. chem. A. Jordan ist mit Versuchen zur Gewinnung weiterer Oxindol-Abkömmlinge und zur Darstellung von  $\alpha$ -Oxy-thionaphthenchinonen beschäftigt.

Heidelberg, Chem. Lab. d. Univ., 19. Juni 1914.

## 296. A. Bach: Empfindlichkeit der Peroxydase-Reaktion.

[Aus dem Privatlaboratorium des Verfassers, Genf.]

(Eingegangen am 10. Juni 1914.)

Gelegentlich jetzt im Gange befindlicher Versuche, über die auf S. 2125 ff berichtet wird, sah ich mich veranlaßt, ein nach den üblichen Methoden aus Meerrettich dargestelltes Peroxydase-Präparat möglichst von Fremdstoffen, insbesondere von Mineralstoffen, zu befreien. Da

<sup>1)</sup> B. 42, 544 [1909].

<sup>2)</sup> C. 1902 II, 497; 1907 I, 1791; 1908 I, 1221.

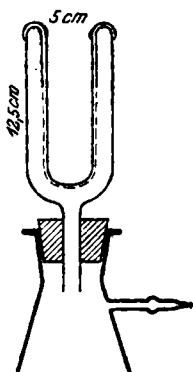
<sup>3)</sup> Die mikroanalytische Bestimmung nach Pregl verdanke ich der Freundlichkeit des Hrn. Dr. Schrader.

<sup>4)</sup> l. c.

die Dialyse wenig befriedigende Resultate liefert<sup>1)</sup>, versuchte ich, das Ultrafilter für die weitgehende Reinigung der Peroxydase anzuwenden. Das erhaltene Präparat erwies sich als außerordentlich wirksam, und es schien mir wünschenswert, die Empfindlichkeitsgrenze der Peroxydase-Reaktion damit zu ermitteln, zumal noch keine Angaben über diesen Gegenstand vorliegen.

Das Präparat wurde folgenderweise dargestellt:

2 kg Meerrettichwurzeln wurden in der Hackmaschine fein zerkleinert, mit 1 l Wasser verrieben und 48 Stunden stehen gelassen. Der Brei wurde dann abgepreßt, der erhaltene Saft (1200 ccm) wurde mit dem gleichen Volumen 98-prozentigen Alkohols versetzt und nach 24 Stunden filtriert. Das klare Filtrat, welches die Hauptmenge der Peroxydase enthält, wurde mit 3 Vol. Alkohol gefällt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit Alkohol nachgewaschen und im Vakuum über Chlorcalcium getrocknet. Der trockne Niederschlag (2.15 g) wurde in 200 ccm Wasser gelöst und die klar filtrierte Lösung der Ultrafiltration unterworfen. Für die Ausführung dieser Operation hat sich nebenstehend skizzierter, ganz einfacher Apparat als gut geeignet erwiesen. Als Ultrafilter wird eine in den durchlöcherten Trichter genau hinein passende, mit Collodion durchtränkte Hülse aus Leinwand benutzt. Durch Vorversuche wird die Dicke der Collodionschicht festgestellt, die für das Fermentkolloid undurchdringlich ist. Das Ultrafilter wird am oberen Rande des Trichters mittels Paraffins luftdicht befestigt.



In diesem Apparat wurde die Peroxydaselösung abfiltriert und dann mit sterilisiertem, toluolhaltigem Wasser wiederholt gewaschen, bis das Volumen des Ultrafiltrats ca. 1 l betrug. Bei 100 mm Druck ließ das Ultrafilter nicht mehr als etwa 50 ccm pro 24 Stunden durchgehen, so daß die Operation beinahe 3 Wochen in Anspruch nahm. Da die letzten Ultrafiltrate einen nicht unbedeutenden Peroxydasegehalt aufwiesen, wurde das Waschen unterbrochen, die auf dem Ultrafilter restierende geringe Masse wurde in 100 ccm Wasser gelöst und von Unlöslichem auf einem Papierfilter abfiltriert.

In dieser Weise wurde eine vollkommen klare Lösung erhalten, die in dicker Schicht eine kaum merkliche Opaleszenz zeigte. Da nach den Ergebnissen eines Vorversuches für die Isolierung der Peroxydase durch Fällern mit Alkohol keine gute Aussicht vorlag, wurde der Gehalt der Lösung an Trockensubstanz in der Weise festgestellt, daß der aus 20 ccm durch Eindampfen zur Trockne erhaltene Rückstand bei 100° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen wurde. 20 ccm Peroxydaselösung lieferten 0.0254 g = 0.127 % Trockensubstanz.

<sup>1)</sup> Bach und Tscherniack, B. 41, 2345 [1908].

Die durch Ultrafiltration gereinigte Peroxydase war bei weitem wirksamer als das von Bach und Tscherniack<sup>1)</sup> beim mühevollen Reinigen von 52 g Rohperoxydase nach einem kombinierten Verfahren von Fällung mit basischem Bleiacetat, Entbleien und nachträglicher Dialyse dargestelltes Präparat. Die zuerst von Bach und Chodat<sup>2)</sup> dargestellte Peroxydase ergab bei der Oxydation des Pyrogallols nur 2 mg Purpurogallin pro mg Ferment, die von Bach und Tscherniack 36 mg, die ultrafiltrierte 98 mg (vergl. nachstehende Mitteilung).

Zur Ermittlung der Empfindlichkeitsgrenze der Peroxydase-Reaktion eignet sich am besten die Oxydation des Guajacols, da dieses Substrat durch Hydroperoxyd ohne Mitwirkung eines Katalysators nicht merklich angegriffen wird. Bei den hier in Betracht kommenden Konzentrationsverhältnissen bleibt das Reagens auch nach tagelangem Stehenlassen vollkommen farblos, was bei dem Pyrogallol und dem Hydrochinon nicht der Fall ist. Die Versuche wurden in folgender Weise ausgeführt:

Von der durch Ultrafiltration gereinigten Lösung wurde 1 ccm = 0.00127 g Trockensubstanz zu 1 l gelöst. Durch weitere Verdünnung wurden Lösungen, die 0.0001—0.000001 mg Peroxydase (als Trockensubstanz) pro ccm enthielten, erhalten. Von diesen Lösungen wurden je 1 ccm mit 8 ccm 0.1-prozentiger Guajacollösung und 1 ccm 0.1-prozentiger Hydroperoxydlösung zusammengebracht, und die entstehenden Färbungen beobachtet. Es zeigte sich, daß bei der Verdünnung von 1 Teil Peroxydase in 500 Millionen Teilen Flüssigkeit das Reagens schon nach 5 Minuten eine ziemlich intensive, braunrote Färbung annimmt. Bei der Verdünnung 1:1000 Millionen tritt nach 20 Minuten eine deutliche, allmählich zunehmende, braunrote Färbung ein. Läßt man die Proben 24 Stunden stehen, [so kann man sehr leicht 1 Tl. Peroxydase in 2 Billionen Teilen Wasser erkennen. Da auf die chemische Reinheit des von mir dargestellten Präparats kein Anspruch erhoben werden kann — es enthielt noch sicherlich fremde Kolloide —, liegt die Empfindlichkeitsgrenze der Peroxydase noch viel tiefer.

Die Peroxydase ist hiermit als einer der empfindlichsten Katalysatoren zu bezeichnen.

---

<sup>1)</sup> l. c.

<sup>2)</sup> B. 36, 600 [1903].