

**90. Otto Gerngross, Karl Voss und Hans Herfeld:
Über eine hochempfindliche, streng tyrosin-spezifische Farbreaktion
auf *para*-substituierte Phenole. Der Tyrosin-Gehalt verschiedener
Proteine, insbesondere von Kollagen und Gelatine.**

[Aus. d. Techn.-chem. Institut d. Techn. Hochschule Berlin, Abteil. Franklin-Str.]
(Vorgetragen von O. Gerngross in der Sitzung am 9. Januar 1933; eingegangen am
13. Februar 1933.)

Wenn man die Haut der Hände oder andere Proteine mit dem bekannten Kobalt-Reagens, einer 1-proz. 1,2-Nitroso-naphthol-Lösung in Essigsäure und alsdann mit starker Salpetersäure versetzt, so entsteht eine lebhaft rote Verfärbung¹⁾. Die nähere Untersuchung ergab, daß die Ursache der Reaktion das Tyrosin (*p*-Oxyphenyl-alanin) ist.

Die Durchführung der Reaktion gestaltet sich zweckmäßig folgendermaßen: 1 ccm 0.1-proz. Tyrosin-Lösung (1g Tyrosin + 6 ccm einer 10% wasserfreie Soda enthaltenden Lösung, auf 1 l mit Wasser aufgefüllt; diese Lösung mit einigen Tropfen reinem Toluol als Desinfiziens geschüttelt, dient in entsprechender Verdünnung auch für die quantitative Bestimmung als Standardlösung) wird im Reagensrohr mit 1 Tropfen 1-proz. 1,2-Nitroso-naphthol-Lösung in gewöhnlichem Alkohol versetzt und zum Kochen erhitzt; in diese heiße Lösung werden 1–2 Tropfen Salpetersäure ($d=1.4$) aus einer Tropfflasche eingetropfet. Es tritt tiefdunkle Purpurfärbung ein, die auch beim Verdünnen mit Wasser auf z. B. 100 ccm noch sehr stark sichtbar ist.

In ähnlicher Weise wird die Reaktion mit den Lösungen bzw. Hydrolysaten der Proteine durchgeführt. Aber auch mit festen Proteinen gelingt sie sehr schön, selbst mit einem so tyrosin-armen Protein wie mit Formaldehyd gehärteter Gelatine, wobei man das Reagens in Eisessig-Lösung anwendet.

Die Reaktion ist bei der Verdünnung 1:10⁶, also 1 mg Tyrosin in 1 l Wasser, noch ganz deutlich. Bei der Verdünnung 1:2.10⁶ ist sie nur für das geübte Auge eben noch erkennbar. Ihre große Schärfe und die noch zu besprechende strenge Spezifität (selbst die nahen Verwandten des Tyrosins: [3,4-Dioxy-phenyl]-alanin, Adrenalin, Thyroxin geben sie nicht) und Unbeeinflussbarkeit durch Begleitstoffe (natürliche Aminosäuren, Salze, Harnstoff, Formaldehyd, Acetaldehyd, reduzierende Zucker²⁾) läßt die Reaktion für die Bestimmung des Tyrosin-Gehaltes in Proteinen und proteinogenen Substanzen geeignet erscheinen.

Die übliche Colorimetrie ist jedoch nicht brauchbar, da der Farbstoff, insbesondere im ultraviolett-reichen Licht, allmählich ausbleicht und bei der Verdünnung keineswegs dem Beerschen Gesetz folgt. Auf Grund der scharf festzustellenden Verdünnungsgrenze, bei der die Reaktion noch deutlich ist, läßt sich jedoch nach folgendem Verdünnungs-Verfahren in höchst einfacher und sicherer Weise ohne jede Apparatur lediglich mit einigen kalibrierten Reagentgläsern und mit den üblichen Meßgefäßen, wie Bürette, Pipette und Meßzylinder, die Messung durchführen.

Die zu untersuchende Substanz, deren Asche- und Wasser-Gehalt evtl. rechnerisch zu berücksichtigen ist, wird, falls sie nicht ohnehin in heißem Wasser löslich ist, in verd. Natronlauge (p_H der Hydrolysen-Flüssigkeit ca. 9–10) oder verd. Schwefelsäure hydro-

¹⁾ Diese Beobachtung stammt von dem einen von uns cand. phil. Voß.

²⁾ Bei Anwesenheit größerer Mengen Salpetersäure bindender (z. B. Harnstoff) bzw. zerstörender Mittel (z. B. Acetaldehyd) muß ein entsprechend größerer Zusatz von Salpetersäure geschehen, bis Rotfärbung eintritt.

lytisch gelöst. Man verdünnt, neutralisiert gegen Lackmus, filtriert evtl. von Huminstoffen und füllt mit Wasser auf eine Stammlösung von 1% asche- und wasserfreie Substanz auf. Zwecks genauer Dosierung bei der späteren Verdünnung wird diese Lösung in eine Bürette gefüllt. Jedesmal 3 ccm der Lösung werden in gleich kalibrierten Reagenröhren mit 1 Tropfen 0.1-proz. Nitroso-naphthol-Lösung in Alkohol und 6 Tropfen Salpetersäure ($d = 1.4$) versetzt und gekocht. Geringe Trübungen und Färbungen spielen bei der großen Verdünnung, bei welcher die entscheidenden Beobachtungen gemacht werden, keine Rolle. Beobachtet wird schräg von oben gegen eine weiße, glasierte, keramische Platte (Kachel oder dgl.) bei Tageslicht, und zwar stets gleichzeitig gegen einen Blindversuch mit Wasser, da das Nitroso-naphthol-Reagens selbst bei der großen Verdünnung noch deutliche Eigenfärbung besitzt. Man überzeuge sich mit einer auf 1:1000000 verdünnten Tyrosin-Lösung von der letzten deutlichen Sichtbarkeits-Grenze der roten Reaktionsfärbung. Durch steigende Verdünnung der ursprünglichen, 1-proz., zu untersuchenden Lösung und Vornahme der Reaktion in den mehr und mehr verdünnten Lösungen stellt man die Sichtbarkeits-Grenze der Reaktion fest.

Der Gehalt an Tyrosin in % = $a.100/x$, wenn a = Konzentrations-Schwelle des Tyrosins (0.000001 g in 1 ccm) und x = Konzentrations-Schwelle der zu prüfenden Substanz in g je ccm bedeutet. Man kann die Berechnung noch einfacher durch Registrierung der Verdünnung durchführen. In diesem Falle ist der Tyrosin-Gehalt in % = $x.100/a$, wenn x die vorgenommene Verdünnung der zu prüfenden Substanz, a die des Tyrosins bei der Sichtbarkeits-Schwelle (10^6) ist.

Wir haben, um die Zuverlässigkeit unseres Verfahrens zu prüfen, eine Serie von Versuchen angesetzt, in welcher zu elektro-osmotisch gereinigter, nach unseren zahlreichen Prüfungen 0.3-proz. Tyrosin enthaltender Gelatine wechselnde Mengen Tyrosin künstlich zugesetzt und in der Gelatine-Lösung bestimmt wurden. Um die völlige Objektivität der Analytiker zu wahren, wurden die Zusätze von dritter Hand reguliert. Außerdem wurde zur Kontrolle die Tyrosin-Bestimmung nach der Modifikation der Millonschen Reaktion nach Weiß-Zuwerkalow³⁾ mit herangezogen.

Tabelle I: Quantitative Tyrosin-Bestimmungen nach Zuführung gemessener Mengen von Tyrosin zu einer Lösung von elektro-osmotisch gereinigter Gelatine.

Versuch Nr.	Berechnet. Tyrosin- Gehalt	Gefundener Tyrosin-Gehalt nach					
		Weiß-Zuwerka- low		Gerngross-Voß			
			Fehler	1. Beobachter	2.	Mittel- wert	Fehler
1.	5.3 %	—	—	5 %	5 %	5 %	—6 %
2.	3.6 %	4.1 %	+ 14 %	3.2 %	4 %	3.6 %	± 0 %
3.	2.8 %	—	—	3 %	3 %	3 %	+ 7 %
4.	15.3 %	14.9 %	—2.6 %	15 %	15 %	15 %	—2 %
5.	4.9 %	5.3 %	+ 8 %	5 %	5.5 %	5.25 %	+ 7 %
6.	10.3 %	9.5 %	—8 %	10.75 %	10 %	10.38 %	± 0 %
7.	3.7 %	4.2 %	+ 13.5 %	4 %	4 %	4 %	+ 8 %
8.	11.8 %	10.8 %	—8.5 %	12 %	11 %	11.5 %	—3 %

³⁾ W. Zuwerkalow, Ztschr. physiol. Chem. **163**, 185 [1927]; vergl. auch M. Weiß, Biochem. Ztschr. **97**, 170 [1919].

Wie Tabelle I zeigt, beträgt die Fehlerbreite höchstens $\pm 8\%$, während sie bei der Weiß-Zuwerkalowschen Methode $\pm 14\%$ beträgt. Ohne Frage ist unsere Methode rascher und einfacher durchzuführen als die sonst sehr empfehlenswerte von Weiß-Zuwerkalow, bei der allerdings das notwendige Kochen mit etwa 50-proz. Essigsäure-Lösung wegen Geruchsbelästigung unbequem ist. Ferner muß bemerkt werden, daß bei der Colorimetrierung nach Weiß-Zuwerkalow beim Verdünnen bisweilen Unterschiede in der Farbnuance auftreten, welche die Beobachtung im Halbschatten-Apparat erschweren. Endlich stellten wir bei Versuchen an tryptophan-haltigen Proteinen, insbesondere Casein, fest, daß offenbar nach der Weiß-Zuwerkalow-Methode ein ständiger geringer Gang der Ergebnisse nach oben im Vergleich mit den nach unserer Methode gewonnenen zu bemerken ist. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß die Modifikation der Millonschen Reaktion infolge ihrer mangelnden Tyrosin-Spezifität zu hohe Werte liefert. Eine genaue Untersuchung dieser Verhältnisse ist im Gange.

Besonders interessierte uns nun die Untersuchung von Kollagen, Leim und Gelatine, da es sich gezeigt hatte, daß unsere ungemein scharfe Reaktion selbst mit höchst gereinigter (iso-elektrischer) Gelatine, die dem Schriftum zufolge gar keine⁴⁾ oder nur verschwindend geringe⁵⁾ Mengen Tyrosin enthalten soll, sehr schön ausfiel.

Tabelle II: Tyrosin-Gehalt in Prozent von Kollagen, Leim und Gelatine.

Nr.	Präparat	Angewandte Methode:	
		Gerngross-Voß	Weiß-Zuwerkalow
1.	Hautpulver	1.0 %	1.06 %
2.	„Spaltkollagen“	1.0 %	—
3.	„Spaltkollagen“, gereinigt	0.8 %	—
4.	Knochenleim	1.0 %	0.9 %
5.	Hautleim	0.4 %	0.44 %
6.	Photo-gelatine I	0.4 %	—
7.	Photo-gelatine II	0.3 %	0.26 %
8.	Elektro-osmotisch gereinigte Gelatine	0.3 %	0.26 %
9.	Gelatine „diazotiert“	0.05 %	—
10.	Gelatine Schmidt (ClO ₂)	0 %	0 %

Tabelle II zeigt das Ergebnis unserer Prüfungen. Das als reines Kollagen zu betrachtende Freiburger Hautpulver (Nr. 1 der Tabelle II) zeigt nach seiner hydrolytischen Auflösung 1 % Tyrosin-Gehalt. Es wird aus sorgfältig reingemachter „Rindsblöße“ hergestellt, die aber immerhin noch Reste von tyrosin-haltigen Proteinen aus Blut (Albumin, Globulin, Fibrin), Keratin, Elastin und mucin-artigen Substanzen enthalten könnte. Aus diesem Grunde wurde sog. „Spaltkollagen“, das ist ein schneeweiße Färbung aufweisender Retikularspalt aus der Mittelschicht der Rindshaut, in welcher weder elastische Fasern, noch keratinöse Gebilde, noch Blutgefäße liegen (Nr. 2 der Tabelle II),

⁴⁾ E. Abderhalden, Lehrbuch d. physiol. Chemie, 6. Aufl., Berlin-Wien 1931, S. 315 und 739; O. Kestner, Chemie d. Eiweißkörper, Braunschweig 1925, S. 267.

⁵⁾ H. D. Dakin, Journ. biol. Chem. 44, 499 [1920].

untersucht — ohne Änderung des Ergebnisses. Um die nicht-kollagenen Eiweißstoffe zu entfernen⁶⁾, wurde der Spalt geraspelt, 24 Std. mit destilliertem Wasser unter wiederholtem Wechseln der Waschflüssigkeit und Abpressen geschüttelt, 5 Tage mit $\frac{1}{100}$ -n. Natronlauge unter wiederholtem Wechseln der Flüssigkeit ebenso behandelt, endlich noch 1 Tag gewässert. Der Tyrosin-Gehalt des so gereinigten Präparates (Nr. 3 der Tabelle II) senkte sich nur unwesentlich, nämlich auf 0.8 %.

Knochenleim (Nr. 4), der keine besondere alkalische Reinigung im Fabrikationsprozeß erfährt, zeigt 1 %, hochwertiger Hautleim und Gelatine, die während der Fabrikation eine wochenlange alkalische Behandlung erfahren, zeigen 0.3—0.4 % (Nr. 5—8).

Verwendet man jedoch eine Gelatine, in welcher durch entsprechende Vorbehandlung das Tyrosin ganz oder teilweise zerstört ist, so nimmt die Reaktion ab, oder sie verschwindet ganz. Dies ist der Fall bei der Einwirkung von salpetriger Säure (Nr. 9). Salpetrige Säure, welche die freien aliphatischen Aminogruppen des Proteines unter Stickstoff-Entwicklung zerstört, was eine Art Gerbung zur Folge hat⁷⁾, verwandelt das Tyrosin ungemein leicht über das *o*-Diazoniumnitrat („Diazotierung des Eiweißes“) offenbar in ein Dioxy-phenol⁸⁾. Mit diesem *ortho*-substituierten Phenol ist die Reaktion negativ.

Vollkommen vernichtet wird das Tyrosin durch eine Vorbehandlung des kollagenen Rohstoffes der Gelatine mit Chlordioxyd, worauf sich ein Verfahren von Erich Schmidt für die Herstellung gereinigter Gelatine gründet⁹⁾ (Nr. 10).

Es fragt sich nun, ob man das Tyrosin des Kollagens und der Gelatine als einen integrierenden Bestandteil dieser Proteine, also als regelmäßiges Kettenglied der langen Polypeptid-Ketten, welche — nach der Vorstellung von Gerngross und Hermann¹⁰⁾ zum Teil gittermäßig geordnet — die Kollagen- und Gelatine-Micelle bilden, aufzufassen hat, oder ob es sich nur um Beimengungen tyrosin-haltiger Proteine handelt.

Wir haben, um diese Frage zu prüfen, mit unserer neuen Methode diejenigen Proteine auf ihren Tyrosin-Gehalt geprüft, die als Verunreinigung des kollagenen Ausgangsmaterials in Betracht kommen. Tabelle III. enthält die Ergebnisse bei technischem Blut-Albumin (Albumin und Globulin), Elastin, Fibrin und Keratin. Danach enthalten die möglichen Begleitstoffe des Kollagens durchschnittlich etwa 4 % Tyrosin. Dies bedeutet, daß das Kollagen mit rund 20—25 % dieser Proteine verunreinigt sein müßte, wenn man die tatsächlich gefundenen 0.8—1 % Tyrosin auf diese Weise erklären wollte. Es ist sehr fraglich, ob man bei dem sorgfältig gereinigten „Spaltkollagen“ so viel nicht-kollagenes Material voraussetzen darf.

⁶⁾ A. Küntzel u. K. Buchheimer, Collegium 1930, 207.

⁷⁾ O. Gerngross u. P. Köppe, Ztschr. angew. Chem. 44, 983 [1931].

⁸⁾ vergl. M. Rohrlich „Über Diazotierung und Kupplung der Proteine“, Dissertat., Universität Berlin 1931.

⁹⁾ Köln-Rottweil A.-G., Dtsch. Reichs-Pat. 380195; E. Schmidt u. K. Braunsdorf, B. 55, 1529 [1922].

¹⁰⁾ K. Hermann, O. Gerngross u. W. Abitz, Ztschr. physikal. Chem. (B) 10, 371 [1930]; O. Gerngross, K. Hermann u. R. Lindemann, Kolloid-Ztschr. 60, 276 [1932].

Tabelle III: Tyrosin-Gehalt der als Verunreiniger von Kollagen und Gelatine vor allem in Betracht kommenden Proteine.

Nr.	Präparat	Angewandte Methode:	
		Gerngross-Voß	Weiß-Zuwerkalow
1.	Blut-Albumin hell extra	6%	6.57%
2.	Elastin (Ligamentum nuchae)	1.6%	1.84%
3.	Fibrin	6.5%	—
4.	Haare (Rind)	4%	—
5.	Wolle, weiß (Schaf)	5%	—

Andererseits könnte die Tatsache, daß Hautleim und Gelatine nur 0.3—0.4% Tyrosin aufweisen, daß also ein weiterer Verarbeitungsprozeß der kollagenen Substanz deren Tyrosin-Gehalt mindert, gegen die Auffassung sprechen, daß er dem eigentlichen Kollagen-Protein zugehört. Es ist dahingegen aber auch durchaus möglich, daß die Wochen, ja Monate lange intensive vorbereitende Alkali-Behandlung des Rohmaterials (Leim-Leder) und die nachfolgende Verkochung das bekanntlich besonders leicht abspaltbare Tyrosin aus dem riesigen Molekülkomplex zum Teil absplittert.

Endlich könnte man insbesondere die totale Beseitigung des Tyrosins im Glutin durch Chlordioxyd, ohne daß die Eigenschaften solcher Gelatine¹¹⁾ wesentlich geändert erscheinen, als Beweis dafür gelten lassen, daß es sich doch nur um Beimengungen handeln könne. Es ist aber keineswegs unwahrscheinlich, daß die geringe Veränderung, welche das Gelatine-Micell durch die Zerstörung der ganz vereinzelt Tyrosin-Baugruppen ohne Änderung der Bindegruppen¹²⁾ erfährt, sich in den physikalischen Eigenschaften des Kolloids nicht besonders auswirken würde.

Wir möchten nach alledem die Frage, ob das, wie wir zeigen konnten, regelmäßig feststellbare Tyrosin ein wirklicher Bestandteil des kollagenen Proteins oder nur eines Begleitstoffes ist, vorläufig noch offen lassen.

Über die Reaktion selbst ist folgendes zu sagen: Der entstehende, nicht sehr stabile, in saurer Lösung rote Farbstoff besitzt Indicator-Eigenschaften. In alkalischer Lösung ist er gelb. Durch Anwendung größerer Mengen von Salpetersäure als im Versuch auf S. 435 angegeben, z. B. schon durch 3 Tropfen Salpetersäure ($d = 1.4$), kann die Reaktion auch in der Kälte durchgeführt werden. Es ist eine oxydative Umsetzung. Auch mit Braunstein oder Bleidioxyd in saurer Lösung gelingt sie in der Kälte ohne den Gebrauch der Salpetersäure. Die Einführung einer besonderen Nitrogruppe durch Salpetersäure ist somit nicht notwendig.

¹¹⁾ Diese tyrosin-freie Gelatine hatte folgende Kennzahlen: 14.9% Wasser, 1.9% Asche, Viscosität einer 10-proz., auf asche- und wasser-freie Substanz berechneten Lösung bei 40° 6.2% Engle r-Grade. Fließpunkt der gleichen Lösung, bestimmt in der Apparatur von Ubbelohde, 32.25°, desgleichen der Tropfpunkt 33.25—33.5°. pH-Wert = 5.9 in 1-proz. Lösung. Es handelt sich also um ein Präparat durchaus normaler physikalischer Konstanten. Es sei bemerkt, daß diese Gelatine beim Lösen nach Chlordioxyd riecht und mit Jodkalium und Schwefelsäure eine starke Jodreaktion, also noch beträchtliche Mengen Chlordioxyd, aufweist, obwohl die trockne Gelatine seit dem Jahre 1924 im Laboratorium des einen von uns lagert.

¹²⁾ vergl. R. O. Herzog u. O. Kratky, Naturwiss. 18, 733 [1930], und insbesondere O. Gerngross, K. Hermann u. W. Abitz, Biochem. Ztschr. 228, 418 [1930].

Es ist allerdings zu bemerken, daß die Reaktion mit Salpetersäure wesentlich stärker, und daß der gebildete Farbstoff in der Lösung viel stabiler ist als bei der Reaktion mit PbO_2 .

In einer Phase der Reaktion wird offenbar die Nitroso- zur Nitro-Gruppe oxydiert, denn mit einer alkohol. Lösung von 1.2-Nitro-naphthol tritt die Reaktion gleichfalls prompt ein¹³⁾. Der Nitrosoest als solcher spielt demnach keine Rolle. Wesentlich scheint die Gruppierung, wie sie im Naphtholring vorliegt, zu sein, denn 1.2-Nitro-phenol versagt als Reaktionskomponente. Mit 2.1-Nitroso-naphthol ist die Farbstoffbildung zwar zu beobachten, aber weit schwächer als mit dem 1.2-Derivat, mit 1.4-Nitroso-naphthol ist sie fast negativ. 1.6-Dinitro-2-naphthol reagiert ganz negativ. Das Reaktionsmilieu muß wasser-haltig sein. In reiner Eisessig-Lösung tritt keine Farbstoff-Bildung ein.

Es ist uns unter keinen Umständen gelungen, mit Wasserstoffperoxyd oder seinen Derivaten, wie Sulfomonopersäure, als Oxydationsmittel die Reaktion durchzuführen, ebensowenig mit Eisenchlorid, Chlor oder Bromwasser, Kaliumchlorat und Salzsäure.

Eine besondere Rolle spielt salpetrige Säure. In größeren Mengen verhindert sie die Reaktion, in ganz geringen Mengen wirkt sie hingegen beschleunigend. Die hindernde Wirkung der überschüssigen salpetrigen Säure ist durch *o*-Substitution¹⁴⁾ wohl verständlich. Wie hinderlich die *o*-Substitution an sich ist, erhellt auch daraus, daß bei unrichtiger Reihenfolge bei der Zugabe der Reagenzien, d. h. bei vorhergehender Zugabe von Salpetersäure zur heißen Lösung (z. B. von Tyrosin oder *p*-Kresol) und nachträglichem Eintragen von Nitroso-naphthol-Reagens, keine Farbstoff-Bildung auftritt, da das glatt durch die Salpetersäure gebildete *o*-Nitroderivat, wie man sich in einem gesonderten Versuch überzeugen kann, nicht reagiert.

Wie uns scheint, ist das Interessanteste an der neuen Reaktion, die ganz im allgemeinen als eine der farbenprächtigsten Eiweiß-Reaktionen zu bezeichnen ist, ihre scharfe Spezifität auf Tyrosin. Wie wir uns überzeugten, fällt sie mit keiner der bisher bekannten natürlichen Aminosäuren positiv aus. Dahingegen sind alle bisher bekannt gewordenen Tyrosin-Reaktionen nicht streng spezifisch.

Soweit die bisherige Untersuchung ergeben hat, ist die Reaktion an ein Phenol mit freier Hydroxylgruppe gebunden, das in *ortho*-Stellung gar nicht oder nur an einer Stelle durch die CH_3 -Gruppe substituiert sein darf, in *para*-Stellung substituiert sein muß. Reines Phenol, das auf Millons Reagens bekanntlich anspricht, reagiert nicht, *p*-Kresol hingegen — der einfachste positiv reagierende Typ — zeigt noch intensivere Farbstoff-Bildung als Tyrosin. Die Sichtbarkeits-Grenze bei *p*-Kresol liegt bei einer Verdünnung von 1.8×10^7 . Wie wir uns überzeugten, gelingt es mit unserer Reaktion in einem analogen Verfahren wie dem auf S. 436 für Tyrosin beschriebenen, den Gehalt von *p*-Kresol in technischen Gemengen von *o*-, *m*- und *p*-Kresolen festzustellen.

¹³⁾ Auch die Kobalt-Reaktion erfolgt glatt mit 1.2-Nitro-naphthol wie mit dem Nitrosoderivat, was — soweit wir feststellen konnten — in der Literatur bisher nicht bekannt war.

¹⁴⁾ vergl. Fußnote 8.

Wir glauben, daß unser Verfahren z. B. bei den Kresolen eine brauchbare Ergänzung der umständlicheren Methoden bedeutet¹⁵⁾, welche in Gemengen die einzelnen Komponenten erfassen¹⁶⁾.

1-Naphthol gibt unbedeutende Färbung, da in ihm sowohl das Gesetz der *p*-Substitution wie der Freiheit der *o*-Stellungen nicht erfüllt ist. 2-Naphthol hingegen, das diesen Forderungen gerecht wird, gibt insbesondere bei Anwendung großer Verdünnung (z. B. 1:400000) ein tiefes blautichiges Rot.

Allerdings sind nicht alle *p*-Substituenten geeignet. Solche saurer Natur, wie NO₂, COOH, ferner auch CO und COH sind nicht geeignet.

Ferner sind mehrere aromatische Hydroxylgruppen haltige reduzierende Systeme, wie z. B. Hydrochinon und *p*-Amino-phenol, ungeeignet, ja ihre Gegenwart in größeren Mengen — z. B. Hydrochinon — verhindert die Reaktion von Stoffen, die an sich allein positiv reagieren. Benzoyliert¹⁷⁾ oder veräthert man jedoch z. B. im Hydrochinon den einen Phenolrest, oder verwandelt man das *p*-Amino-phenol in *p*-Acetylamino-phenol, so tritt die Farbstoff-Bildung sehr schön ein.

Hydrierung vernichtet die Reaktionsfähigkeit. *p*-Methyl-cyclohexanol reagiert nicht. Man kann, wie wir uns überzeugten, einen in technischen Produkten vorkommenden *p*-Kresol-Gehalt im *p*-Methyl-cyclohexanol quantitativ bestimmen.

Im folgenden geben wir zur Orientierung die Substanzen an, welche nach unserer bisherigen Untersuchung positiv reagieren, und ferner einige der typischen Fälle, in denen negative Reaktion vorliegt.

Positiv reagieren: Tyrosin, *N*-Benzoyl-tyrosin, Tyrosol (*p*-Oxyphenyl-äthylalkohol), Tyramin (*p*-Oxyphenyl-äthylamin), *p*-Kresol, *p*-Äthyl-phenol, Xylenol (CH₃:CH₃:OH 1:2:4), Xylenol (CH₃:CH₃:OH 1:3:4), *p*-Chlor-phenol, *p*-Chlor-*m*-kresol, *p*-Brom-*m*-kresol, Chlor-xylenol (CH₃:Cl:CH₃:OH 1:2:3:5), *p*-phenol-sulfonsaures Natrium, *p*-Acetylamino-phenol, Monobenzoyl-hydrochinon, Hydrochinonmonomethyläther, Phenol-phthalein, β -Naphthol, das Sexualhormon-Gemenge „Follikulin“

Nicht reagieren: *O,N*-Dibenzoyl-tyrosin, *o*-Nitro-tyrosin, 3,4-Dioxyphenylalanin, Adrenalin, Thyroxin, Phenol, Brenzcatechin, Resorcin, Hydrochinon, *o*-Kresol, *m*-Kresol, Xylenol (CH₃:CH₃:OH 1:3:5), Xylenol (CH₃:CH₃:OH 1:4:5), Xylenol (CH₃:CH₃:OH 1:2:3), Iso-pseudocumenol (CH₃:CH₃:CH₃:OH 1:2:4:6), *p*-Nitrophenol, Trichlor-phenol (OH:Cl:Cl:Cl 1:2:4:6), *p*-Thio-kresol, *p*-Oxy-benzaldehyd, *p*-Oxy-benzoesäure, *p*-Amino-phenol, *p*-Oxy-benzophenon, Resacetophenon, *p*-Methylcyclohexanol, Dekahydro- β -naphthol, α -Naphthol, Vanillin, *o*-Vanillin, Coniferin, Fisetin, Tannin, Eugenol, Thymol, Terpeneol, Chinon.

Das Follikel-Hormon wurde uns von Hrn. Prof. Zondek, Berlin, geliefert und einerseits in einer fertigen Lösung (500 ME/ccm) und andererseits von uns gelöst (1 mg = 8000 ME/ccm) geprüft. Die Reaktion war rot und in Anbetracht der wahrscheinlichen Verwandtschaft der Substanz mit β -Naphthol wider Erwarten nur schwach positiv.

Auf einen Umstand möchten wir, um Irrtümer auszuschließen, aufmerksam machen: Viele Phenole, so Phenol, *m*-Kresol, Vanillin, geben in z. B. 0.1-proz. Lösungen bei der Durchführung der Reaktion, ja mit Salpetersäure allein, Rotfärbungen. Als positiv betrachten wir die Reaktion jedoch

¹⁵⁾ F. Raschig, Ztschr. angew. Chem. **13**, 759 [1900]; F. Raschig u. G. Forstmann, ebenda **14**, 157 [1901]; H. Brückner, ebenda **41**, 1044 [1928].

¹⁶⁾ Diese Untersuchungen werden durch Frl. G. Döhler durchgeführt.

¹⁷⁾ O. N. Witt u. Johnson, B. **26**, 1909 [1893].

nur dann, wenn, wie bei Tyrosin, *p*-Kresol usw., auch bei starker Verdünnung des Farbstoffes, z. B. durch Eingießen von 1 ccm der 0.1-proz. Lösung unmittelbar nach Durchführung der Reaktion in 100 ccm Wasser, die Färbung noch intensiv rot bzw. violett sichtbar bleibt. Bei α - und β -Naphthol ist der vergleichende Versuch von vornherein bei einer Verdünnung 1 : 10000 oder 1 : 100000 zu machen.

Mit der Untersuchung der sich bildenden Farbstoffe und der weiteren Aufklärung des Reaktions-Mechanismus sind wir beschäftigt.

Wir möchten nicht verfehlen, der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft für Unterstützung der Arbeit, ferner den HHrn. Geheimrat Abderhalden, Halle, Privatdoz. Dr. Küntzel, Darmstadt, Prof. Schrauth, Berlin und der Gesellschaft für Teerverwertung G. m. b. H. in Duisburg-Meiderich für die Überlassung von Präparaten bestens zu danken.

91. Kurt Brass und Eduard Kurz: Versuche zur Herstellung von Estern der Zucker mit Monochlor-essigsäure.

[Aus d. Institut für Organ.-chem. Technologie d. Deutsch. Techn. Hochschule Prag.]
(Eingegangen am 9. Februar 1933.)

Unsere ursprüngliche Absicht war es, den Tri-ester der Monochlor-essigsäure der Cellulose herzustellen, was von anderer Seite bisher vergeblich versucht worden ist¹). Es ist jedoch nicht gelungen, unsere Absicht zu verwirklichen, sondern wir gelangten, ähnlich wie H. Rudy¹), nur zu Estern einer stark abgebauten Cellulose, deren Chlorgehalte zwischen 22 und 28.5 % schwankten und deren Kupferzahlen 6.03—8.19 betrugten²). Einem Cellulose-tri-monochloracetat entsprechen 27.17 % Chlor.

Daraufhin wendeten wir uns der Glucose zu, deren Monochlor-essigsäure-ester gleichfalls unbekannt sind. Die Einwirkung des Anhydrids der Monochlor-essigsäure allein oder in Gegenwart von Zinkchlorid oder konz. Schwefelsäure auf β -*D*-Glucose ergab glasige Präparate, deren Chlorgehalte zwischen 19.24 und 29.5 % lagen (Penta-monochloracetyl-glucose enthält 31.52 % Chlor) und deren Drehwerte (nahe an +60°) darauf hinweisen, daß eine teilweise Umlagerung der β -Form in die α -Form eingetreten war. Überdies ergab die Verseifung der Veresterungsprodukte mit Baryt keine Glucose, wohl aber war die letztere erst dann einwandfrei nachzuweisen, nachdem die Verseifungsprodukte der Hydrolyse unterworfen worden waren.

Daraus muß geschlossen werden, daß bei diesen Versuchen nicht nur Veresterung, sondern auch Kondensation des Zuckers eingetreten war. Von zwei Veresterungsprodukten konnten hygroskopische, nicht krystallisierte Pyridiniumsalze³) erhalten werden, deren Zusammensetzung den Schluß erlaubt, daß in dem einen Fall, gerechnet auf 1 Mol. Tetra-monochloracetyl-glucose 3 Mol., in dem anderen Fall sogar 4 Mol. Pyridin eingetreten sind²).

¹) W. L. Barnett, Journ. Soc. chem. Ind. **40**, 253 [1921]; C. **1922**, I 630; Soc. Usines chim. Rhône-Poulenc, Franz. Pat. 672 220 [1929]; H. Rudy, Dissertat. München 1928; Cellulose-Chem. **13**, 49 [1932]; Hrn. Prof. R. Kuhn (Heidelberg) sei auch an dieser Stelle für die Überlassung der Dissertation bestens gedankt.

²) Näheres siehe E. Kurz, Dissertat. Dtsch. Techn. Hochsch. Prag 1932.

³) E. Fischer u. K. Raske, B. **43**, 1750 [1910].