Ueber die Verwendbarkeit des Millon'schen Reagens.

Von

Otto Nasse.

Das bis dahin fast nur in den biologischen Wissenschaften angewendete, von seinem Entdecker für den Nachweis von Eiweisskörpern bestimmte Millon'sche¹⁾ Reagens wird meist noch nach der ursprünglichen Vorschrift bereitet. Man erhält dann bekanntlich ein in der Zusammensetzung wechselndes Gemisch von salpeter- und salpetrigsaurem Quecksilberoxyd und -Oxydul nebst freier Salpetersäure und salpetriger Säure. Vielfach wird aber auch schon benutzt eine wässrige Lösung von Quecksilberniträt und Kaliumnitrit, seitdem ganz unabhängig von Millon eine solche Flüssigkeit von R. Hoffmann²⁾ als Reagens für Tyrosin empfohlen worden ist, und Kühne und Rudneff³⁾ auf die Möglichkeit eines Zusammenhanges beider Reactionen (Eiweiss und Tyrosin) hingewiesen haben.

Der Wirkungskreis des Millon'schen Reagens ist erweitert worden durch Plugge⁴⁾ für Phenol, Salicylsäure und die Zersetzungsproducte des Tyrosins. Freilich verwendete Plugge hierbei nur Quecksilberniträt und wollte auch seine Reaction von der Hoffmann's auf Tyrosin wohl unterschieden wissen.

In meiner kleinen Mittheilung über die „aromatische Gruppe im Eiweiss-Molekül“⁵⁾ habe ich die kurze Notiz von Plugge leider übersehen. Zweifellos ist aber Plugge, wie ich seiner späteren Polemik⁶⁾ gegenüber betonen muss, damals nicht zu einem allgemeineren Schluss gekommen, hat aus der kleinen Zahl der ihm zu

1) Compt. rend. Bd. 28 S. 40. 1849.

2) Annal. d. Chem. u. Pharm. Bd. 87 S. 124. 1853.

3) Archiv f. pathol. Anat. Bd. 33 S. 71. 1865.

4) Zeitschr. f. analyt. Chemie Bd. 11 S. 173. 1872.

5) Sitzungsber. d. naturf. Gesellsch. Halle. 8. März 1879. Wörtlich abgedruckt im chem. Centralbl. 1879 S. 487.

6) Archiv d. Pharmacie Bd. 28 S. 9. 1890.

Gebote stehenden Beobachtungen nicht schliessen können und auch thatsächlich nicht geschlossen, dass die Millon'sche Reaction „sowohl was die Farbe als was die allgemeinen Eigenschaften des Niederschlags angeht, allen einfach hydroxylirten aromatischen Körpern eigen“ ist. Mit diesen Worten hatte ich geglaubt, mich auf Grund meiner Untersuchung ausdrücken zu dürfen. Ich erwähne dieselben eigentlich nur, um einige Unrichtigkeiten zu verbessern. Unrichtig ist der Passus über die Farbe, worauf ich unten noch ausführlich zurückkomme. Weiter habe ich nicht mit Recht die Nitrophenole als aus dem Bereich der Millon'schen Reaction ausgeschlossen bezeichnet. Dieselben geben vielmehr in jeder Beziehung die Reaction sehr gut. Vermuthlich haben mir s. Z. keine reinen Stoffe zur Verfügung gestanden.

Der aus dem Eintreten der Millon'schen Reaction gezogene Schluss hatte für mich übrigens eine allgemeinere Bedeutung, insofern ich auf Grund des Eintretens der Xanthoproteinreaction und der Millon'schen Reaction in dem Eiweiss-Molekül eine einfach hydroxylirte aromatische Gruppe als erwiesen erachtete. Als „chromogene Gruppe“, den Eiweisskörpern eigenthümlich und dem Leim fehlend, hatte sie kurz vor meiner Publication F. Hofmeister¹⁾ bezeichnet, ohne indess ihren Charakter bestimmter zu präcisiren.

Den besten Erfolg erzielt man, wie bekannt, bei Anwendung des Millon'schen Reagens in nur geringer Menge und bei nur mässiger Wärme. Das gilt ganz besonders für das ursprüngliche Reagens. Anderenfalls kann es zu falschen Resultaten kommen, beruhend auf nachträglicher Hydroxylierung der geprüften Substanzen. So können einerseits die zuerst entstandenen Färbungen von Phenolderivaten sich vollkommen ändern und andererseits, was sehr zu beachten ist, auch bei ganz reinen, hydroxylfreien Benzolderivaten Färbungen eintreten. Hierauf hat Plugge bereits aufmerksam gemacht. Dass die verschiedenen Benzolderivate sich unter den vorliegenden Bedingungen verschieden leicht hydroxyliren, ist hier nicht näher auszuführen.

Ich ziehe jetzt zur Anstellung der Millon'schen Reaction, welche Bezeichnung ich trotz der im Laufe der Zeit so sehr viel allgemeiner gewordenen Bedeutung beizubehalten für gut finde, eine wässrige Lösung von Quecksilberacetat vor, die ich erst zum

1) Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 2 S. 299. 1878.

Gebrauche selbst mit einigen Tropfen einer 1%igen Lösung von Natrium- oder Kaliumnitrit versetze. Meist genügt die saure Reaction des Quecksilberacetats zum Eintritt der Färbung. Anderenfalls wird etwas verdünnte Essigsäure zugefügt.

Salpetersäure ist demnach im Gegensatz zu manchen früheren Angaben überhaupt nicht nur unnöthig, sondern sogar gefährlich. Bei Anwendung von Quecksilberacetat entgeht man den vorher genannten Gefahren zweifellos fast vollkommen. Nur vor einem Uebermaass von Nitrit ist zu warnen.

Mit dem Fortfall der Salpetersäure fällt auch die übrigens sehr bald auch schon von mir selbst als irrig erkannte Vorstellung, bei der Wirkung des Millon'schen Reagens sei Nitrirung im Spiele. Die Reaction ist vielmehr mit Nickel¹⁾ unter die Nitrosoreactionen zu rechnen. Hiermit ist natürlich noch keine Erklärung gegeben. Eine solche ist ganz kürzlich versucht worden von W. Vaubel²⁾ und verdient sicher nähere Berücksichtigung.

Erwähnt mag hier schliesslich noch sein, dass die Reaction in jedem Falle gehemmt wird durch Wasserstoffhyperoxyd, durch einen grösseren Gehalt des Reactionsgemisches an Chloriden, wie Sal-kowski³⁾ bereits vor längerer Zeit gezeigt hat, ferner auch durch Alkohol, der aber nach dem Erkalten ohne Schaden zugefügt werden kann.

Es sind nun schon wiederholt Unterschiede in der Färbung der Phenolderivate durch das Millon'sche Reagens, von Braunroth durch Blauröth bis zu reinem Blau gehend, beobachtet worden. Vielfach mögen dieselben wohl auf die Ungleichmässigkeit des Reagens bezogen worden sein. Ganz ausdrücklich aber bezeichnet Krasser⁴⁾ als roth mit einem Stich in's Violett die Färbung des Vanillins, und Plugge und gleichzeitig Nickel sprechen bei Vanillin und Eugenol einfach von Violett. Plugge deutet in der oben citirten zweiten, an Material sehr reichen Arbeit auch die Möglichkeit an, bei Naphtalin- und Chinolinderivaten isomere Verbindungen durch die verschiedene Färbung zu unterscheiden, bei den physiologisch wichtigen Körpern aber, insbesondere den Kresolen und Oxybenzo-

1) Die Farbenreactionen der Kohlenstoffverbindungen. Berlin 1890.

2) Zeitschr. f. angew. Chemie 1900 S. 1125.

3) Arch. f. pathol. Anat. Bd. 81 S. 552.

4) Sitzungsber. d. kais. Akademie d. Wissensch. Wien Bd. 93 p. 127. 1886.

säuren, stellt er einen merklichen Unterschied in der Natur der Farbe in Abrede.

Um festzustellen, ob eine Gesetzmässigkeit in der Färbung besteht, thut man aus verschiedenen Gründen gut, sich zunächst nicht nur auf die einfach hydroxylierten Benzolderivate zu beschränken, sondern weiter auch auf diejenigen, in welchen nur noch ein Wasserstoffatom substituirt ist, also auf die Biderivate von der Formel $C_6H_4 < \frac{OH}{R}$. Dabei soll ferner der Atomcomplex R einstweilen nicht durch Sauerstoff an den Benzolkern gebunden sein.

Unter diesen Verhältnissen findet sich dann, dass das Millon'sche Reagens die Ortho-Verbindungen durchgängig braunroth, die Para-Verbindungen blauroth (bis blau), bei starker Verdünnung rosaroth färbt. Die Färbung der Meta-Verbindungen ist stets wenig bestimmt ausgesprochen.

Es geben im Besonderen die sehr charakteristische blauviolette Para-Reaction ohne Ausnahme alle Para-Verbindungen der oben angegebenen Constitution, welche ich habe prüfen können, darunter auch die Eiweisskörper und deren Spaltungsproduct, das Tyrosin, und wieder von dessen Derivaten das Parakresol. Mit Bestimmtheit ist vorauszusagen, dass auch die Paraoxyphenyl-Propionsäure und -Essigsäure, die mir nicht zur Verfügung standen, sich ebenso verhalten werden. Dass man bei der Anstellung der Reaction ein Uebermaass von Nitrit vermeiden muss, sei nochmals hervorgehoben.

Die erwähnten Farbenunterschiede zeigen auch die entsprechenden Phenoläther $C_6H_4 < \frac{OH}{OR}$, und zwar auch bei vollkommener Reinheit der Stoffe. Ist das Reagens aber stark sauer, so tritt eine neue Gefahr ein, nämlich die der Verseifung. Das lässt deutlich erkennen ein Versuch mit Arbutin $C_6H_4 < \frac{OH(1)}{O \cdot C_6H_{11}O_5(4)}$. Zu Anfang erhält man sehr ausgesprochen Para-Färbung, der aber nach längerem Kochen ein schmutziges Gelbroth folgt, ähnlich wie bei Verwendung von Hydrochinon.

Im Gegensatz zum Arbutin sind die beiden Salicyl-Glykoside Salicin $C_6H_4 < \frac{O \cdot C_6H_{11}O_5(1)}{CH_2 \cdot OH(2)}$ und Helicin $C_6H_4 < \frac{O \cdot C_6H_{11}O_5(1)}{CHO(2)}$ wieder sehr schwer verseifbar, werden auch bei längerem Kochen mit Millon'schem Reagens kaum schwach bräunlich gefärbt. Das

Vorhandensein von Hydroxyl scheint die Verseifung sehr zu begünstigen. Es legt der beobachtete Unterschied in dem Verhalten der verschiedenen Glykoside die Frage nahe, ob etwa auch bei der Zersetzung durch Fermente (Emulsin) Unterschiede in der Geschwindigkeit ihrer Wirkung zu bemerken sind. Bekannt ist meines Wissens nichts darüber.

Die Dihydroxyle sind bei der Untersuchung ganz fortgelassen, wengleich die Farben deutlich von einander verschieden sind, da sie im Uebrigen nur geringes physiologisches Interesse bieten. Geht man aber weiter zu Phenolen, in denen mehrere Wasserstoffatome (und zwar zunächst zwei) durch andere Gruppen — sei es mit, sei es ohne Vermittlung

von Sauerstoff — vertreten sind $\left(\text{C}_6\text{H}_3 \begin{smallmatrix} \nearrow \text{OH} \\ \searrow \text{R} \end{smallmatrix} \right)$, so trifft man stark

blaue Färbungen bei Körpern, in denen OH zu einer der anderen

Gruppen in Para-Stellung steht, so bei Eugenol $\text{CH}_3 \begin{smallmatrix} \nearrow \text{OH (1)} \\ \searrow \text{O} \cdot \text{CH}_3 \text{ (2)} \\ \text{CH}_2 \cdot \text{CH}=\text{CH}_2 \text{ (4)} \end{smallmatrix}$

und bei Vanillin $\text{C}_6\text{H}_3 \begin{smallmatrix} \nearrow \text{OH (1)} \\ \searrow \text{O} \cdot \text{CH}_3 \text{ (2)} \\ \text{CHO (4)} \end{smallmatrix}$. Ob alle entsprechend gebauten

Verbindungen durch das Millon'sche Reagens blau oder blauröth gefärbt werden, dürfte schwer festzustellen sein, da es nicht leicht ist, die erforderlichen isomeren Verbindungen rein zu erhalten. Die Untersuchung wird aber überhaupt unnöthig, da auch Phenole von der oben angegebenen Constitution die schönste blaue Farbe zeigen, in denen OH zu keiner der anderen Gruppen Para-Stellung einnimmt,

so Thymol $\text{C}_6\text{H}_3 \begin{smallmatrix} \nearrow \text{OH (1)} \\ \searrow \text{CH}_3 \text{ (3)} \\ \text{C}_3\text{H}_7 \text{ (6)} \end{smallmatrix}$ und Xylenol $\text{C}_6\text{H}_3 \begin{smallmatrix} \nearrow \text{OH (1)} \\ \searrow \text{CH}_3 \text{ (2)} \\ \text{CH}_3 \text{ (3)} \end{smallmatrix}$.

Zurückkehrend zu den Biderivaten $\text{C}_6\text{H}_4 \begin{smallmatrix} \nearrow \text{OH} \\ \searrow \text{R} \end{smallmatrix}$, für die also allein die Gesetzmässigkeit in den Färbungen gilt, so gelingt es nun mit Hülfe des Millon'schen Reagens, wenn reine Substanzen vorliegen, rasch ein Urtheil über die Stellung der beiden Substituenten zu gewinnen und andererseits Verunreinigungen nachzuweisen. Fast jedes Phenol und jede Salicylsäure geben die Para-Reaction, dank dem Gehalt von Parakresol und Para-Oxybenzoesäure.

Es ermöglicht unser Reagens ferner, die Umwandlung von isomeren Modificationen in einander festzustellen und zu demonstrieren. Die Umwandlung der Ortho- in die Para-Oxybenzoesäure durch

Schmelzen mit Kalihydrat wird so ein Vorlesungsexperiment: braunroth färbt sich die Salicylsäure (die zu diesem Zweck möglichst rein sein muss), blauroth ist die Farbe des Schmelzungsproductes.

Die Millon'sche Reaction wird weiter Verwendung finden können bei dem Studium der Hydroxylierung von OH-freien Benzolderivaten, zunächst wieder von nur einfach substituirten, und zwar sowohl extra wie intra corpus.

Was man überhaupt hier zu erwarten hat, kann man schon entnehmen einer Zusammenstellung von Nölting¹⁾, betreffend die „Gesetzmässigkeiten bei der Substitution des Benzols“. Die besonders charakteristische und schon in grosser Verdünnung neben den anderen Isomeren durch die Rosa-Färbung zu erkennende Para-Reaction fehlt bei keiner Hydroxylierung. Aber das Rosa ist doch — ich beziehe mich hier noch speciell auf Versuche mit Wasserstoffhyperoxyd — so verschieden stark entwickelt, dass man bei einiger Uebung und dem Arbeiten unter möglichst gleichen Verhältnissen leicht sagen kann: es ist wesentlich das Paraproduct entstanden (wie in der ersten Gruppe von Nölting), oder dasselbe ist nur beigemischt. Das Gleiche gilt für die oben besprochene, leicht zu Irrthümern führende Verwendung des Millon'schen Reagens bei unrichtiger Zusammensetzung desselben oder zu langer Einwirkung.

Einfache Hydroxylierungen — fast immer unter gleichzeitiger Bindung der neuen Phenole an Schwefelsäure oder Glycuronsäure — sind schon lange im Thierkörper beobachtet. Die Ortsbestimmung der aus den gepaarten Verbindungen abgelösten Phenole ist nicht immer ganz leicht, zumal wenn es sich um nur geringe Mengen handelt. Dann kann neben der Bestimmung des Schmelzpunktes u. s. w. auch die Millon'sche Probe von Werth sein, ja oft allein zur Entscheidung genügen. Bei einer Untersuchung von K. Klingenberg²⁾ über das Verhalten von Diphenyl und Diphenylderivaten im thierischen Organismus waren uns die lebhaften blauen und violetten Färbungen mancher der entstandenen Oxydationsproducte sehr aufgefallen, dieselben hatten aber damals noch nicht verwerthet werden können. Erst umständliche Reinigung, mehrmaliges Umkrystallisiren u. s. w. hatten zu der Gewissheit geführt, dass P-Producte vorlagen.

1) Chem. Ber. Bd. 9 S. 1797. 1876.

2) Studien über Oxydationen aromat. Substanzen im thier. Organismus. Dissert. Rostock 1891.

Schliesslich möchte sich das Millon'sche Reagens neben verschiedenen anderen Benzol- und Phenol-Reagentien auch noch empfehlen bei dem bis daher zu sehr vernachlässigten Studium der Bildung der aromatischen Verbindungen im Pflanzenleib. Die Fragen, wie und wo die Benzoësäure (wahrscheinlich aus Toluol) entsteht und aus der Benzoësäure oder aus Oxytoluolen (Kresolen) die in Pflanzen nicht ganz selten vorkommende o-Oxybenzoësäure (Salicylsäure) und die schliesslich wohl allein, nämlich in den Eiweisskörpern, zurückbleibende p-Oxybenzoësäure, und weiter, ob diese beiden Säuren gleichzeitig gebildet werden oder die letztere erst aus der Salicylsäure entsteht, — diese Fragen können hier nur angedeutet werden.

Im Millon'schen Reagens das Quecksilber durch andere Metalle zu ersetzen, habe ich wiederholt versucht, auch mehr oder weniger deutlich erkennbare Unterschiede in den Färbungen der isomeren Phenole gefunden, aber an Schärfe erreichen die anderen Metallsalze die des Quecksilbers nicht.

Zu den Nitrosoreactionen (Nickel) gehört noch die von Wurster¹⁾ angegebene, bei der Nitrit allein in 1%iger Lösung in 1% Essigsäure in Wirksamkeit tritt. Die Färbungen der drei Oxybenzoësäuren sind wenig charakteristisch, die Färbung des Tyrosins dagegen sehr gut zu benutzen.

Ueber andere Phenolreactionen findet man ausführliche Mittheilungen in dem Werkchen von Nickel. Hier sollen nur einige Bemerkungen Platz finden, die mir von physiologischem Interesse zu sein scheinen.

Da ist denn neuerdings die längst bekannte Phenol-Aldehyd-Reaction mit Erfolg von Denigès²⁾ benutzt worden zum Nachweis des Tyrosins. Besonders günstig erwies sich mir concentrirte Schwefelsäure versetzt mit einigen Tropfen Formaldehyd. Tyrosin schwach erwärmt mit 2—3 ccm der Mischung färbt sich braunroth, nach Zufügen von Eisessig grün. Die drei Oxybenzoësäuren liefern ebenfalls ganz bestimmte Färbungen, aber Grün wird durch Eisessig nicht erzeugt. Da nun ferner Eiweisskörper und Peptone sich nicht färben, so ist die Reaction von Denigès in der That als eine werthvolle Unterstützung der Tyrosin-Reactionen zu bezeichnen.

1) Physiol. Centralbl. Bd. 1 S. 193. 1887.

2) Compt. rend. vol. 130 p. 583. 1900.

In zweiter Linie wäre bei den Phenol-Eisen-Reactionen an die Thatsache zu erinnern, dass die meisten der hier in Betracht kommenden Phenolderivate wie das Phenol selbst sich wohl in wässriger Lösung mit Eisenoxydsalzen färben, aber nicht in alkoholischer Lösung. Eine Ausnahme machen die Phenolderivate mit saurem Charakter, die auch bei Anwesenheit von Alkohol gefärbt werden. Doch muss dabei darauf aufmerksam gemacht werden, dass die m- und p-Oxybenzoësauren auch in wässriger Lösung ungefärbt bleiben und wie viele anorganische und organische Säuren, insbesondere aber ähnlich den fetten Oxsäuren, auch noch in grosser Verdünnung die durch Ferrisalze gefärbten Phenolderivate (wie auch das Phenol selbst) entfärben, — eine Fähigkeit, welche auch das Tyrosin mit ihnen theilt.

Die Piria'sche Tyrosin-Eisen-Reaction, die immer noch mit aufgeführt zu werden pflegt, muss, wie L. Barth¹⁾ schon vor längerer Zeit dargethan hat, als bedeutungslos bezeichnet werden, da dieselbe ebenso erreicht wird bei Behandlung der m- und p-Oxybenzoësaure mit Schwefelsäure.

So weit die Farbenreactionen. Hinsichtlich anderer Reactionen zur Unterscheidung der im Vorstehenden behandelten Phenolderivate ist auf die Lehrbücher der Chemie zu verweisen und auf mein Schriftchen: „Zur Anatomie und Physiologie der quergestreiften Muskelsubstanz“²⁾, in welchem speciell die Beziehungen zu den Eiweisskörpern auseinandergesetzt sind.

1) Sitzungsber. d. kais. Akademie d. Wissensch. i. Wien Bd. 211 H. 2 S. 164. 1865.

2) Leipzig 1882.