

von Überschwefelsäure nicht oxydiert<sup>10)</sup>. In dem Maße, wie sie einfließt, wird sie verbraucht; als Indicator hierbei kann man eine Spur Jod benutzen.

Danach ausgeführte Bestimmungen von Caroscher Säure einerseits mit Sulfit und andererseits mit Jodkalium-Thiosulfat zeigten gute Übereinstimmung. Es ist bei der Sulfit-Titration nur die Vorsicht geboten, daß man die Sulfit-Lösung durch Zusatz von ca. 2% Alkohol beständiger stellt. Dann hält sie sich innerhalb 48 Stdn. konstant, genügt also allen Ansprüchen des vorliegenden Falles.

Nach den gesamten obigen Ausführungen ergibt sich als genaueste und einfachste Bestimmungsniethode eines Gemisches, in dem sich Wasserstoffsuperoxyd, Carosche Säure und Überschwefelsäure befinden, die folgende:

Das Wasserstoffsuperoxyd wird zunächst in schwefelsaurer Lösung mit Kaliumpermanganat titriert, dann wird diese Lösung durch Natriumacetat-Zusatz essigsauer gestellt und die Carosche Säure mit Sulfit bestimmt. Schließlich wird die Überschwefelsäure mit eingestellter Ferrosulfat-Lösung in der Wärme und Zurücktitration des Überschusses mit Kaliumpermanganat analysiert. Diese Bestimmungsmethode läßt sich noch dadurch kontrollieren, daß man außerdem den gesamten aktiven Sauerstoff, wie anfangs angegeben, bestimmt.

Die Genauigkeit der obigen Methode zeigt die folgende Tabelle.

Vers.-Nr.	Gesamt akt. O	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> SO <sub>5</sub>	H <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> gef.	H <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> ber.
1	13.12	8.32	3.55	1.27	1.25
2	23.72	3.39	6.43	13.95	13.91
3	5.05	0.0	1.98	3.03	3.07
4	16.38	1.73	10.75	3.90	3.90
5	19.75	5.18	7.00	6.52	6.57

Berlin-Charlottenburg, Technische Hochschule.

#### 274. Karl Josephson: Bemerkung zur Schiffschens Fuchsin-schwefligsäure-Reaktion auf Aldehyde.

[Aus d. Biochem. Laborat. d. Hochschule Stockholm.]

(Eingegangen am 16. Mai 1923.)

Bei Anwendung des Fuchsin-schwefligsäure-Reagenses zur Prüfung des Enzyms Saccharase auf eine eventuell vorhandene Aldehydgruppe stieß ich auf einige Tatsachen, die unzweifelhaft zu großer Vorsicht bei der Deutung eines scheinbar positiven Ausschlags der Reaktion mit Fuchsin-schwefliger Säure mahnen.

Die zuerst von Schiff<sup>1)</sup> entdeckte Färbung einer vorher mit schwefliger Säure entfärbten Fuchsinlösung ist bekanntlich eine der häufigst gebrauchten Farbreaktionen auf Aldehyde. Die Natur dieser Reaktion scheint jedoch bis in die letzte Zeit nicht ganz sichergestellt gewesen zu sein. Bezüglich älterer Untersuchungen über die Fuchsin-schwefligsäure-Reaktion

<sup>10)</sup> Müller und Schellhaas, l. c.; Palme, l. c.

<sup>1)</sup> A. 40, 131 [1866]; C. r. 64, 482 [1867].

auf Aldehyde kann ich auf das Werk von H. Meyer, »Lehrbuch der organisch-chemischen Methodik«<sup>2)</sup>, sowie auf die eingehende und aufklärende Abhandlung von Wieland und Scheuing, »Die Fuchsin-schweflige Säure und ihre Farbreaktion mit Aldehyden«<sup>3)</sup> verweisen.

Im allgemeinen wird der positive Ausschlag der Reaktion als ein ziemlich eindeutiger Beweis für die Anwesenheit von freien Aldehydgruppen angesehen<sup>4)</sup>. Nach den hier zu besprechenden Tatsachen sollte die Reaktion, um entscheidend zu sein, unter bestimmten Versuchsbedingungen bezüglich der Acidität ausgeführt werden. Wenn die Reaktion nicht zu schwach ist, scheint auch der von Aldehyden im allgemeinen hervorgerufene violette Farbton als ziemlich eindeutig angesehen werden zu können.

Die ersten experimentellen Tatsachen, welche zur Entdeckung der hier zu besprechenden Verhältnisse führten, waren die folgenden: Bei der Prüfung eines hochmolekularen Stoffes, wie der Saccharase, auf Anwesenheit einer Aldehydgruppe schien es von Bedeutung, die Substanz in größtmöglicher Konzentration zu untersuchen. Um dies ohne Aufbietung einer größeren Menge des kostbaren Materials zu ermöglichen, wurde etwas von dem festen Präparat mit wenigen Tropfen des Fuchsin-schwefligsäure-Reagens<sup>5)</sup> übergossen. Es trat dann nach einigen Minuten eine deutliche Rotfärbung hervor.

Nachdem diese Farbreaktion der Fuchsin-schwefligen Säure mit Saccharase konstatiert worden war, wurden einige andere Stoffe, welche in ihren Eigenschaften mit der Saccharase zum Teil übereinstimmen oder auch sonst hinsichtlich der vorliegenden Arbeit von Interesse waren, zur Untersuchung gebracht. Die Versuche wurden in derselben Weise wie im Falle der Saccharase vorgenommen, also durch Übergießen der festen Substanz mit einigen Tropfen des Fuchsin-schwefligsäure-Reagens. Das Resultat der Untersuchung war folgendes:

Glykose . . . . .	keine Färbung
Hefegummi . . . . .	keine Färbung
Stärke nach Lintner . . . . .	keine Färbung
Stärke nach Zulkowsky . . . . .	keine Färbung
Kartoffelstärke . . . . .	schwache Rotfärbung
Pepton (Witte) . . . . .	schwache Rotfärbung
Casein nach Hammarsten . . . . .	Rotfärbung
Serum-Albumin . . . . .	Rotfärbung
Eier-Albumin . . . . .	Rotfärbung.

Die Färbung trat im allgemeinen nach einigen Minuten hervor. Nach den verschiedenen Arten der untersuchten Stoffe kann mit größter Wahrscheinlichkeit geschlossen werden, daß die Färbung nicht auf die Anwesenheit freier Aldehydgruppen zurückgeführt werden kann. Vielmehr ist es nicht ausgeschlossen, daß solche Verbindungen wie Eiweißstoffe salzartige Verbindungen mit der schwefligen Säure eingehen können, und daß ein Teil der letzteren dem Farbstoff entzogen wird, wodurch die rote Farbe des freien Fuchsin wieder zum

<sup>2)</sup> Verlag J. Springer, Berlin, 4. Aufl. [1922], 1, 825.

<sup>3)</sup> B. 54, 2527 [1921].

<sup>4)</sup> siehe z. B. Feulgen, H. 123, 197, u. zw. 202 [1922].

<sup>5)</sup> Das Reagens war hergestellt durch Einleiten von SO<sub>2</sub> in die 0.025-proz. Lösung des Fuchsin bis zur Entfärbung und nachherige Entfernung des überschüssigen SO<sub>2</sub> im Vakuum.

Vorschein kommt. Der Farbton ist auch übereinstimmend mit dem des Fuchsin, ohne den von Aldehyden im allgemeinen hervorgerufenen violetten Stich zu zeigen.

Wie erwähnt, wurde in den vorhergehenden Versuchen die zu untersuchende Substanz in fester Form mit dem Fuchsin-schwefligsäure-Reagens zusammengebracht. Die Färbung trat auch unmittelbar an der festen Substanz auf, wo die Konzentration am größten war. Auch konzentrierte Lösungen von Eiweißstoffen, die keine ungelöste Substanz enthalten, geben Rotfärbung.

Der folgende Versuch gab Anregung zu fortgesetzten Untersuchungen mit der Fuchsin-schwefligen Säure und speziell der Empfindlichkeit derselben gegen kleine Schwankungen der Acidität der Versuchslösung:

Eine verd. Lösung von Serum-Albumin gab mit dem Reagens keine Färbung. Nachdem aber etwas Natriumacetat hinzugesetzt war, trat die Rotfärbung hervor. Auch bei der folgenden Prüfung der reinen Acetat-lösung wurde eine deutliche Rotfärbung des Reagens erhalten. Bei Zusatz von ein wenig verd. Essigsäure zu der Acetat-lösung wurde die Intensität der von dem Reagens hervorgerufenen Rotfärbung noch gesteigert. Wenn aber der Säurezusatz gesteigert wurde, verminderte sich die Rotfärbung allmählich.

Die Farbenintensität scheint also von der Acidität der Lösung wesentlich abhängig zu sein, und zwar ist die Färbung reversibel in solcher Hinsicht, daß bei Überschreitung des Aciditäts-Optimums der Farbenintensität die Färbung teilweise zurückgeht.

Versuche über die Färbung der Fuchsin-schwefligen Säure durch verschiedene Pufferlösungen.

Die Färbung der Fuchsin-schwefligen Säure durch Acetat-Puffer verschiedener Acidität konnte von einer Verunreinigung des angewandten Acetats oder Essigsäure herrühren. Allerdings wurde Rotfärbung auch mit Phosphat-Puffer erhalten, und zwar wurde durch besondere Versuche festgestellt, daß die Farbenintensität im großen und ganzen in derselben Weise mit der Acidität der Lösung sich ändert, wenn anstatt des Acetats Phosphat als Puffer verwendet wird.

Die Färbung ist jedoch stärker unter Anwendung von Acetat-Puffer als wenn man Phosphat-Puffer von gleicher molekularer Konzentration gebraucht. So lange die Pufferlösungen verdünnt sind, ist die Färbung von der Pufferkonzentration deutlich abhängig. Die folgenden Versuche zeigen diese Verhältnisse näher. Es wurden die folgenden Mischungen hergestellt:

ccm Phosphatgemisch 0.3-n. $p_H = 5.9$	0.3	0.5	1.0	1.5	2.0
ccm dest. Wasser	1.7	1.5	1.0	0.5	0.0
ccm Reagens	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

Nach einigen Minuten war die Färbung in den ersten zwei Mischungen kaum wahrnehmbar. In den übrigen mit der Konzentration deutlich gesteigerte Rotfärbung. Bei Anwendung von Acetat war die Empfindlichkeit sehr groß. In fünf Reagensröhren wurden die folgenden Mischungen hergestellt:

Tropfen Acetatgemisch 0.5-n. $p_H = 5.0$	1	2	3	4	5
ccm dest. Wasser	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
ccm Reagens	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3

Nur im ersten Rohr war die Färbung nach einigen Minuten kaum wahrnehmbar, während in den anderen Röhren die Färbung sehr deutlich war,

und zwar stieg die Intensität der Färbung mit der Zahl der zugesetzten Tropfen Acetat-Puffer.

Bestimmung des Aciditäts-Optimums der Farbenintensität.

Die untenstehende Tabelle zeigt das Ergebnis der Bestimmung des Aciditäts-Optimums der Farbenintensität unter Anwendung von Phosphat-Puffer. Die Phosphatlösungen waren hergestellt aus Kaliumphosphat resp. Natriumphosphat, »Kahlbaum, zu Enzymstudien nach Sørensen«. Die Lösung von  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  war 0.34-n. und die von  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$  0.29-n. Die Pufferlösungen verschiedener Acidität wurden erhalten durch Mischen von den in den zwei ersten Kolonnen angegebenen Volumina der beiden Phosphatlösungen. Die Bestimmungen der Acidität der Puffermischungen wurden colorimetrisch ausgeführt<sup>6)</sup>. Es wurde keine Korrektur wegen des Salzfehlers eingeführt. Das Ergebnis kann natürlicherweise nur als orientierend angesehen werden.

Zu jedem Versuch wurden 2 ccm Phosphatgemisch und 0.5 ccm Fuchsin-schwefligsäure-Reagens verwendet.

Das Aciditäts-Optimum der Farbenintensität dürfte also in der Nähe von  $p_{\text{H}}=6$  liegen.

Phosphatlösung im Gemisch		$p_{\text{H}}$	Färbung
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.34-n.	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.2-n.		
ccm	ccm		
40	0	2.9 <sup>7)</sup>	keine
40	0	4.5	schwach rot
39	1	5.5	schwach rot
38	2	5.9	rot
37	3	6.1	rot
35	5	6.3	rot (schwächer)
20	20	7.2	schwach rot
6	34	7.8	schwach rot

Bezüglich einer Erklärung dieser Färbung der Fuchsin-schwefligen Säure konnte die Oxydation eines Teiles der schwefligen Säure durch den in der Lösung gelösten Sauerstoff in Betracht kommen. Diese Oxydation konnte bei verschiedener Acidität mit verschiedener Geschwindigkeit erfolgen. Gegen diese Erklärung spricht jedoch ein Versuch, durch Einleiten von Luft die Färbung zu vertiefen. Der Versuch fiel nämlich negativ aus. Eine andere, nicht unwahrscheinliche Erklärung ist die Bindung der schwefligen Säure als Sulfit. Die Abhängigkeit der Acidität konnte hierdurch ihre Erklärung finden. Auch der Einfluß der Puffer-Konzentration wird verständlich.

Aus den vorhergehenden experimentell gefundenen Tatsachen geht hervor, daß die Fuchsin-schweflige Säure als spezifisches Reagens auf Aldehyde mit Vorsicht verwendet werden muß. Zwar waren die in den mitgeteilten Versuchen erhaltenen Färbungen nicht von der violetten Nuance, die von Aldehyden mit der Fuchsin-schwefligen Säure hervorgerufen wird, sondern der Farbton stimmte mit der roten Farbe des freien Fuchsin überein. Wenn die Lösung schwach ist, täuscht man sich jedoch leicht.

Nur bei einer Acidität unter  $p_{\text{H}}=3$  (Rotfärbung von Methylorange) scheinen die als Puffer verwendeten Salze keine Fär-

<sup>6)</sup> Michaelis, D. Med. Wochenschr. 1920, Nr. 45; 1921, Nr. 17.

<sup>7)</sup> Zusatz von einigen Tropfen Phosphorsäure.

bung des Fuchsin-schwefligsäure-Reagenses hervorzurufen. Auch die anderen, keine Aldehydgruppen enthaltenden Substanzen, die, wie die Eiweißstoffe (wenn sie in größerer Konzentration vorhanden sind) eine Färbung des Reagenses hervorrufen können, scheinen bei genügend starker Acidität die Farbreaktion nicht zu geben.

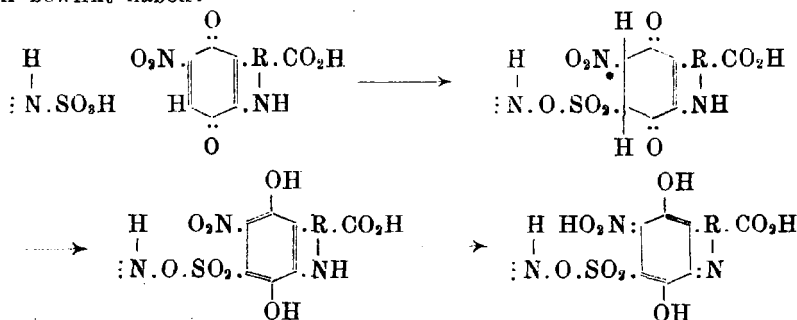
Bei der Prüfung von unbekannten Substanzen auf Anwesenheit von freien Aldehydgruppen scheint es also zweckmäßig, wenn der Farbton nicht mit Sicherheit ausschlaggebend sein kann, vor der Prüfung durch Zusatz von wenig Säure oder Puffergemisch die Acidität der Versuchslösung so einzustellen, daß  $p_H$  einen Wert unter 3 (Rotfärbung von Methylorange) erhält. Größere Mengen Säure stören, wie längst bekannt, die Fuchsin-schwefligsäure-Reaktion auf Aldehyde, außer auf Formaldehyd.

## 275. Hermann Leuchs und Walter Hempel: Über das violette Sulfid aus Kakothelin und andere Derivate davon. (Über Strychnos-Alkaloide, XXXIX.)

[Aus d. Chem. Institut d. Universität Berlin.]

(Eingegangen am 29. Mai 1923.)

Ähnlich dem Methyl-kakothelin setzt sich auch das Kakothelin,  $C_{21}H_{21}O_7N_3$ ,  $HNO_3$ , selbst mit Natriumsulfid unter bestimmten Bedingungen glatt zu einem tiefvioletten Körper  $C_{21}H_{21}O_7N_3H_2SO_3$  um, worin der mit der Säure verbundene Rest dem ursprünglichen isomer ist. Da der Farbwechsel von Rotgelb zu Violett den Übergang eines Chinons in ein Hydrochinon, das sich weiter zu einem neuen Chinon umlagert, anzeigt, so muß auch hier die schweflige Säure diese Reduktion ohne Übertragung von Wasserstoff von außen durch einfache Anlagerung an den Chinon-Kern bewirkt haben:



Demnach entsteht zunächst das innere Salz einer Sulfonsäure  $\text{:NH.O—S(O)}_2\text{.C:}$  oder einer Phenylschwefligsäure  $\text{:NH.O—S(:O).O.C:}$ , das sich zu einem Hydrochinon enolisiert und weiter in ein Chinon mit der Isonitrogruppe umlagert. Im Einklang mit dieser Auffassung steht, daß die schweflige Säure nicht mehr nachweisbar ist: Konz. Schwefelsäure spaltet sie ebenso wenig ab, wie sie durch verd. Salpetersäure oxydiert wird. Durch diese wird vielmehr allein das violette Hydrochinon in ein rotgelbes Chinon  $C_{21}H_{19}O_7N_3H_2SO_3$  mit gleichfalls fest gebundener schwefliger Säure ver-

<sup>1)</sup> B. 51, 1377 [1918], 55, 3936 [1922].