

6) Tetradeca-hexaen-(2.4.6.8.10.12),



1.35 g Tetradecapentaenol wurden unter N_2 in 20 ccm Dioxan gelöst. Man gab 5 ccm einer 1-proz. Lösung von *p*-Toluolsulfonsäure in Dioxan zu und erhitzte 5 Min. auf dem Wasserbade. Dabei vertiefte sich die Farbe der Lösung nach dunkelgelb, und beim Abkühlen krystallisierte der Kohlenwasserstoff in mikroskopischen, gelben, dünnen, geschwungenen Blättchen aus. Man brachte ihn mit 150 ccm Benzol-Äther 1:1 in Lösung und wusch 3-mal mit dest. Wasser. Nach Zugabe einer Spur Hydrochinon und Trocknen über Natriumsulfat wurde im Vak. verdampft und der Rückstand unter N_2 aus 10 ccm Dioxan umkrystallisiert. Nach 1-stdg. Aufbewahren im Eisschrank wurde abgesaugt und mit Dioxan, später mit Benzin gewaschen. Ausb. 100 mg (8% d. Th.). Zur Analyse krystallisierten wir nochmals aus Dioxan um und sublimierten unter 10^{-3} mm ($160\text{--}180^\circ$, Temp. des Kupferblocks). Dabei ging die Hauptmenge in citronengelben Nadeln über, die bei 205° (evak. Röhrchen, bei 180° eingesetzt, unt. Zers., aber ohne Entfärbung) schmolzen. Der Sublimationsrückstand stellte ein bernsteingelbes Harz dar.

4.040 mg Stbst.: 13.24 mg CO_2 , 3.54 mg H_2O .

$\text{C}_{14}\text{H}_{18}$ (186.1). Ber. C 90.25, H 9.75. Gef. C 89.38, H 9.80.

Das Tetradecahexaen ist in Pyridin und Chloroform mäßig, in Benzol und Äther nur sehr wenig löslich. Die Löslichkeit in Hexan war selbst zur Messung des Absorptionsspektrums zu gering. Die Farbe der konzentrierteren Lösungen ist orange-gelb, die der verdünnteren citronengelb. Das Absorptionsspektrum in Chloroform zeigt 4 scharfe Banden bei 375, 360, 340 und 328 μ .

75. Otto Schales: Empfindliche Methoden zum Nachweis von Wasserstoffperoxyd und seiner Entstehung bei einigen Dehydrierungsvorgängen.

[Aus d. Pharmakolog. Institut d. Universität Tartu (Dorpat), Estland.]

(Eingegangen am 21. Januar 1938.)

Zahlreiche Oxydationsvorgänge verlaufen als Dehydrierungen. Hierbei wird von den oxydierbaren Stoffen Wasserstoff abgegeben, der, wenn es sich um enzymatische Dehydrierungen handelt, im Sinne der Wielandschen Theorie durch die Wirkung einer jeweils spezifischen Dehydrogenase aktiviert oder gelockert ist.

Spielt bei einem Dehydrierungsvorgang molekularer Sauerstoff die Rolle des Acceptors, so entsteht Wasserstoffperoxyd. Seiner Ansammlung im Reaktionsgemisch wirken aber häufig verschiedene Faktoren entgegen, so daß der Nachweis erschwert wird. Erstens kann Spaltung des Hydroperoxyds in Sauerstoff und Wasser erfolgen, die spezifisch durch Katalase, Schwermetallsalze und fein verteilte Edelmetalle und unspezifisch durch Oberflächeneffekte katalysiert wird. Zweitens kann Peroxyd als Wasserstoff-Acceptor wirken, wobei es zu Wasser hydriert wird, und bei der zu dehydrierenden

Ausgangssubstanz mit dem molekularen Sauerstoff in Wettbewerb treten. So ist, wie H. Wieland und W. Franke¹⁾ fanden, die Bildung von Hydroperoxyd bei der Autoxydation von zweiwertigem Eisen deshalb nicht nachweisbar, weil Wasserstoffperoxyd (z. B. im Neutralpunkt 1000-mal) schneller mit zweiwertigem Eisen reagiert als molekularer Sauerstoff und sich infolgedessen nicht in einer zum Nachweis geeigneten Konzentration ansammeln kann.

Setzt man bei Dehydrierungsvorgängen Stoffe zu, die in leicht erkennbarer Weise durch Hydroperoxyd dehydriert oder oxydiert werden, während sie von molekularem Sauerstoff und vom Substrat im Rahmen der Versuchsbedingungen unbeeinflusst bleiben, so können sie unter Umständen das entstehende Wasserstoffperoxyd abfangen und sein Auftreten anzeigen. Ein derartiges Abfangverfahren haben H. Wieland und B. Rosenfeld²⁾ beschrieben. Es besteht darin, daß farbloses CerIII-hydroxyd durch H_2O_2 in rotbraunes, schwer lösliches CerIV-peroxyd übergeführt wird³⁾; neuerdings fand es auch in ähnlicher Form durch E. Plank⁴⁾ als Tüpfelreaktion zum Wasserstoffperoxyd-Nachweis Verwendung, wobei Peroxyd bis zu einer Grenzkonzentration von 1 : 160000 erfaßt werden konnte.

Weitere, empfindlichere Methoden zum Nachweis von Hydroperoxyd finden sich in der Literatur nur spärlich. R. Kempf⁵⁾ beschreibt ein Verfahren, das auf der Bildung von Bleisulfat aus Bleisulfid und Wasserstoffperoxyd beruht und letzteres [nach F. Feigl und E. Fränkel⁶⁾] noch in einer Verdünnung von 1 : 1250000 erkennen läßt. Die eben genannten Autoren geben (l. c.) einige weitere Tüpfelreaktionen an, von denen lediglich der Nachweis des Hydroperoxyds durch Entfärbung höherer Nickeloxyde (G. K. 1 : 5000000) empfindlicher als das Verfahren von Kempf ist. In der gleichen Konzentration von 1 : 5 Millionen läßt sich H_2O_2 auch mit Hilfe von 3-Amino-phthalsäurehydrazid (Luminol) eben noch subjektiv erkennen, wie W. Langenbeck und U. Ruge⁷⁾ feststellten. In eigenen Versuchen gelangte ich zum gleichen Zahlenwert, doch läßt sich die Empfindlichkeit vermutlich noch erheblich steigern, wenn man die auftretende Lumineszenz objektiv mißt, wie dies C. N. Zellner und G. Dougherty⁸⁾ bei der vergleichenden Untersuchung einiger Phthalhydrazide beschrieben haben.

Im folgenden soll die Brauchbarkeit und Anwendung von Phthalin zum Hydroperoxydnachweis an zwei Beispielen (Phenolphthalin und Fluorescin) erörtert werden. Weiterhin wird über einige Erfahrungen mit Luminol berichtet und die Bildung von Peroxyd bei verschiedenen Dehydrierungen festgestellt.

Phenolphthalin.

Erhitzt man Phenolphthalein (I) mit Zink in alkalischer Lösung, so erhält man das durch A. v. Baeyer⁹⁾ zuerst dargestellte Phenolphthalin (II), dessen Lösungen in Alkali farblos sind.

¹⁾ A. **473**, 289 [1929].

²⁾ A. **477**, 32 [1930].

³⁾ Lecoq de Boisbaudran, Compt. rend. Acad. Sciences **100**, 605 [1885].

⁴⁾ Ztschr. analyt. Chem. **99**, 105 [1934].

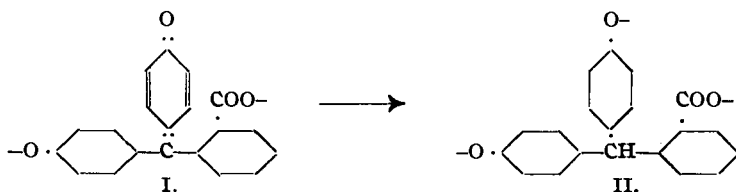
⁵⁾ Ztschr. analyt. Chem. **89**, 88 [1932].

⁶⁾ Mikrochem. **12**, 303 [1933].

⁷⁾ B. **70**, 367 [1937].

⁸⁾ Journ. Amer. chem. Soc. **59**, 2580 [1937].

⁹⁾ A. **202**, 80 [1880].



Durch Stehenlassen an der Luft röten sie sich langsam wieder, wie schon A. v. Baeyer feststellte⁹⁾, und durch Kalium-eisenIII-cyanid oder Kaliumpermanganat kann Phenolphthalin rasch in Phenolphthalein rückverwandelt werden⁹⁾.

Die erste Anwendung des Phenolphthalins für analytische Zwecke beschreiben J. H. Kastle und O. M. Shedd¹⁰⁾, die fanden, daß es zum Nachweis von Oxydasen geeignet ist. So vermag Kartoffel-Oxydase das Phthalin allmählich zu oxydieren. Erich Meyer¹¹⁾ zeigte, daß auch die Oxydase der Leukocyten in gleicher Richtung wirkt und daß das Reagens auch zum Blut-Nachweis gebraucht werden kann, wenn man Wasserstoffperoxyd zusetzt. Hydroperoxyd allein oxydiert Phenolphthalin nur sehr langsam¹²⁾¹³⁾. Erst bei Gegenwart eines Überträgers, wie er im peroxydatisch wirkenden Hämoglobin bzw. Hämin gegeben ist, erfolgt rasche Rotfärbung in alkalischer Lösung. Auch Kupfer vermag die Oxydation von Phenolphthalin durch Wasserstoffperoxyd zu katalysieren, wie P. Thomas und G. Charpentier angeben¹³⁾, die daraus eine empfindliche Methode zum Kupfer-Nachweis ableiten (G. K. 1 : 100 Millionen).

Die Oxydation von Phenolphthalin durch Blausäure bei Gegenwart von Kupfer fanden unabhängig voneinander F. Weehuizen¹⁴⁾ und A. S. Loevenhart¹⁵⁾. Weehuizen gründete auf diese Reaktion, mit der sich später auch I. M. Kolthoff¹⁶⁾ und insbesondere J. Stamm¹⁷⁾ befaßt haben, ein Verfahren zum Nachweis von Blausäure. Bezüglich des Mechanismus dieser indirekten Oxydation durch Blausäure nehmen I. M. Kolthoff und J. J. Lingane¹⁸⁾, die daraus eine Methode zum Kupfernachweis entwickelten (G. K. 1 : 200 Millionen), an, daß KupferII-cyanid Phenolphthalin zu oxydieren vermag, und daß der Vorgang sich, infolge der Reoxydation des KupferI-cyanids durch Luftsauerstoff, fortgesetzt wiederholen kann. Daß sich Phenolphthalin (bei Gegenwart von Kupfer) zur Prüfung des Peroxydgehaltes von Äther gut eignet, zeigte J. Stamm¹⁹⁾, und K. Seiler²⁰⁾ stellte fest, daß die Phenolphthalinprobe nach Stamm noch den Nachweis von $1 \times 10^{-5}\%$ Wasserstoffperoxyd im Äther gestattet (G. K. 1 : 10 Millionen).

Auch in wäßriger Lösung konnte ich (mit der von J. Stamm gewählten Phenolphthalin-Konzentration) Wasserstoffperoxyd noch in einer Verdünnung

¹⁰⁾ Amer. chem. Journ. **26**, 526 [1901] (C. **1902** I, 489).

¹¹⁾ Münchner Med. Wschr. **50**, 1489 [1903].

¹²⁾ Utz, Chem.-Ztg. **27**, 1151 [1903], sowie G. Rossi, Giorn. Farmac. Chim. **60**, 433 [1911] (C. **1911** II, 1659).

¹³⁾ Compt. rend. Acad. Sciences **173**, 1082 [1921]; vergl. auch P. Thomas, Biochem. Ztschr. **293**, 396 [1937]. ¹⁴⁾ Pharmac. Weekbl. **42**, 271 [1905] (C. **1905** I, 1191).

¹⁵⁾ B. **39**, 133 [1906].

¹⁶⁾ Ztschr. analyt. Chem. **57**, 11 [1918].

¹⁷⁾ Pharmacia **4**, 18 [1924].

¹⁸⁾ Mikrochemie, Molisch-Festschrift, S. 274 [1936].

¹⁹⁾ Pharmacia **4**, 232 [1924].

²⁰⁾ Schweiz. Apotheker-Ztg. **63**, Nr. 19 [1925].

von 1 : 10 Millionen nachweisen, und durch Modifikation des Reagenses und seiner Anwendung läßt sich die Empfindlichkeit soweit steigern, daß Hydroperoxyd noch mit völliger Sicherheit bei einer Konzentration von 1 : 100 Millionen feststellbar ist. Meines Wissens stellt diese Farbreaktion damit die empfindlichste dar, die in der analytischen Chemie für die Erkennung einer chemischen Verbindung beschrieben ist. Wegen dieser hohen Empfindlichkeit halte ich diese Reaktion ganz besonders geeignet für den Nachweis der Peroxydbildung bei biochemischen Vorgängen (Dehydrasewirkungen u. a.).

Bei der Anwendung von Phenolphthalin ist man übrigens nicht auf farblose Reaktionsmischungen beschränkt; auch in Lösungen, die durch ihre Eigenfarbe den Farbton des entstehenden Phenolphthaleins verdecken, kann dessen Vorhandensein nachgewiesen werden. Bereits A. v. Baeyer²¹⁾ teilte mit, daß Phenolphthalein in alkalischer Lösung eine charakteristische Absorptionsbande im grünen Teil des Spektrums besitzt. Nach J. Formánek und J. Knop²²⁾ ist diese Bande etwas unsymmetrisch; das von der Mitte des Streifens leicht rotwärts verschobene Maximum bestimmten sie bei 556.5 m μ . In eigenen Messungen fand ich eine Bande von 565.3—544.0 m μ (errechnete Mitte 554.7 m μ), während Richard Meyer und Karl Marx²³⁾ bei einer höheren Konzentration als Lage der Bande 570—539 m μ angeben, woraus sich in guter Übereinstimmung mit meiner Zahl als Mitte 554.5 m μ ergibt. Da der Absorptionsstreifen sehr kräftig ist und noch in außerordentlich verdünnten Lösungen leicht beobachtet werden kann, läßt sich ganz allgemein mit Hilfe des Spektroskops die Anwesenheit von Phenolphthalein in gefärbten Lösungen feststellen. Davon ist merkwürdigerweise auch noch kein Gebrauch gemacht worden zur Erkennung des Umschlagpunktes bei der Titration gefärbter Lösungen.

Auch bei einer Wasserstoffionen-Konzentration, bei der Phenolphthalein noch als farblose Säure vorliegt, erfolgt durch Peroxyd Umwandlung des Phthalins zum Phthalein, wie unten in einem Versuch mit Schardinger-Enzym gezeigt wird. Die Entstehung von Phenolphthalein ist dann durch Alkalizusatz nach Ablauf der Reaktion sichtbar zu machen. Wieweit sich andere Phthaleine, die ihren Umschlagpunkt im physiologischen p_H-Bereich haben, in der Phthalin-Form zum Peroxydnachweis bewähren, wird noch geprüft. Bei Tüpfelreaktionen ist die Empfindlichkeit des Phthalin-Reagenses geringer als im Reagensglas-Versuch. Die mit Sicherheit erfaßbare Grenzkonzentration beträgt dann nur 1 : 1 Million, da auch der Blindwert infolge der relativ großen Oberfläche der Tropfen bei Luftzutritt eine gewisse Färbung zeigt. Immerhin lassen sich so bei der von mir angewandten Tropfengröße von 0.04 ccm noch 0.04 γ H₂O₂ völlig sicher nachweisen.

Fluorescin.

Gleich den übrigen Phthaleinen läßt sich auch Resorcin-Phthalein leicht zum entsprechenden Phthalin reduzieren und geht durch Oxydationsmittel wieder in Fluorescin über. J. Stamm²⁴⁾ benutzte Fluorescin zum Nachweis von Blausäure bei Gegenwart von Kupfer, entsprechend der gleichartigen Verwendung von Phenolphthalin. Nach den Angaben von Stamm liegt die Grenzkonzentration für den Nachweis von Kaliumcyanid bei etwa 1 : 4.5

²¹⁾ A. 202, 73 [1880].

²²⁾ Ztschr. analyt. Chem. 56, 273 [1917].

²³⁾ B. 41, 2446 [1908].

²⁴⁾ Pharmacia 4, 25 [1924].

Millionen bei Beobachtung im Sonnenlicht. Im Versuchsteil beschreibe ich, wie man mit Hilfe von Fluorescin bei ungünstiger künstlicher Beleuchtung Wasserstoffperoxyd noch in einer Konzentration von 1 : 5 Millionen erkennen kann und wie, durch Beobachtung im ultravioletten Licht, die G. K. 1 : 10 Millionen erreicht wird.

Für eine ausgedehntere Anwendung kommt Fluorescin meines Erachtens nicht in Betracht, da das Reagens sich beim Aufbewahren verhältnismäßig rasch reoxydiert und deshalb nur sehr begrenzte Zeit verwendbar bleibt.

Luminol.

Bezüglich der früheren Literatur über 3-Amino-phthalsäure-hydrazid (Luminol) sei auf K. Gleu und K. Pfannstiel²⁵⁾ und auf W. Langenbeck und U. Ruge⁷⁾ verwiesen. Gleu und Pfannstiel fanden, daß krystallisiertes Hämin infolge seiner peroxydatischen Fähigkeit die Wirkung von Wasserstoffperoxyd auf Luminol besonders stark zu steigern vermag, so daß eine sehr helle und langdauernde Lumineszenz erzielt werden kann. Zu meinen Versuchen diente deshalb das Luminol-Reagens in der von Langenbeck und Ruge⁷⁾ angegebenen Form — 100 mg 3-Amino-phthalsäurehydrazid, gelöst in 100 ccm 1-proz. Natriumcarbonat-Lösung unter Zusatz von 2 mg Chlorhämin. Beim Peroxydnachweis läßt sich das gewöhnliche Hämin aber auch durch das wasserlösliche c-Hämin ersetzen, das G. Barkan und O. Schales²⁶⁾ vor kurzem im Blut entdeckt und vom Protohämin getrennt haben. Für manche Zwecke kann die Verwendung des wasserlöslichen c-Hämins an Stelle von Chlorhämin von Vorteil sein. Das Luminol-Reagens ist auch geeignet, um Äther auf einen Gehalt an Peroxyden zu prüfen. Man versetzt 1 ccm des Reagenses mit 1 ccm des zu prüfenden Äthers; das Vorhandensein von Peroxyden zeigt sich dann durch einen lumineszierenden Ring an der Berührungsfläche beider Flüssigkeiten an. Schüttelt man um, so luminesciert die gesamte wäßrige Phase. Aus der Beobachtung von Gleu und Pfannstiel, daß Hämin außerordentlich lumineszenzsteigernd wirkt, entwickelte W. Specht²⁷⁾ auf deren Anregung hin ein Verfahren zur Aufindung forensisch wichtiger älterer Blutspuren.

Hierzu muß ich auf Grund meiner Versuche verschiedenes bemerken. Zunächst ist festzustellen, daß das Reagens von Specht (Luminol-Wasserstoffperoxyd-Gemisch, vergl. Versuchsteil) von vornherein deutliche Lumineszenz zeigt, die aus mehreren Metern Entfernung gut zu sehen ist. Die Angabe von Gleu und Pfannstiel, daß Luminol mit Hydroperoxyd zusammen ohne Gegenwart eines Katalysators nicht leuchtet, beruht auf einem Irrtum. Auch H. O. Albrecht²⁸⁾ fand bereits, daß Luminol von Wasserstoffperoxyd langsam oxydiert wird und währenddessen luminesciert. Selbstverständlich wird dabei das Luminol allmählich zerstört. Das Reagens von Specht ist also nur begrenzte Zeit haltbar. Weiterhin meint Specht, daß der Nachweis von Blutspuren mit Hilfe seines Reagenses als spezifisch zu bezeichnen sei. Dies trifft aber nur in begrenztem Umfange zu. Gibt man beispielsweise zu 1 ccm seines Reagenses nur 0.1 ccm einer $m/_{200}$ -Kupfer-

²⁵⁾ Journ. prakt. Chem. [2] **146**, 137 [1936].

²⁶⁾ Ztschr. physiol. Chem. **246**, 181 [1937]; II. Mitteil.: O. Schales, B. **70**, 1874 [1937].

²⁷⁾ Angew. Chem. **50**, 155 [1937].

²⁸⁾ Ztschr. physik. Chem. **136**, 321 [1928].

sulfatlösung in *n*-Ammoniak, so tritt ebenfalls eine außerordentlich starke Luminescenz auf, die aber innerhalb einer Minute wieder abklingt. Setzt man nun 1 ccm einer Hämin-Lösung zu (2.5 g Chlorhämin gelöst in 100 ccm 1-proz. Soda), so bleibt die Lösung dunkel. Ohne Kupfergegenwart leuchtet dagegen 1 ccm des Reagenses intensiv etwa 15 Min. lang, wenn es mit 1 ccm Hämin-Lösung versetzt wird. Diese außerordentlich starke Luminescenz kann man aber fast schlagartig und völlig zum Verschwinden bringen, wenn man etwas Kupfersulfat-Lösung zufließen läßt. Aus diesen Versuchen folgt, daß der Nachweis von Spuren Hämin bei Anwesenheit von Kupferionen mit Hilfe von Spechts Reagens nicht mehr zu führen ist. Eine Mischung von Hämin und Kupfer verhält sich bei Reagens-Zugabe ebenso wie Kupfer allein. Da das Verfahren von Specht zum Nachweis forensisch wichtiger Blutspuren bestimmt ist, also auch z. B. zum Nachweis von Blutspuren im Garten- gelände (vergl. Spechts Angaben), ist das Versagen der Nachweismethode bei Gegenwart von Kupfer auch praktisch bedeutsam.

Ähnlich wie Kupfer-Ionen wirken auch Kobalt- und Mangan-Ionen stark kürzend auf die Luminescenzdauer. Nickel-Ionen dagegen beeinflussen die Dauer des Leuchtens zwar nicht, erniedrigen aber dessen Intensität wesentlich. Specht gibt an, sein neuer Blutnachweis sei deshalb für den forensischen Chemiker um so wertvoller, als nach der Luminescenzprobe noch die spektroskopische Untersuchung des aufgefundenen Hämins und seine Überführung in Hämochromogen vorgenommen werden kann. Dies trifft aber, wie ich einwenden muß, nur zu, wenn es sich nicht um Blutspuren, sondern um reichliche Blutmengen handelt. Versetzt man 1 ccm des Reagenses mit 1 ccm der oben angegebenen Häminlösung und wartet das Abklingen der Luminescenz (etwa 15 Min.) ab, so ist erneutes Leuchten nur durch erneuten Häminzusatz, nicht aber durch Reagens-Zugabe zu erzielen. Das Hämin ist also zerstört worden, und dies ist nicht verwunderlich, da man weiß, daß Wasserstoffperoxyd Hämin in charakteristischer Weise unter Sprengung der α - und γ -Methinbrücke abbaut. Trotz aller dieser Einwände behält das Verfahren von Specht für den Nachweis von Blutspuren Bedeutung, sofern man meine Einschränkungen berücksichtigt.

Peroxydbildung bei einigen Dehydrierungen.

Durch Lösungen der folgenden Stoffe wurde Sauerstoff geleitet: Ascorbinsäure, Thioglykolsäure, Cystein, Glutathion, Schwefelwasserstoff, Natriumhyposulfit, Hydrazin und Adrenalin. Mit Hilfe der angegebenen Methoden konnte in sämtlichen Fällen das Auftreten von Peroxyd erkannt werden.

Das aus manometrischen Messungen des Sauerstoff-Verbrauchs abgeleitete Reaktionsschema, das E. S. G. Barron, R. H. DeMeio und F. Klemperer²⁹⁾ für die Autoxydation von Ascorbinsäure formulieren, nimmt bereits Bildung von Wasserstoffperoxyd an. Einen indirekten Beweis für die Entstehung von Peroxyd bei der Autoxydation von Cystein und Glutathion lieferte S. Thurlow³⁰⁾, die fand, daß in einem SH-System bei Gegenwart von Peroxydase und Nitrit letzteres zu Nitrat oxydiert wird. Daß auch Hydrazin bei Einwirkung von Sauerstoff Hydroperoxyd liefert, zeigte E. C.

²⁹⁾ Journ. biol. Chem. **112**, 625 [1936].

³⁰⁾ Biochem. Journ. **19**, 175 [1925].

Gilbert³¹⁾. Peroxydbildung bei der Autoxydation von Adrenalin war zu erwarten, weil A. Bach³²⁾ schon vor 40 Jahren beobachtet hatte, daß in Lösungen von Brenzcatechin nach der Einwirkung von Sauerstoff die charakteristischen Reaktionen von Peroxyden erhalten werden.

Die Anwendung von Luminol zum Nachweis der Peroxydbildung bei der Oxydation von Ascorbinsäure, Thioglykolsäure und Cystein haben bereits P. Holtz und G. Triem³³⁾ beschrieben. Sie beobachteten, daß die schwache Lumineszenz, die bei der Sauerstoffeinwirkung auf Cystein und Thioglykolsäure in Gegenwart von Luminol-Reagens auftritt, sich leicht wesentlich steigern läßt, wenn etwas Kupfersulfat (als Oxydationskatalysator für die SH-Körper) zugesetzt wird. Merkwürdigerweise stieg aber die an sich schon wesentlich stärkere Lumineszenz der Ascorbinsäurelösungen in den Versuchen von Holtz und Triem nicht an, wenn sie auch hier Kupfersulfat zufügten, obwohl bekanntlich Kupfer die Autoxydation von Ascorbinsäure beschleunigt. Im Gegensatz zu Holtz und Triem fand ich, daß Luminol geradezu bemerkenswert gut geeignet ist, die katalytische Wirkung von Kupfer auf die Dehydrierung von Vitamin C zu demonstrieren. Löst man im Reagensglas 10 mg Ascorbinsäure in 5 ccm 1-proz. Sodalösung, gibt 5 ccm Luminol-Reagens zu und durchströmt (bei einer Temperatur von 15—20°) im Dunkelmzimmer mit Sauerstoff, so zeigt sich nach 1—2 Min. deutliche, aber nicht sehr intensive Lumineszenz. Fügt man nun 0.5 ccm $m/100$ -Kupfersulfatlösung zu, so erreicht das Leuchten in wenigen Sekunden derartige Stärke, daß man es aus mehr als 10 Meter Entfernung sehen kann, und daß alle Gegenstände im Umkreis von mehreren Metern zu erkennen sind.

Gibt man zu einer verdünnten alkalischen Lösung von Cystein oder Thioglykolsäure Phenolphthalin und leitet Sauerstoff ein, so tritt, als Zeichen der Anwesenheit von Peroxyd, nach wenigen Minuten Rotfärbung auf. Im gleichartigen Versuch mit Ascorbinsäure bleibt das Reaktionsgemisch dagegen trotz Anwesenheit von Kupfer-Ionen farblos. Hier muß erst eine Spur Hämin zugesetzt werden, damit das entstehende Peroxyd Phenolphthalin oder Fluorescein zu oxydieren vermag.

Auch während der dehydrierenden Autoxydation von Glutathion, Schwefelwasserstoff, Natriumhyposulfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) und Adrenalin werden die Phthaline nur dann in gekoppelter Reaktion zu Phthaleinen oxydiert, wenn Hämin als Katalysator zugegen ist. Für den Nachweis der Peroxydbildung bei der Autoxydation von Glutathion mit Hilfe von Luminol ist Kupfer als Katalysator unentbehrlich; ohne Kupfer konnte keine Lumineszenz bei der gewählten Versuchsanordnung beobachtet werden.

Ein Beispiel dafür, daß Kupfer auch als Inhibitor der Lumineszenz aufzutreten vermag, lieferten außer den früher erwähnten Erfahrungen beim Hämin-Nachweis nach Specht die Versuche mit Natriumhyposulfit. Gibt man im Reagensglas zu 5 ccm einer 0.2-proz. Lösung von Natriumhyposulfit in Wasser das gleiche Volumen Luminol-Reagens, so beobachtet man sofort kräftige Lumineszenz. Sie nimmt rasch ab und bleibt schließlich nur an der Oberfläche als schmaler leuchtender Ring bestehen. Schwenkt man vorsichtig um, so leuchtet die benetzte Wandung ebenfalls. Leitet man nun Sauerstoff

³¹⁾ Journ. Amer. chem. Soc. **51**, 2744 [1929].

³²⁾ Compt. rend. Acad. Sciences **124**, 951 [1897].

³³⁾ Ztschr. physiol. Chem. **248**, 1 [1937].

ein, so erhält man eine prachtvolle Lumineszenz, die am stärksten an der Oberfläche und insbesondere im Schaum, den die Gasblasen erzeugen, ist. Die Zugabe einiger Tropfen $m/100$ -Kupfersulfat-Lösung bewirkt nun, daß augenblicklich die gesamte Leuchterscheinung erlischt und trotz weiterer Behandlung der Lösung mit Sauerstoff nicht mehr erscheint.

Von sonstigen Inhibitoren der Lumineszenz des 3-Amino-phthalsäurehydrazids sind vor kurzem von Zellner und Dougherty⁸⁾ Hydrochinon und Pyrogallol genannt worden. Sie fanden, daß der Zusatz kleiner Mengen dieser Stoffe zu einer starken Verminderung der Lichtintensität führt. Adrenalin inhibierte, obwohl es ein Dioxy-benzol-Derivat ist, in meinen Versuchen nicht, sondern vermochte sogar, durch die Peroxydbildung während seiner Autoxydation, Lumineszenz auszulösen. Kupferzusatz bewirkte hier keine Verstärkung der Leuchterscheinung. Den Übergang von Phenolphthalin in Phenolphthalein kann man übrigens in Lösungen, die 0.1 und mehr % Adrenalin enthalten, nicht direkt erkennen, da solche Lösungen unter der Wirkung von Sauerstoff an sich schon kräftige orangebraune Farbe annehmen. Hier ist jedoch die Bildung von Phenolphthalein leicht spektroskopisch nachzuweisen. Eine andere Möglichkeit ist noch die, die störende Braunfärbung durch Behandlung des Reaktionsgemisches mit Aluminiumoxyd zu beseitigen. Die braunen Produkte werden dann adsorbiert, und die überstehende alkalische Lösung zeigt die rote Farbe des Phenolphthaleins.

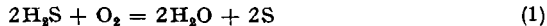
Gibt man zu alkalischer Hydrazin-Lösung Luminol-Reagens, so beobachtet man sofort eine schwache Lumineszenz. Das Leuchten ist stärker, wenn die Hydrazin-Lösung zuvor kurz mit Sauerstoff behandelt wurde. Einleiten von Sauerstoff nach Zugabe von Luminol steigert die Intensität des Leuchtens weiter und dieses wird besonders kräftig, wenn man wenig Kupfersulfat-Lösung zufließen läßt. Phthalin wird während der Einwirkung von Sauerstoff auf Hydrazin bei Gegenwart von Kupfer rasch oxydiert.

Als einfachste Sulfhydrylverbindung vom Typ R.SH wurde auch Schwefelwasserstoff auf die Bildung von Wasserstoffperoxyd während seiner Autoxydation untersucht. Gibt man zu H_2S -Wasser das gleiche Volumen Luminol-Reagens, so leuchtet die Mischung intensiv auf, dann sinkt die Lumineszenz rasch auf einen niedrigen Wert, bleibt aber einige Zeit deutlich erkennbar. Leitet man nun Sauerstoff ein, so wird das Leuchten innerhalb von 1 Min. wieder kräftig und verstärkt sich noch mehr, wenn wenig Kupfersulfat zugesetzt wird. Eine Schwefelwasserstoff-Lösung, die 10 Min. mit Sauerstoff behandelt wird (bei Gegenwart von Kupfer) zeigt, nach Zugabe von Luminol, sehr intensives Leuchten, das sich einige Zeit ohne weiteres Durchströmen mit Sauerstoff hält und aus einer Entfernung von 6 Metern noch deutlich zu sehen ist. Ähnlich intensitätssteigernd wie Kupfer wirken hier auch Nickel und Kobalt, während eine Beeinflussung durch kleine Mengen Mangan subjektiv nicht feststellbar ist; vergl. die Angaben von H. A. Krebs³⁴⁾ über die Wirkung der Schwermetalle auf die Autoxydation der Alkalisulfide und des Schwefelwasserstoffs. Interessant, aber zunächst nicht ohne weiteres erklärbar, ist das Verhalten der bei Gegenwart eines der Katalysatoren erzeugten Lumineszenz, wenn man eine kleine Menge eines der anderen Katalysatoren zusetzt. Es wird dann fast stets, nach kurzem Aufleuchten, nicht Zunahme, sondern

³⁴⁾ Biochem. Ztschr. 204, 343 [1929].

Verringerung des Leuchtens beobachtet, die soweit gehen kann, daß sehr rasch völlige Verdunkelung eintritt.

Aus der Tatsache, daß bei der Autoxydation von Schwefelwasserstoff mit Hilfe der angegebenen Methoden Peroxyd nachweisbar ist, folgere ich, daß für diesen Oxydationsvorgang nicht nur die Gleichung (1) gilt,



sondern auch die Reaktion nach Gleichung (2),



worauf dann durch das entstandene Wasserstoffperoxyd noch sekundäre Oxydationen, zum Teil bis zur Sulfat-Stufe, folgen können. Daß Luminol beim Zusammentreffen mit Schwefelwasserstoff vorübergehend aufleuchtet, hat, wie ich nach Abschluß meiner Versuche aus einer soeben erschienenen vorläufigen Mitteilung ersehe, auch C. Henze³⁵⁾ beobachtet.

Aus der Bildung von Peroxyd bei der Autoxydation der genannten Substanzen kann geschlossen werden, daß sie zuweilen trotz ihrer Verschiedenheit gleichartige Wirkungen auf andere Stoffe ausüben. Zwei Beispiele seien erwähnt.

S. Edlbacher³⁶⁾ zeigte, daß Glykokoll bei Gegenwart von Adrenalin oder Brenzcatechin oxydativ desaminiert wird. Ferner bemerkten P. Holtz und G. Triem³⁷⁾ bzw. P. Holtz und R. Heise³⁸⁾ bei der Einwirkung von Ascorbinsäure oder Sulfhydrylkörpern auf Histidin teils Decarboxylierung, teils Desaminierung und weitergehenden Abbau. Diesen Befunden entspricht, abgesehen von Feinheiten im Verlauf der einzelnen Versuche, die bekannte Tatsache, daß auch Wasserstoffperoxyd aus Aminosäuren Kohlendioxyd und Ammoniak abzuspalten vermag.

Wirken die in diesem Abschnitt genannten Peroxydbildner auf Häm in bzw. Hämoglobin ein, so entstehen grüne Pigmente, wie von zahlreichen Autoren beobachtet wurde³⁹⁾. Daß man den Blutfarbstoff auch durch Wasserstoffperoxyd in grüne Substanzen umwandeln kann, fanden vor kurzem G. Barkan und O. Schales⁴⁰⁾. Die Annahme, daß die Entstehung der grünen Häm in- bzw. Hämoglobin-Umwandlungsprodukte früherer Forscher mit dem Auftreten von Peroxyd zusammenhängt, ist naheliegend, da in allen Versuchen Sauerstoff zugegen sein muß. In einer demnächst erscheinenden Arbeit von Barkan und Schales wird hierauf näher eingegangen.

Demonstration der Peroxydbildung durch Schardinger-Enzym.

Das bei der Aldehyd-Dehydrierung durch Schardinger-Enzym entstehende Wasserstoffperoxyd konnten H. Wieland und B. Rosenfeld²⁾ unter Verwendung gereinigter Fermentlösungen mit Hilfe von CerIII-hydroxyd abfangen. Auch ohne Anreicherung des Enzyms läßt sich die Bildung von H_2O_2 während der Einwirkung der Dehydrase auf Salicylaldehyd demonstrieren. Während Luminol nur geringfügiges Leuchten zeigt, da es keine

³⁵⁾ Klin. Wschr. 17, 24 [1938].

³⁶⁾ Ztschr. physiol. Chem. 178, 239 [1928].

³⁷⁾ Ztschr. physiol. Chem. 248, 5 [1937].

³⁸⁾ Arch. exper. Pathol. Pharmakol. 186, 269 [1937].

³⁹⁾ vergl. z. B. Hans Fischer u. Fritz Lindner, Ztschr. physiol. Chem. 153, 54 [1926]; O. Warburg u. E. Negelein, B. 63, 1816 [1930]; R. Lemberg, Biochem. Journ. 29, 1322 [1935].

⁴⁰⁾ Ztschr. physiol. Chem. 248, 96 [1937].

Abfangwirkung ausübt und somit nur das jeweils noch vorhandene Hydroperoxyd kenntlich zu machen vermag, kann mit Hilfe von Phthalin die Peroxyd-Entstehung besonders augenfällig gemacht werden.

Hrn. Dr. K. Gleu danke ich für die freundliche Überlassung von etwas 3-Amino-phthalsäurehydrazid, der Firma F. Hoffmann-La Roche & Co. A.-G. (Basel) für Ascorbinsäure, Cystein und Glutathion. Zu den spektroskopischen Messungen konnte ich eine Apparatur benutzen, deren leihweise Überlassung Hr. Prof. G. Barkan der Deutschen Forschungsgemeinschaft verdankt.

Bei der Durchführung der Versuche erfreute ich mich der eifrigen und geschickten Hilfe von Fr. Selma Sussi.

Beschreibung der Versuche.

1) Herstellung des Phenolphthalein-Reagenses.

1 g Phenolphthalein wird mit 10 g NaOH, 5 g Zn-Staub und 20 ccm Wasser versetzt und unter Rückfluß gekocht, bis die Lösung farblos geworden ist, wozu etwa 2 Stdn. benötigt werden. Nach dem Erkalten wird durch ein gehärtetes Filter gegossen und mit Wasser auf 50 ccm verdünnt. Über einigen Zn-Granulas gut verschlossen im Dunkeln aufbewahren.

Zur Bestimmung der durch dieses Reagens noch erfaßbaren Grenzkonzentration werden H_2O_2 -Verdünnungsreihen aus Perhydrol (Merck) bereitet. Zu 1 ccm der auf Peroxyd zu prüfenden Lösung gibt man im Reagensglas 1 Tropfen $m_{/100}$ $CuSO_4$ -Lösg. und 1 Tropfen Reagens, wobei hier wie in allen folgenden Versuchen 1 Tropfen = 0.04 ccm ist. H_2O_2 in der Verdünnung 1:2 Millionen gibt noch einen sehr kräftigen Effekt, bei der G. K. 1:10 Millionen zeigt sich nach 5 Sek. Rosafärbung, die nach 20 Sek. noch zugenommen hat und wesentlich kräftiger als der schwache rosa Schimmer peroxydfreier Blindproben ist. Tüpfelreaktion: Je 1 Tropfen Peroxydlösg., $CuSO_4$ -Lösg. und Reagenslösg. werden auf der Tüpfelplatte zusammengegeben. Erst bei der H_2O_2 -Konzentration 1:1 Million zeigt sich eine deutlich stärkere Färbung als im Blindversuch. Erfassungsgrenze: 0.04 γ .

Verdünntes Reagens: 10 ccm obiger Reagenslösg. werden mit 30 ccm Wasser verdünnt. 1 Tropfen davon wird zu 5 ccm der auf Peroxyd zu prüfenden Lösg. gegeben, so daß die Konzentration an Phthalin auf $1/20$ gegenüber der oben angewandten sinkt. Nach Zugabe von 1 Tropfen $CuSO_4$ -Lösg. bleibt die peroxydfreie Blindprobe völlig farblos, während eine H_2O_2 -Konzentration 1:100 Millionen nach 30 Sek. rosa Schimmer, nach 3 Min. deutliche Rosafärbung zeigt bei der Betrachtung gegen einen weißen Hintergrund. Eine Peroxydlösg. 1:200 Millionen zeigt gegenüber einer Blindprobe nach 5 Min. eine sehr schwache Rosafärbung, die aber nur mit Mühe wahrgenommen werden kann, und deren Feststellung ich deshalb nicht mehr für unbedingt sicher durchführbar halte. Zu allen späteren Versuchen findet nur das verdünnte Phenolphthalin-Reagens Verwendung.

2) Herstellung des Fluorescein-Reagenses²⁴⁾.

Zu 10 mg Fluorescein gibt man 5 ccm Alkohol, 7 ccm Wasser, 1 g NaOH sowie eine Spatelspitze Zn-Staub und erwärmt das Gemisch auf dem Wasserbad, bis die Fluoreszenz verschwunden ist. Nach dem Erkalten wird mit Wasser auf 100 ccm verdünnt, dann werden 100 ccm Alkohol zugesetzt und filtriert. Die erhaltene Lösung ist farblos und zeigt schwache Fluoreszenz. Gibt man 1 Tropfen dieser Lösg. zu 1 ccm Wasser und setzt 1 Tropfen $m_{/100}$ $CuSO_4$ -Lösg. zu, so zeigt sich bei diffusum Tageslicht keine Fluoreszenz. Fluoreszenz tritt aber innerhalb 1 Min. auf, wenn sich das Reagens in einer Lösg. befindet, die (außer Cu) H_2O_2 in der G. K. 1:5 Millionen enthält.

Verdünntes Reagens: 5 ccm obiger Fluoresceinlösg. werden mit Wasser auf 100 ccm verdünnt. Zu 5 ccm peroxydhaltiger Lösg. gibt man im Reagensglas 2 Tropfen

des verd. Reagenses sowie 2 Tropfen $m/100$ - CuSO_4 -Lösung. und beobachtet die Fluoreszenz unter der Analysen-Quarzlampe. Wasserstoffperoxyd in der Konzentration 1:10 Millionen erzeugt noch (innerhalb von 2 Min.) deutliche Fluoreszenz, die peroxydfreie Blindprobe fluoresziert nicht. Die verd. Reagenslösung oxydiert sich sehr leicht, wie an der nach einigen Tagen bei gewöhnlichem Licht zu beobachtenden Fluoreszenz erkannt wird; sie muß deshalb stets vor Gebrauch frisch aus der konz. Lösung. bereitet werden. Auch die konz. Lösung. oxydiert sich innerhalb einiger Wochen deutlich. Soweit Fluoreszenz in den folgenden Versuchen benutzt wird, handelt es sich stets um das verdünnte Reagens und um Fluoreszenz-Beobachtungen im ultravioletten Licht.

3) Phenolphthalein-Spektrum.

Zu 25 ccm 1-proz. Na_2CO_3 -Lösung. gibt man 0.015 ccm 0.5-proz. Lösung. von Phenolphthalein in 96-proz. Alkohol. Die Lösung. enthält dann 3γ des Indicators im ccm. Bei einer Schichtdicke von 1 cm und einer Spaltbreite von 0.005 mm findet man im Meß-Spektroskop (nach Schumm, schwach dispergierendes Gitter) eine Bande von 565.3 bis 544.0 $m\mu$, Mitte: 554.7 $m\mu$.

4) Wasserlösliches c-Hämin als Lumineszenz-Katalysator.

In zwei Reagensgläser gibt man je 5 ccm einer 0.1-proz. Lösung. von 3-Amino-phthalsäurehydrazid in 1-proz. Na_2CO_3 -Lösung. sowie je 1 Tropfen 3-proz. H_2O_2 . Setzt man nun zu einem der Gläser 5 ccm einer Rohlösung. von c-Hämin, die sich auf Grund spektroskopischer Kontrolle als frei von Protohämin erweist, und zum anderen Glas 0.1 mg Chlorhämin, gelöst in 5 ccm 1-proz. Sodalösung. (Farbtiefe stimmt etwa mit derjenigen der c-Hämin-Lösung. überein), so zeigt sich in beiden Gläsern kräftige Lumineszenz, die bereits in diffusem Tageslicht sichtbar ist.

5) Versuche mit dem Hämin-Reagens nach Specht.

Das Reagens wird so bereitet, daß man zu 0.1 g 3-Amino-phthalsäurehydrazid 50 ccm 10-proz. Na_2CO_3 -Lösung. sowie 15 ccm 3-proz. H_2O_2 gibt und mit Wasser auf 100 ccm auffüllt. 1 ccm Reagens zeigt auf Zusatz von 1 ccm $m/200$ - CuSO_4 wesentliche Verstärkung der Lumineszenz. Gibt man zu 1 ccm Reagens 0.1 ccm $m/200$ - CuSO_4 in $n\text{-NH}_4\text{OH}$, so wird ebenfalls außerordentliche Verstärkung der Lumineszenz erzielt, die nach etwa 1 Min. abgeklungen ist. Setzt man nun nochmals Cu zu, so bleibt die Lösung. dunkel, und auch der Zusatz von 1 ccm Hämin-Lösung. (2.5 mg Chlorhämin, gelöst in 100 ccm 1-proz. Na_2CO_3 -Lösung.) bringt das Gemisch nicht mehr zum Leuchten.

Versetzt man 1 ccm Reagens mit 1 ccm Hämin-Lösung., so tritt starke Lumineszenz auf, die etwa 15 Min. anhält. Fügt man nach dem Abklingen des Leuchtens wiederum 1 ccm Reagens zu, so beobachtet man nur eine schwache und rasch vorübergehende Lumineszenz. Setzt man aber, statt Reagens, erneut 1 ccm Häminlösung. zu, so tritt wieder die anfängliche anhaltende und intensive Lumineszenz auf. Diese sehr kräftige Lumineszenz verschwindet fast schlagartig, wenn man 1 ccm $m/200$ - CuSO_4 in $n\text{-NH}_4\text{OH}$ zufügt. Der Zusatz von Ammoniak allein vermag die Intensität der Lumineszenz nicht zu verringern.

Versetzt man 1 ccm Hämin-Lösung. mit 0.1 ccm $m/200$ - CuSO_4 in $n\text{-NH}_4\text{OH}$ und gibt nun 1 ccm Reagens zu, so zeigt sich zwar eine kräftige Lumineszenz, sie verschwindet aber innerhalb von 30 Sek. völlig; waren anfangs nur 0.05 ccm ammoniakalischer Cu-Lösung. zugesetzt worden, so hält sich das Leuchten 1 Min. 30 Sek. lang; war 1 ccm ammoniakalischer Cu-Lösung. anwesend, so tritt nur für die Dauer von 15 Sek. infolge der Reagens-Zugabe Lumineszenz auf. Erneute Häminzugabe vermag dann keine Leuchterscheinung mehr auszulösen, erneute Reagens-Zugabe erzeugt die gleiche kurzdauernde Lumineszenz.

In vier Reagensgläsern werden je 1 ccm der obigen Hämin-Lösung. mit je 1 ccm einer der vier folgenden wäßrigen $m/200$ -Lösungn. versetzt: CuSO_4 , NiSO_4 , CoSO_4 und MnSO_4 . Die Lumineszenz in der Ni-haltigen Probe ist, nach Zusatz von 1 ccm Reagens, schwächer

als in einem Ansatz aus 1 ccm Häm-in-Lösg., 1 ccm Wasser und 1 ccm Reagens, hält sich aber ebenso lange. In den Gläsern, die Cu, Co oder Mn enthalten, tritt bei Zusatz von 1 ccm Reagens starke Lumineszenz auf. Sie verschwindet aber im Cu-haltigen Ansatz nach 30 Sek., im Co-haltigen Versuch nach 2 Min. und im Mn-Versuch nach 3 Min. Der Kontrollversuch, dem kein Schwermetall zugesetzt wurde, zeigte 15 Min. lang Lumineszenz.

6) Peroxydbildung bei einigen Dehydrierungen (Versuchstemp. 15—20°).

I) Ascorbinsäure.

a) Luminol-Versuch: siehe im theoret. Teil.

b) Phenolphthalin-Versuche: Ansatz 1. Reagensglas mit 10 ccm 1-proz. Na_2CO_3 -Lösg., 0.1 ccm m_{100} - CuSO_4 , 5 Tropfen Phenolphthalin-Reagens und 10 mg Ascorbinsäure. Leitet man Sauerstoff ein, so zeigt sich innerhalb von 2 Min. in der Lösg. ein sehr schwacher rosafarbener Schimmer, der durch 40 Min. lange O_2 -Einwirkung nicht verstärkt wird.

Ansatz 2 enthält alles, was in Ansatz 1 genannt wurde, aber außerdem noch 0.1 mg Chlorhäm-in. Das Einleiten von Sauerstoff bewirkt, daß nach 7 Min. deutliche Rosafärbung zu beobachten ist, die nun rasch zunimmt. Nach 8 Min. ist die Lösg. bereits kräftig rosa, nach 10 Min. rot, nach 15 Min. intensiv rot.

Ansatz 3 (Kontrolle) enthält alle Bestandteile von Ansatz 2, aber keine Ascorbinsäure. Das Einleiten von Sauerstoff bewirkt, daß in der Lösg. im Verlaufe von 2 Min. ein sehr schwacher rosafarbener Schimmer auftritt, der sich innerhalb von 20 Min. nicht verstärkt.

c) Fluorescin-Versuche: Es werden die gleichen Ansätze wie bei den Phenolphthalin-Versuchen durchgeführt, nur mit der Änderung, daß an Stelle von Phenolphthalin-Reagens jeweils 4 Tropfen Fluorescin-Reagens zugegeben werden. Nur in der häminhaltigen Lösg. tritt Fluoreszenz auf. Sie ist nach einer Sauerstoff-Einwirkung von 5 Min. noch schwach und wird innerhalb von 15 Min. kräftig.

II) Thioglykolsäure und Cystein.

a) Phenolphthalin-Versuch mit Thioglykolsäure. Der Ansatz enthält 10 ccm 0.5-proz. Na_2CO_3 -Lösg., 4 Tropfen Phthalin-Reagens, 4 Tropfen m_{100} - CuSO_4 und 10 mg Thioglykolsäure. Die Behandlung mit Sauerstoff bewirkt, daß sich die Lösg. nach 3 Min. deutl. rosa, nach 5 Min. dunkelrosa färbt.

b) Phenolphthalin-Versuch mit Cystein: Der Ansatz enthält 10 ccm 0.5-proz. Na_2CO_3 -Lösg., 4 Tropfen Phthalin-Reagens, 4 Tropfen m_{100} - CuSO_4 und 10 mg Cystein. Durch das Einleiten von Sauerstoff erfolgt nach 2 Min. deutliche Rosafärbung, nach 5 Min. ist die Lösg. dunkelrosa.

III) Glutathion.

a) Luminol-Versuch: 10 mg GSH werden in 5 ccm Wasser gelöst und 3 Min. mit Sauerstoff behandelt. Gibt man nun 5 ccm Luminol-Reagens zu, so zeigt sich keine Lumineszenz, auch nicht, wenn weiter Sauerstoff eingeleitet wird. Erst die Zugabe von 1 ccm m_{100} - CuSO_4 bewirkt, daß deutliche Lumineszenz auftritt, die sich bei weiterer Behandlung der Lösg. mit Sauerstoff noch verstärkt.

b) Phenolphthalin-Versuch: Ansatz: 10 ccm 0.5-proz. Na_2CO_3 -Lösg., 4 Tropfen m_{100} - CuSO_4 , 4 Tropfen Phthalin-Reagens und 10 mg GSH. Es wird Sauerstoff eingeleitet. Nach 6 Min. zeigt die Lösg. einen schwachen rosafarbenen Schimmer, der sich bei weiterer Behandlung mit Sauerstoff nicht verstärkt. Gibt man aber zu der rosafarben schimmernden Lösg. 0.1 mg Chlorhäm-in und leitet weiter Sauerstoff ein, so wird die Farbe nach 30 Sek. dunkelrosa, nach 1 Min. rot und nach 1 Min. 30 Sek. dunkelrot. Kontrollversuche ohne GSH führen nur zu einem sehr schwachen rosa Schimmer.

IV) Natriumhyposulfit.

a) Luminol-Versuch: siehe im theoret. Teil.

b) Phenolphthalin-Versuche: Ansatz 1. Es werden 5 ccm einer 0.2-proz. Lösg. von $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ in H_2O mit 1 ccm Häminlösg. versetzt (2.5 mg Chlorhämin gelöst in 100 ccm 1-proz. Na_2CO_3 -Lösg.), 2 Tropfen Phthalin-Reagens zugegeben und Sauerstoff eingeleitet. Nach 3 Min. zeigt die Lösg. einen rosa Schimmer, nach 5 Min. ist die Farbe deutlich rosa und nach 7 Min. sehr kräftig rosa.

Ansatz 2. Bestandteile wie in Ansatz 1, aber nicht 1 ccm sondern 3 ccm Hämin-Lösg. Sauerstoffbehandlung. Nach 1 Min. ist die Lösg. kräftig rosa, nach 2 Min. rot, nach 3 Min. intensiv rot gefärbt.

Ansatz 3. Bestandteile wie in Ansatz 2 und außerdem 3 Tropfen $m/100$ - CuSO_4 . Sauerstoffbehandlung. Farbe: nach 1 Min. rosa Schimmer, nach 4 Min. rosa, nach 10 Min. rosa. Kupfer hemmt also.

Ansatz 4. Es werden 5 ccm $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -Lösg. (Ansatz 1) mit 3 ccm 1-proz. Na_2CO_3 -Lösg., 2 Tropfen Phthalin-Reagens und 3 Tropfen $m/100$ - CuSO_4 versetzt. Die gelblich gefärbte Lösg. ändert ihre Farbe durch 20 Min. langes Behandeln mit Sauerstoff nicht.

c) Fluorescein-Versuch: 5 ccm einer 0.2-proz. Lösg. von $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ in H_2O werden mit 5 ccm Hämin-Lösg. versetzt (6 mg Chlorhämin gelöst in 100 ccm 1-proz. Na_2CO_3 -Lösg.), 4 Tropfen Fluorescein-Reagens zugegeben und Sauerstoff eingeleitet. Nach 5 Min. zeigt der Ansatz kräftige Fluorescenz.

V) Hydrazin.

a) Luminol-Versuch: Die Ansätze wurden mit einer 0.1-proz. Lösg. von Hydrazinsulfat in 1-proz. Na_2CO_3 -Lösg. durchgeführt. Die Lumineszenzerscheinungen sind bereits im theoret. Teil geschildert worden.

b) Phenolphthalin-Versuche: Ansatz 1. Durch 5 ccm einer Hydrazinlösg. obiger Beschaffenheit wird 5 Min. Sauerstoff geleitet. Dann werden 1 Tropfen $m/100$ - CuSO_4 und 2 Tropfen Phthalin-Reagens zugesetzt. Die Lösg. färbt sich sofort deutlich rosa und zeigt, ohne weitere Behandlung mit Sauerstoff, nach 1 Min. kräftige rosa Farbe.

Ansatz 2. Es werden 5 ccm Hydrazinlösg. mit 2 Tropfen Phthalin-Reagens und 2 Tropfen $m/100$ - CuSO_4 versetzt und mit Sauerstoff behandelt. Die Farbe der Lösg. ist sofort schwach rosa, nach 2 Min. kräftig rosa, nach 5 Min. rot.

c) Fluorescein-Versuch: 5 ccm einer Hydrazinlösg. obiger Beschaffenheit werden mit 2 Tropfen $m/100$ - CuSO_4 versetzt und 5 Min. mit Sauerstoff durchperlt. Gibt man dann 2 Tropfen Fluorescein-Reagens zu, so zeigt sich kräftige Fluorescenz.

VI) Schwefelwasserstoff.

a) Luminol-Versuch: Die Lumineszenzerscheinung bei Gegenwart von Kupfer ist bereits im theoret. Teil beschrieben. Gibt man zu einer derartigen Cu-haltigen Lösg. 0.5 ccm $m/100$ - NiSO_4 , so verschwindet die Luminescenz rasch, ebenso wenn statt Ni etwas Kobalt in Form von 0.5 ccm $m/100$ - CoSO_4 zugesetzt wird.

Versetzt man 5 ccm Schwefelwasserstoffwasser mit 5 ccm Luminol und leitet Sauerstoff ein, so läßt sich die auftretende schwache Luminescenz auch durch Zusatz einiger Tropfen $m/100$ - NiSO_4 auf die gleiche Intensität heben, wie dies durch Zusatz von wenig Cu möglich ist. Auch durch Kobalt läßt sich Kupfer ersetzen, während 0.5 ccm $m/100$ - MnSO_4 nur geringfügig luminescenzsteigernd wirken. Gibt man zu einem lumineszierenden Gemisch aus H_2S -Wasser, Luminol und wenig NiSO_4 -Lösg. nachträglich 0.5 ccm $m/100$ - CuSO_4 und leitet weiter Sauerstoff ein, so zeigt sich zunächst Aufleuchten, dann sinkt die Luminescenz etwa auf den ursprünglichen Wert. Wird nun nochmals Ni zugegeben (0.5 ccm $m/100$ - NiSO_4), so sinkt die Luminescenz rasch, und es bleibt nur ein sehr schwacher Schimmer erhalten.

Setzt man bei der Sauerstoffbehandlung eines Gemisches aus 5 ccm H_2S -Wasser und 5 ccm Luminol 0.5 ccm $m/100$ - CoSO_4 als Katalysator zu, wartet etwa 3 Min. bis zum Auftreten der kräftigen Luminescenz und läßt dann 0.5 ccm $m/100$ - CuSO_4 einfließen,

so zeigt sich Aufleuchten, dann rasches Verschwinden der Luminescenz. Umgekehrt löscht auch Kobalt die durch Kupfer katalysierte Luminescenz aus.

b) Phenolphthalin-Versuch: 5 ccm H_2S -Wasser werden mit 5 ccm 1-proz. Na_2CO_3 -Lösng., 4 Tropfen Phthalin-Reagens und 0.1 mg Chlorhämין versetzt. Das Einleiten von Sauerstoff bewirkt, daß die zunächst gelblich gefärbte Lösng. nach 2 Min. deutlich rosa aussieht. Nach 5 Min. ist die Farbe intensiv rosa, nach 8 Min. rot.

c) Fluorescein-Versuch: Zu 5 ccm H_2S -Wasser werden im Reagensglas 5 ccm Häminlösng. (6 mg Hämin gelöst in 100 ccm 1-proz. Na_2CO_3 -Lösng.), 4 Tropfen $m/_{100}$ - CuSO_4 und 4 Tropfen Fluorescein-Reagens gegeben und Sauerstoff eingeleitet. Das Gemisch zeigt nach 5 Min. kräftige Fluorescenz. Kontrollversuche (ohne Hämin bzw. ohne Schwefelwasserstoff) fluorescieren nicht.

VII) Adrenalin.

a) Luminol-Versuch: Zu 5 ccm einer 0.2-proz. Lösng. von Adrenalin in 1-proz. Na_2CO_3 -Lösng. werden 5 ccm Luminol gegeben und dann Sauerstoff eingeleitet. Nach etwa 1 Min. tritt deutliche Luminescenz auf, die sich auf Zusatz einiger Tropfen $m/_{100}$ - CuSO_4 nicht verstärkt.

b) Phenolphthalin-Versuche: Ansatz 1. Zu 5 ccm Adrenalin-Lösng. obiger Beschaffenheit gibt man 5 ccm Hämin-Lösng. (6 mg Chlorhämין gelöst in 100 ccm 1-proz. Na_2CO_3 -Lösng.), 0.1 ccm $m/_{100}$ - CuSO_4 und 10 Tropfen Phthalin-Reagens. Beim Einleiten von Sauerstoff färbt sich die Lösng. kräftig orangebraun. Im Spektroskop sieht man (nachdem Sauerstoff 10 Min. auf die Adrenalin-Lösng. gewirkt hat) einen kräftigen Streifen (Schichtdicke 1 cm), dessen Mitte bei 554.5 μ gefunden wird. Zur Lösng. werden 3 g Al_2O_3 (standardisiert nach Brockmann) gegeben, 10 Sek. geschüttelt und absitzen lassen. Die überstehende Lösng. ist dann rot gefärbt. Ebenso kann die störende Braunfärbung durch kurzes Digerieren mit Aluminiumoxyd-, „Riedel“ entfernt werden. Nach dem Zentrifugieren ist auch hier die überstehende Flüssigkeit rot.

Ansatz 2. Zu 1 ccm Adrenalin-Lösng. gibt man 5 ccm Wasser, 1 ccm obiger Hämin-Lösng., 0.1 ccm $m/_{100}$ - CuSO_4 und 2 Tropfen Phthalin-Reagens. Auch diese verdünntere Lösng. färbt sich bei der O_2 -Einwirkung zunächst orange, wird aber nach 2 Min. wieder hell, nach 5 Min. dunkelrosa, nach 8 Min. intensiv rot. Sie zeigt den Absorptionstreifen des Phenolphthaleins sehr kräftig. Kontrollen zu beiden Ansätzen führen bei Abwesenheit von Adrenalin nicht zu Färbungen. Lediglich durch das Schütteln mit Aluminiumoxyd wird eine ganz schwache Rosafärbung hervorgerufen.

7) Versuche mit Schardinger-Enzym (Versuchstemperatur 37°).

a) Luminol-Versuch: Zu 5 ccm Milch werden 2 ccm $m/_{50}$ -Salicylaldehyd, gelöst in $m/_{15}$ -Phosphatpuffer pH 8, gegeben. Weiterhin setzt man 2 ccm $m/_{3}$ -Phosphatpuffer pH 8 zu und leitet 15 Min. Sauerstoff ein (10 Blasen in der Min.). Dann werden 2 Tropfen 30-proz. NaOH zugesetzt und, im Dunkelzimmer, 5 ccm Luminol. Es zeigt sich nur eine sehr schwache Luminescenz.

b) Phenolphthalin-Versuch: Man gibt 5 ccm Milch, 2 ccm $m/_{50}$ -Salicylaldehyd, 2 ccm Phosphatpuffer pH 8 zusammen, setzt 2 Tropfen $m/_{100}$ - CuSO_4 und 2 Tropfen Phthalin-Reagens zu und läßt langsam Sauerstoff durchperlen. Nach 15 Min. gibt man 2 Tropfen 30-proz. NaOH zu. Die Lösng. färbt sich intensiv rot. Führt man den Versuch ohne Milch aus, so bleibt die Lösng. nach Alkalizusatz farblos. Führt man den Versuch bei Gegenwart von Milch, aber ohne Aldehyd durch, so wird, nach Alkalizusatz, eine schwache Rosafärbung beobachtet. Eine geringfügige Oxydation des Phthalins scheint hier durch eine in der Milch enthaltene Oxydase zu erfolgen.