

4. Austauschversuche mit H_3PO_2 in D_2O .

Die freie Säure wurde aus einer 50-proz. Lösung durch Entfernen des Wassers bei 40° im Vakuum gewonnen. Um letzte Wasserreste wegzunehmen, wurde die krystallisierte Säure sechsmal unter trockenem Äther geschmolzen, geschüttelt und durch Abkühlen wieder zur Krystallisation gebracht. 0,50 g H_3PO_2 werden in einem Destillierkolben in $2,0 \text{ cm}^3 \text{ D}_2\text{O}$ gelöst. Nach dem Verdampfen des D_2O im Vakuum wird die Säure, wie oben beschrieben, wiederum mit Äther getrocknet. Das bei der anschliessenden Zersetzung von 0,3008 g Säure mit Kaliumpermanganat-Lösung erhaltene Wasser ergab bei der Dichtebestimmung $a = 0,09608 \text{ g D}_2\text{O}$; $x = 2,176$; $t = 2,4$; d. h. einen Austausch der drei H-Atome der Säure H_3PO_2 . Die Abweichung des Wertes t von 3 ist durch die Verteilung der mit der Säure eingeführten H-Atome auf Säure und Lösung gegeben.

Wir möchten auch an dieser Stelle Herrn Dr. A. Epprecht für die Ausführung der Isotopenanalysen bestens danken.

Basel, Anstalt für anorg. Chemie.
Zürich, Chemisches Institut der Universität.

93. Zur Kenntnis der Ascorbinsäure-Reaktionen

von G. Woker und I. Antener.

(3. VI. 37.)

Im 1. Faszikel dieses Bandes (S. 144 ff.) sind wir, anknüpfend an die dem *Schardinger'schen* Enzym wie der Ascorbinsäure eigentümliche Fähigkeit, Methylenblaulösungen in Gegenwart von Formaldehyd oder Acetaldehyd zu reduzieren, neben der Prüfung auf andere Fermentwirkungen, den Beziehungen des erwähnten Enzyms zur Ascorbinsäure nachgegangen. Neben zweifellos vorhandenen Analogien sind wir, ebenso wie Herr Prof. *Edlbacher*¹⁾ auch ausgesprochenen Unterschieden begegnet. Sie könnten beim *Schardinger'schen* Enzym durch die Bindung der Ascorbinsäure an Eiweiss bedingt sein, eine Bindung, die man vielleicht, nach freundlicher brieflicher Mitteilung von Herrn Prof. *Edlbacher*, in dem Sinn interpretieren könnte, dass die Ascorbinsäure als Wirkungsgruppe des *Schardinger'schen* Enzyms zu betrachten wäre.

Bevor wir jedoch im einzelnen an die Beantwortung der sich stellenden Fragen, vor allem auch in Bezug auf die Beziehungen zum *Schardinger'schen* Enzym, herangehen konnten, schien uns ein

¹⁾ Diskussion hierüber in der Sitzung der schweizerischen chem. Ges. in Bern, 27. II. 1937.

eingehendes Studium verschiedener Reaktionstypen der Ascorbinsäure und womöglich die Isolierung der letzteren aus tierischem und pflanzlichem Material, mit Hilfe einer hierzu geeigneten Reaktion, notwendig zu sein. Die bisher gebräuchlichen Methoden der Ascorbinsäure-Bestimmung sind bekanntlich weit davon entfernt, spezifisch zu sein. Sie erfassen, je nach ihrer Eigenart und der Natur des zu prüfenden Materials, bald mehr, bald weniger der reduzierenden Begleitkörper: Cystein, Glutathion, reduzierende Zucker, Kreatinin, Adrenalin usw. Zudem ist durch die vorhin erwähnte Beziehung der Ascorbinsäure zu den Eiweisskörpern, welche deren teilweise Maskierung zur Folge haben kann, ein schwer zu kontrollierendes Moment der Unsicherheit bei allen natürlichen Vorkommnissen der Ascorbinsäure gegeben. Der Versuch, das störende Eiweiss durch Fällung zu eliminieren, wird durch die Mitfällung eines Teils der Ascorbinsäure in fast unabsehbarer Weise kompliziert. Denn der mitgefällte Anteil kann entweder schon von vornherein, wie beim *Schardinger*'schen Enzym in der Milch und wohl auch in anderen tierischen Flüssigkeiten und Pflanzensäften, an Eiweiss gebunden sein oder er geht eine chemische oder adsorptive Bindung mit dem Eiweiss — wenigstens zum Teil — nach der Fällung ein. Die öfters beobachteten Farbenunterschiede bei der Ausführung der nämlichen Reaktionen auf Ascorbinsäure am Eiweissniederschlag und an der darüber stehenden Flüssigkeit¹⁾ lassen sich wohl kaum anders als durch eine solche partielle Bindung der Ascorbinsäure an Eiweiss deuten. Diese Bindung setzt des weiteren den Isolierungsversuchen der Ascorbinsäure aus ihren natürlichen Fundstätten Schwierigkeiten entgegen, die zu beheben ein von Fall zu Fall zu lösendes, oft vielleicht unlösbares Problem darstellt. Wir befassten uns zunächst mit der Aufsuchung neuer Reduktionsmethoden zur Ascorbinsäurebestimmung.

a) Die Reduktion der Pikrinsäure.

Wenn es sich lediglich um die Bestimmung der Ascorbinsäure in eiweisshaltigen Flüssigkeiten handelt, so lässt die Konstanz des Summationswertes (6,75%) aller reduzierenden Substanzen bei der Pikrinsäuremethode — welche *Lewis* und *Benedict*²⁾ für die Blutzuckerbestimmung eingeführt haben — vermuten, dass die Beseitigung des Eiweisstörungsfaktors nach dieser Methode durchführbar ist, nach welcher bekanntlich in frappierend einfacher Weise Eiweissfällung und Zuckerbestimmung mittels des nämlichen Reagenses — einer Pikrinsäure-Pikratlösung — vorgenommen wird. Die Bestimmung

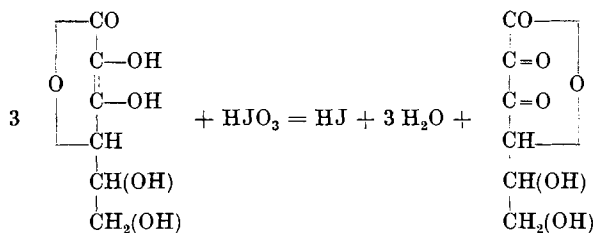
¹⁾ Siehe hierzu im folgenden unter Furfurolreaktionen.

²⁾ *Lewis* and *Benedict*, J. Biol. Chem. **20**, 61 (1915); *Benedict*, J. Biol. Chem. **34**, 203 (1918); s. ferner *Pearce*, ebenda **22**, 525 (1915), und *Myers* und *Bailey*, ebenda **24**, 147 (1916).

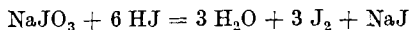
beruht darauf, dass die Pikrinsäure-Pikratlösung zur roten Pikraminsäure durch die Summe der reduzierenden Stoffe umgewandelt und mit einer entsprechenden Pikraminsäure-Standardlösung im *Dubosq*-Kolorimeter verglichen wird. Aber so geeignet die Methode zur Bestimmung des reduzierenden Gesamtwertes einer natürlichen Flüssigkeit auch sein mag, so wenig befriedigend ist hier, wie bei den bekannten, für die Ascorbinsäure verwendeten Methoden, die Ermittlung der einzelnen reduzierenden Faktoren. Für die Milch versuchte Frl. *Antener*, durch Bestimmung der Differenz des Reduktionseffektes vor und nach der Vergärung des Milchzuckers zum Ziele zu gelangen. Die Vergärung erfolgte jedoch unter den bisher eingehaltenen Bedingungen zu langsam, und zudem werden Glutathion, Cystein und Kreatinin mit der Ascorbinsäure erfasst. Auch der in der Frühjahrsitzung der schweizerischen chemischen Gesellschaft erwähnte Versuch, durch Reduktion der Pikrinsäure-Pikratlösung in der Kälte die Ascorbinsäure allein, durch nachfolgendes Erhitzen dagegen die Summe aller reduzierenden Substanzen zu ermitteln, bedarf hinsichtlich des Verhaltens des Glutathions, des Cysteins und wohl auch des Kreatinins bei der kalten Reduktion noch eingehender Untersuchung.

b) Die Jodatreduktion.

Da wir Jodate durch Ascorbinsäure zu Jodiden bzw. Jodwasserstoff reduzieren konnten, haben wir diese Reduktion als Basis für eine jodometrische Bestimmung der Ascorbinsäure verwendet. Die auf Ascorbinsäure zu prüfende Lösung wird mit einem Überschuss an gesättigter Natrium- oder Kaliumjodatlösung versetzt, wobei wohl zunächst die der H-Ionenkonzentration der Ascorbinsäure entsprechende Menge Jodsäure frei werden dürfte. Diese wird nun durch die Ascorbinsäure zu HJ reduziert nach der Reaktion:

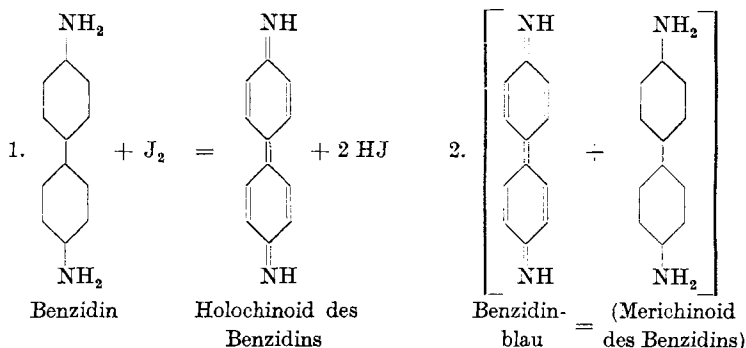


Der gebildete Jodwasserstoff setzt sich dann mit dem überschüssigen Jodat nach der in ähnlicher Weise schon von *Mohr*¹⁾ benutzten Reaktion um:



¹⁾ *Mohr*, Lehrbuch der chemisch-analytischen Titrationsmethode, 3. Auflage, 1896.

Das ausgeschiedene Jod wird unter anderem durch seine Fähigkeit, Benzidin zu Benzidinblau zu oxydieren, erfasst, dessen Menge von der ursprünglich vorhandenen Ascorbinsäure abhängt.



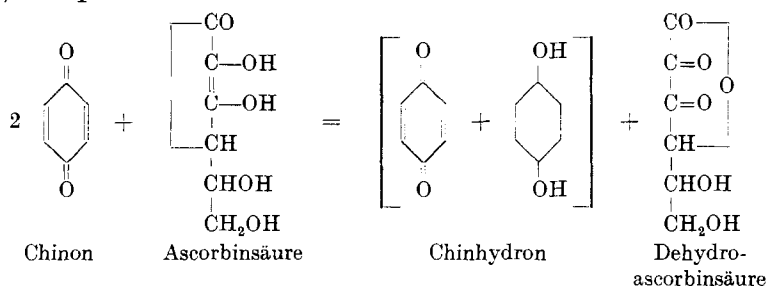
Die Methode dürfte vor den üblichen den Vorteil besitzen, dass sie nur auf saure reduzierende Agentien anspricht, da — vorausgesetzt, dass sich bei Abwesenheit von Säuren überhaupt Jodid aus Jodat bilden könnte — das Gemisch der beiden Salze nur bei Gegenwart und proportional der H⁺-Ionenkonzentration reagiert.

Bei Zusatz von 1 cm³ gesättigter Jodatlösung pro Reagenzglas zu je 1 cm³ einer mit 0,1-mol. frisch gelöster Ascorbinsäure hergestellten Verdünnungsreihe und danach durch einen Zusatz von je 1 cm³ gesättigter Lösung eines farbenaktiven Benzidin-hydrochlorid-Präparates¹⁾ von *Merck*, zu jedem Versuchsgläschen wurde eine gegenüber der Kontrolle mit Benzidin allein deutlich wahrnehmbare Blaufärbung bis zu 0,0002-mol., entsprechend 0,0000172 g Ascorbinsäure festgestellt. Durch Zusatz einer Jodothyrintablette liess sich die Grenze der Reaktion noch bis zur Ascorbinsäurekonzentration 0,0000031-mol. erhöhen, ein Umstand, dem allenfalls physiologische Bedeutung zukommen könnte und der vielleicht für den Thyroxin-nachweis nutzbar gemacht werden kann. Die Übertragung der jodometrischen Ascorbinsäureermittlung auf tierische und pflanzliche Gewebeschnitte haben wir ebenfalls versucht. So gross auch die Komplikationen verschiedener Art im Gebiet der histochemischen Methodik sind, scheinen uns nichtsdestoweniger die bisherigen Ergebnisse ermunternd.

¹⁾ Die Benzidin-hydrochloridpräparate sind von sehr ungleicher Farbenaktivität, die ihrer sonstigen Reaktionsfähigkeit parallel geht, vor allem ihrer Zersetzlichkeit beim Schmelzen. Beim Erhitzen zersetzt bei 241—242° C schmelzende, leicht lösliche Benzidin-hydrochloridpräparate sind nicht farbenaktiv (also z. B. als Substrat für Peroxydasereaktionen unbrauchbar). Die, nach Vorerwärmen des Schmelzpunktsapparates auf ca. 230° bei ebenfalls 241—242°, aber unter Schwärzung schmelzenden, schwer wasserlöslichen Benzidin-hydrochloridpräparate sind demgegenüber von hoher Farbenaktivität. (S. *Wcker*, B. 49, 2319 ff. (1916); 50, 672 ff. (1917); *Kjöllerfeldt*, *Pflüger's Archiv* 172, 318 ff.; 335 ff. (1918).

c) Die Reduktion von Chinon zu Chinhydron.

Wir vermischten Chinon- und Ascorbinsäurekrystalle. Die letzteren färbten sich schon nach wenigen Minuten blau bis schwarzblau, entsprechend der Reaktion:



Die Bildung des Chinhydrons kann zwar ebensowenig wie die Reduktion der Pikrinsäure oder die Reduktion des Methylenblaus, des Dichlorphenol-Indophenols und sonstiger Farbstoffe, oder gar die Titration mit Jod, auf Spezifität Anspruch machen. Aber die verschiedenen reduzierenden Substanzen besitzen eine sehr ungleich ausgeprägte Fähigkeit zur Chinhydronbildung. So entwickelt sich die blaue Färbung bei der Mischung von Chinon- und Cysteinkrystallen weit langsamer als im entsprechenden Gemisch mit Ascorbinsäure. Nach $\frac{1}{2}$ Stunde, die bei der Ascorbinsäure schon zur Ausbildung eines tiefen Blaus ausreicht, sind die Cysteinkrystalle erst blassblau verfärbt, und nach einigen Tagen sind die Kontraste noch ausgeprägter: blauschwarze Verfärbung des Ascorbinsäure-Chinongemisches, hellblaue Verfärbung der Mischung Cystein + Chinon. Noch bedeutend schwächer (d. h. praktisch so gut wie gar nicht) reagieren Kreatinin, Xanthin und Harnsäure unter denselben Bedingungen. Die erwähnten Substanzen, die bei den üblichen Reduktionsmethoden zur Verwechslung mit Ascorbinsäure Veranlassung geben, können also unter geeigneten Bedingungen, bei der Chinhydronmethode, praktisch ausgeschaltet werden. Dagegen dürfte das Adrenalin bei dieser Methode mit erfasst werden. Jedoch reagieren Adrenalin-hydrochloridkrystalle im Gemisch mit Chinon, nicht blau, sondern grauviolett.

Merkwürdigerweise liessen Ratten-Nebennieren-Schnitte, die Herr Prof. *Hintzsche* so freundlich war, für uns mit dem Gefriermikrotom herzustellen, wofür wir ihm bestens danken, nach Chinonbehandlung im Nebennierenmark Blaufärbung erkennen, die in drüsenlumenartig aussehenden Hohlräumen und deren Epithelsaum besonders ausgesprochen war. Der Farbe nach hätte man also hier auf Ascorbinsäure schliessen können. Die Nebennierenrinde, aus der *Szent-Györgyi* die Ascorbinsäure (Hexuronsäure) isoliert hat und die dort auch mit Hilfe der, übrigens chemisch in mehr als einer Richtung

deutbaren Silbernitratmethode erfasst sein soll, zeigte dagegen im Schnitt, ebenso wie das umschliessende Muskelpaket, nach mehrstündigem bis mehrtägigem Aufenthalt in einer Chinonatmosphäre — hergestellt durch Aufstreuen von Chinonkrystallen auf den Boden eines leeren Exsikkators — lediglich eine diffuse violettbraune Färbung, die in der Hauptsache an aufgelagerte Krystalle — grosse in der umschliessenden Muskulatur, kleinere in der Nebenniere selbst — gebunden war. Hierbei dürfte es sich um Chinonkrystalle handeln, deren Oberfläche sich bei Berührung mit dem Gewebe mit einer Chinhydronhaut überzogen hat. Neben zahlreichen dunkel angefärbten Körnchen, die vielleicht den Vorkommnissen der Ascorbinsäure entsprechen könnten, reagieren mit der vorhin erwähnten Grundfärbung auch Schnitte von ascorbinsäurehaltigen Früchten, z. B. Grapefruit und Stachelbeeren.

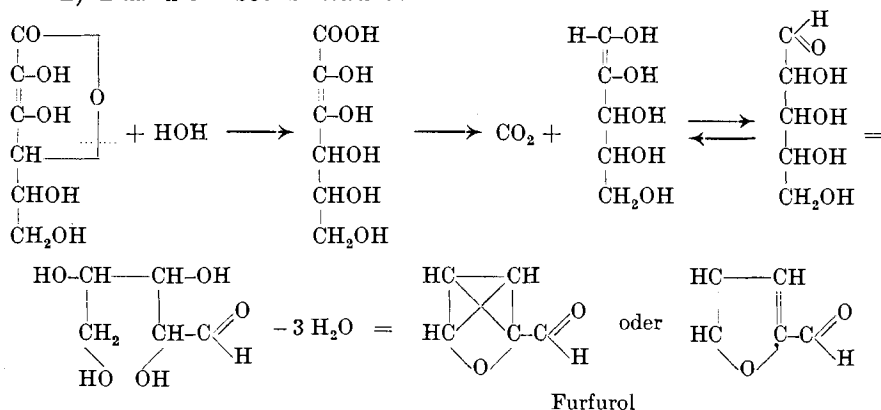
Ob die violettbraune Grundfärbung mit Ascorbinsäure etwas zu tun hat, wobei die Farbmodifikation gegenüber dem Verhalten der reinen Ascorbinsäure durch die Bindung der letzteren an Eiweiss veranlasst wäre, ist allerdings mehr als fraglich. Auf alle Fälle ist es das Gewebeeiweiss selbst, das mit einer seiner Wirkungsgruppen hier reagiert. Wir können ähnliche Farbentöne erhalten, wenn wir trockenes Albumin oder Casein mit Chinonkrystallen vermischen. Die Albuminstückchen bedecken sich dabei relativ rasch mit einem violettbraunen bis braunvioletten Überzug, und am folgenden Tag hatte das Gemisch einen dunkel-violettbraunen Farbton angenommen, der sich im Sonnenlicht bei einer Anzahl kleiner Albuminstückchen bis zu schwarzviolett vertiefte. Trockenes reines Casein zeigte in ähnlicher Weise wie Albumin eine schon bald nach der Mischung mit Chinon wahrnehmbare, sich immer mehr vertiefende Verfärbung. Am folgenden Tag war die Farbe braunviolett bis reinviolett. (Eine ähnliche Verfärbung zeigte das Glykogen.) Von Eiweisskörpern wurden noch Glutein und Rizin im Gemisch mit Chinon untersucht. Das erstere, nicht reinweiss gefärbte Präparat dunkelte mit einer gelblichgrauen Färbung nach, während das Rizin violett reagierte. Die Kohlehydratgruppe im Eiweiss dürfte für die Verfärbung kaum in Betracht kommen, da das Chinon-Laevulosegemisch auch nach Stunden kaum eine Verfärbung zeigte, und das Gemisch mit Arabinose ergab erst am folgenden Tage eine schwach violettgraue Farbe. Auch die Oxyphenylgruppe des Eiweiss kann nicht in Frage kommen, da Tyrosin, im Gemisch mit Chinon, keine Verfärbung zeigte. Man dürfte daher als Wirkungsgruppe des Eiweiss gegenüber dem Chinon wohl kaum etwas anderes als Cystein oder eventl. Ascorbinsäure in Erwägung ziehen, wenigstens von den Substanzen, die wir in den Kreis unserer Betrachtungen gezogen haben. Die Chinhydronreaktion, auf die natürlichen Vorkommnisse der Ascorbinsäure

angewandt, bedarf auf alle Fälle noch eines eingehenden Studiums, bevor aus ihr weitere Schlüsse gezogen werden dürfen. Dies zeigt schon die blosse Tatsache, dass auch das Papier in Berührung mit Chinon und Chinondämpfen unter Braun- bis Violett-Färbung reagiert. Wir lassen es vorläufig dahingestellt, ob die Cellulose selbst oder, von der Darstellung her, anhaftendes Sulfit für diese Reaktion verantwortlich zu machen ist.

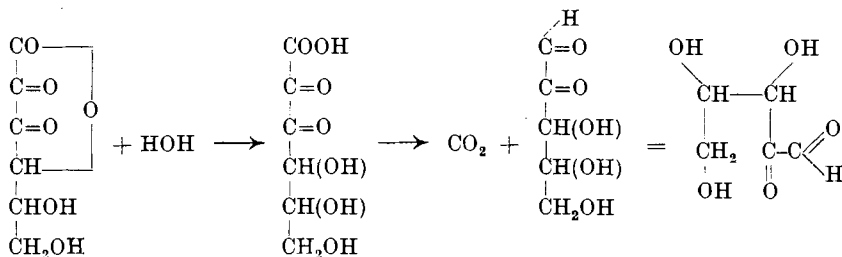
Furfurolreaktionen der Ascorbinsäure.

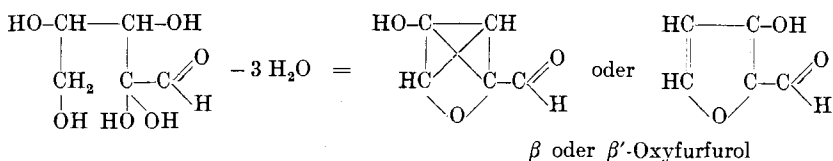
Die Vieldeutigkeit der Reduktionsproben liess es vor allem wünschenswert erscheinen, die Ascorbinsäure auf anderem Wege zu ermitteln. Wir haben daher versucht, die Ascorbinsäure in Furfurol überzuführen und mittelst bekannter Furfurolreaktionen nachzuweisen. Die Möglichkeit hierfür ergibt sich aus folgenden Formulierungen, wobei wir bei jeder einzelnen Reaktion noch feststellen müssen, ob die Ascorbinsäure selbst oder die Dehydro-ascorbinsäure für die erhaltene Färbung verantwortlich zu machen ist. Auf einen Unterschied in der Farbstärke oder Farbnuance liesse sich eventl. eine Bestimmung des einen oder des anderen Faktors dieses Redox-systemes gründen.

1) Für die Ascorbinsäure:



2) Für die Dehydro-ascorbinsäure:





Zunächst haben wir uns der Orcinreaktion von *Reichel*¹⁾ und der Phloroglucinreaktion von *Tollens*²⁾ bedient, Reaktionen, die bekanntlich zur Pentose- und Pentosanbestimmung ausgiebige Verwendung finden. Beide Reaktionen erwiesen sich als brauchbar, wenn sie auch, wegen der Verfärbung der Kontrollen mit Salzsäure allein, eine relativ niedrige Empfindlichkeitsgrenze besitzen. Aus demselben Grunde sahen wir davon ab, die an sich ebenfalls positive, gelb ausfallende Reaktion mit Resorcin-Salzsäure zu verwenden, die *Seliwanoff* für den Nachweis der Fructose³⁾ eingeführt hat.

Eine ca. einen Monat gestandene, also an Dehydro-ascorbinsäure reiche Ascorbinsäurelösung, schien bei der Phloroglucinreaktion bedeutend empfindlicher zu sein, als die frisch hergestellte, so dass also hier die Dehydro-ascorbinsäure Trägerin der Farbreaktion sein dürfte.

a) Die Orcinreaktion der Ascorbinsäure.

Von einer frisch hergestellten 0,1-mol. Ascorbinsäurelösung wird eine Verdünnungsreihe 0,1-m., 0,05-m., 0,025-m. . . bis 0,000195-mol. hergestellt und zu 1 cm³ in jedem Versuchsgläschen je 1 cm³ einer heiss gesättigten Lösung von Orcin in reiner Salzsäure (37%) gefügt. Dann werden die Gläschen, zusammen mit einer Kontrolle der Orcin-Salzsäurelösung allein, in einem *Reischauer*'schen Stern in ein siedendes Wasserbad gebracht und so lange darin belassen, als die sich entwickelnde Grünfärbung keine weitere Verstärkung erfährt (ca. 10 Minuten). In den ascorbinsäurereicheren Reaktionsgemischen (bis 0,0125-mol.) fällt nach dem Erkalten ein grüner Niederschlag, der durch Wägen auf einer Mikrowage, oder wie bei der Pentose- und Pentosanbestimmung spektrophotometrisch oder kolorimetrisch ermittelt werden könnte. Die Grenze der Reaktion geht bis mindestens 0,001-mol. (entsprechend 0,000176 g Ascorbinsäure).

Um zu entscheiden, ob die beobachtete Farbenreaktion der Ascorbinsäure selbst oder der Dehydro-ascorbinsäure zukommt, wurde ausserdem von einer mindestens einen Monat alten, also wohl maximal autoxydierten, molaren Ascorbinsäurelösung eine Stammverdünnung von 0,1-mol. hergestellt und hiervon in der gewohnten Weise eine Verdünnungsreihe bis 0,0000122-mol. untersucht. Die Grenze wurde hierbei jedoch schon bei 0,00333-mol. erreicht, also bei

¹⁾ Vgl. *Blumenthal*, Z. klin. Med., 37; *Bial*, ibid., 39.

²⁾ Vgl. *Sahli*, Lehrb. d. klin. Untersuchungs-Methoden, 6. Aufl., Bd. 2, 65.

³⁾ Vgl. *Sahli*, Lehrb. d. klin. Untersuchungs-Methoden, 6. Aufl. 1914, Bd. 2, 65.

einem Gehalt an Ascorbinsäure von 0,0005867 g. Die Möglichkeit besteht, dass während des langen Stehens eine weitergehende Zersetzung der Dehydro-ascorbinsäure stattgefunden hat. Dieser Einwand würde aber natürlich auch für die mit der nämlichen Lösung angestellte Phloroglucinprobe gelten, bei welcher jedoch die gestandene, also autoxydierte Lösung, eine höhere Empfindlichkeitsgrenze zeigte als die frisch hergestellte, also nahezu reine Ascorbinsäurelösung. Die Anwendung der Methode auf Ascorbinsäure enthaltende Körperflüssigkeiten stösst bei den eiweisshaltigen auf Störungen durch das begleitende Eiweiss, die einmal darin bestehen, dass — wie erwähnt — der Farbstoff, z. B. bei der Milch, mit dem beim Kochen entstehenden Eiweissniederschlag mitfällt und zwar wahrscheinlich in festerer Bindung. Denn trotz des Eiweisses ist eine geringere Menge Niederschlag vorhanden als bei der Ascorbinsäure allein und dieser ist auch nicht grün gefärbt, sondern gräulich. Bei andern Flüssigkeiten wie dem Harn und bei Pflanzensäften kann ein Pentosegehalt Ascorbinsäure vortäuschen und umgekehrt, da die Pentose bei der *Reichel'schen* Probe ebenfalls unter Grünfärbung reagiert.

b) Die Phloroglucinreaktion der Ascorbinsäure.

Hier suchten wir an einer über Nacht gestandenen, an einer drei Tage gestandenen und an der vorhin benutzten alten Ascorbinsäurelösung die Empfindlichkeitsgrenzen unter variierenden Bedingungen auf.

Mit der über Nacht gestandenen 0,1-mol. Ascorbinsäurelösung verfahren wir wie folgt: wir stellten wie üblich eine Verdünnungsreihe von 0,1-mol. bis 0,0001-mol. her. In jedem Versuchsgläschen befand sich 1 cm³ der betr. Verdünnung. Dieselbe wurde nun mit je 5 cm³ heiss gesättigter Phloroglucinlösung in konz. Salzsäure (37%) versetzt und die Gläschen, gleichzeitig mit der Phloroglucinlösung allein als Kontrolle, für 10 Minuten in ein siedendes Wasserbad gebracht. Bei dieser Arbeitsweise war die Grenze bei ca. 0,0002-mol. erreicht, das ist 0,0000352 g Ascorbinsäure.

In derselben Weise verfahren wir mit der einen Monat gestandenen, aufs zehnfache verdünnten, dehydro-ascorbinsäurereichen Molarlösung. Die Verdünnungsreihe reichte bis ca. 0,0000062-mol. Hierbei ergab sich als Empfindlichkeitsgrenze 1/8000-mol., das ist 0,0000022 g.

Von der dreitägigen 0,1-mol. Ascorbinsäurelösung stellten wir eine Verdünnungsreihe bis 0,0001-mol. her, setzten je 1 cm³ einer heiss gesättigten Phloroglucinlösung in konz. reiner Salzsäure (37%) zu je 1 cm³ der betr. Ascorbinsäureverdünnung und verbrachten sämtliche Versuchsgläschen für 10 Minuten in ein siedendes Wasserbad. Da nach dieser Zeit erst die stärkste Konzentration mit einer gelb-orange Färbung reagiert hatte, wurden die Gläschen noch für

$\frac{1}{2}$ Stunde im siedenden Wasserbad gelassen. Danach zeigte sich bis 0,0008-mol. (= 0,000137 g) eine gegenüber der Kontrolle mit Phloroglucin allein deutlich gelbe Färbung.

Da Pentose mit roter Farbe reagiert, so kann hier, im Gegensatz zur Orcinreaktion, eine Verwechslung mit Ascorbinsäure nicht in Frage kommen. Wohl aber dürfte die öfters beobachtete Verfärbung der, bei der *Tollens'schen* Probe erforderlichen Kontrolle mit Normalharn, durch die Gegenwart von Ascorbinsäure bedingt sein.

c) Die Reaktion der Ascorbinsäure mit α -Naphtol
(Reaktion von *Molisch*).

Eine Verdünnungsreihe mit dreitägiger 0,1-mol. Ascorbinsäurelösung wurde bis zur Konzentration 0,0000244-mol. fortgeführt, zu jedem 1 cm³ enthaltenden Gläschen 0,5 cm³ einer frisch hergestellten 5-proz. alkoholischen α -Naphtollösung hinzugefügt und mit 3 cm³ konz. Schwefelsäure vorsichtig unterschichtet. Hierbei wurde bis zu ca. 0,0001-mol. (entsprechend 0,0000176 g Ascorbinsäure) ein violetter Farbenring neben einer grünen Grundfärbung wahrgenommen. Bei der Kontrolle konnte nur die letztere festgestellt werden. Diese Reaktion scheint ebenfalls der Dehydro-ascorbinsäure zuzukommen, da eine mit gleich konzentrierter, frisch gelöster Ascorbinsäure angesetzte Verdünnungsreihe ein vollständig negatives Resultat ergab. Eine mit der schon erwähnten alten Lösung hergestellte Verdünnungsreihe führte im Gegensatz zu den Beobachtungen beim Phloroglucin zu einer geringeren Empfindlichkeitsgrenze (ca. 0,0004-mol., entsprechend 0,000074 g Ascorbinsäure, vielleicht infolge einer zu weit gehenden Zersetzung der Dehydro-ascorbinsäure enthaltenden alten Lösung).

Statt des α -Naphtols kann auch Thymol verwendet werden. Dort ist die mit gelbroter Farbe ausfallende Reaktion weniger empfindlich.

Die Osazonreaktion der Dehydro-ascorbinsäure.

Um den Dehydro-ascorbinsäureanteil in Ascorbinsäurelösungen und in tierischen, sowie pflanzlichen Flüssigkeiten abzufangen, versuchten wir denselben durch Einwirkenlassen von Phenylhydrazin als Osazon zu fassen. Wir erhielten auch schon in der Kälte einen voluminösen gelb bis roten Niederschlag, mit dessen Reinigung sich Frl. *Antener* befasst hat. Es gelang ihr, mit der gütigen Hilfe von Hrn. Prof. *Werder*, Sektionschef des eidgenössischen Gesundheitsamtes, Hrn. Dr. *Mohler*, Stadtchemiker in Zürich und Hrn. Kantonschemiker Dr. *von Weber* die erhaltene Substanz nach verschiedenen Richtungen hin zu untersuchen, worüber sie in der folgenden Publikation eingehend berichtet hat.

Laboratorium für physikalisch-chemische Biologie
der Universität Bern.