Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.
Bd. 358, S. 505 - 511, April 1977

# 5-Isothiocyanato-1,8-naphthalindicarbonsäure-4-methylphenylimid, ein neues Fluoreszenzreagenz für Aminogruppen-haltige Stoffe

Hosni KHALAF und Manfred RIMPLER

Institut für Klinische Biochemie und Physiologische Chemie, Abteilung Medizinische Chemie, der Medizinischen Hochschule Hannover

(Der Schriftleitung zugegangen am 3. September 1976/18. Februar 1977)

**Zusammenfassung:** Aus 1*H*,3*H*-Naphtho[1,8-*cd*]-pyran-1,3-dion (= 1,8-Naphthalindicarbonsäure-anhydrid, Verbindung **1**) wird durch Nitrierung, Kondensation mit *p*-Toluidin, Reduktion mit Zinn(II)-chlorid zu 5-Amino-1,3-dioxo-2-*p*-tolyl-2,3-dihydro-1*H*-benz[*de*]isochinolin (**4**) und Kondensation mit Thiophosgen 5-Isothiocyanato-1,3-dioxo-2-*p*-tolyl-2,3-dihydro-1*H*-benz[*de*]isochinolin (= 5-Isothiocyanato-1,8-naphthalindicarbonsäure-4-methylphenylimid, Verbindung **5**) synthetisiert.
Verb. **5** ist für qualitative und quantitative Analysen von Aminogruppen-haltigen Stoffen geeignet.

---

*5-Isothiocyanato-1,8-naphthalenedicarbox-4-methylphenylimide, a new fluorescence reagent for compounds containing amino groups*

**Summary:** 5-Isothiocyanato-1,3-dioxo-2-*p*-tolyl-2,3-dihydro-1*H*-benz[*de*]isoquinoline (= 5-isothiocyanato-1,8-naphthalenedicarbox-4-methylphenylimide, compd. **5**) was synthesized from 1*H*,3*H*-naphtho[1,8-*cd*]pyran-1,3-dione (= 1,8-naphthalenedicarboxylic anhydride, compd. **1**) through nitration, condensation with *p*-toluidine, reduction with tin(II)-chloride yielding 5-amino-1,3-dioxo-2-*p*-tolyl-2,3-dihydro-1*H*-benz[*de*]isoquinoline (**4**) as intermediate, and condensation with thiophosgene.
Compd. **5** can be used for qualitative and quantitative analyses of compounds containing amino groups.

---

*Key words:* Isothiocyanates, fluorescence reagent, synthesis.

---

Nur wenige der vielen bekannten Fluoreszenzfarbstoffe[1] konnten bis jetzt zur Fluoreszenzmarkierung von Proteinen oder als Reagenz zur quantitativen Bestimmung von Verbindungen mit entsprechend reaktiven Gruppen für immunologische, histologische und biochemische Untersuchungen eingesetzt werden.

Eine dazu geeignete Verbindung soll eine reaktive Gruppe (z.B. einen Sulfonylchlorid-, Isocyanat- oder Isothiocyanatrest) besitzen, die möglichst spezifisch mit dem Protein eine stabile Verbindung bildet und keine weiteren Gruppen hat, die zu unspezifischen Färbungen führen[2].

---

*Abkürzung:* Dansyl-Cl = 1-Dimethylaminonaphthalin-5-sulfochlorid.

Brought to you by | University
Authenticated
Download Date | 5/30/15 8:

Die Forderung nach einem Fluoreszenzfarbstoff, der in der Fluoreszenzmikroskopie durch die UV-Strahlung nicht ausbleicht, wird von Sulfochlorid-Farbstoffen (z.B. dem 1-Dimethylaminonaphthalin-5-sulfochlorid (Dansyl-Cl)[3,4] nicht befriedigend erfüllt[5].

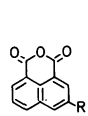
Das Fluorescein-isocyanat[6-8], der klassische Farbstoff der Fluoreszenz-Immunologie, ist wegen seiner geringeren Stabilität heute weitgehend durch das Fluorescein-isothiocyanat[9] ersetzt worden, dessen Synthese auch einfacher ist. Von Fluorescein-isocyanat und Fluorescein-isothiocyanat sind jeweils zwei Isomere bekannt, die schon bei der Herstellung des Ausgangsproduktes entstehen und eine aufwendige Trennung[8-10] erfordern. Obwohl solche Fluoreszenzfarbstoffe heute käuflich zu erwerben sind, ist jedoch der erforderliche Reinheitsgrad nicht immer gewährleistet.

## Ergebnisse und Diskussion

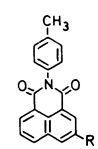
Da die Kopplung zwischen Isothiocyanaten und Aminokörpern unter milden Bedingungen abläuft und die Derivate von 1,3-Dioxo-2-*p*-tolyl-2,3-dihydro-1*H*-benz[*de*]isochinolin sich durch eine gelbgrüne Fluoreszenz auszeichnen, haben wir 5-Isothiocyanato-1,3-dioxo-2-*p*-tolyl-2,3-dihydro-1*H*-benz[*de*]isochinolin (**5**) aus dem entsprechenden Aminoderivat **4** durch Kondensation mit Thiophosgen (vgl. Schema 1) dargestellt. Die Substitution mit der Isothiocyanatgruppe in 5-Stellung wurde gewählt, weil solche Derivate reaktionsfähiger sind als die mit einer Isothiocyanatgruppe in 2- oder 4-Stellung[11,12].

Zunächst wurde 1*H*,3*H*-Naphtho[1,8-*cd*]pyran-1,3-dion (1,8-Naphthalindicarbonsäureanhydrid **1**) mit Natriumnitrat in Schwefelsäure in 3-Stellung zu Verb. **2** nitriert[13-15]. Durch Kondensation mit *p*-Toluidin in Dimethylformamid oder in Wasser war das 4-Methylphenylimid **3** zugänglich, das in Äthanol durch Reduktion[16] mit einer salzsauren Lösung von Zinn(II)-chlorid **4** lieferte.

Zur Synthese von **3** erwies sich Dimethylformamid gegenüber Wasser als geeigneteres Lösungsmittel, da so die Reaktion in homogener Phase durchgeführt und überschüssiges *p*-Toluidin leicht abgetrennt werden kann, zumal **3** bei Raumtemperatur auskristallisiert.



**1**: R = H
**2**: R = $NO_2$



**3**: R = $NO_2$
**4**: R = $NH_2$
**5**: R = NCS

Schema 1. Formeln für **1** - **5**.

Als Zwischenstufe[17,18] der Kondensation von **2** mit *p*-Toluidin zu **3** kann das 1-*p*-Toluidid der 3-Nitro-1,8-naphthalindicarbonsäure angenommen werden.

Die Reduktion von **3** zu **4** verläuft möglicherweise über die nicht isolierten Nitroso- und Hydroxylaminoderivate. Obwohl die Reduktion der Carbonylgruppen von **3** bzw. **4** ausgeschlossen werden kann, waren andere Nebenreaktionen nicht vollständig zu vermeiden. Letztere sind einerseits auf das Reduktionsmittel und andererseits auf die stark sauren Bedingungen zurückzuführen. So ließen sich sowohl durch hydrolytische Spaltung von **3** gebildetes **2** und *p*-Toluidin als auch durch Reduktion von **2** zugängliches 1*H*,3*H*-(3-Aminonaphtho[1,8-*cd*])pyran-1,3-dion nachweisen.

Die katalytische Hydrierung von **3** mittels Wasserstoff und 5proz. Palladium auf Kohle (Typ E 10 N, Fa. Degussa) in Dioxan bzw. in Äthanol mit Hydrazin oder die Reduktion mit Natriumdithionit in schwach alkalischem Medium ergaben kein einheitliches **4**.

Podrezova und Mitarb.[19] berichten dagegen über die Synthese von **4** durch Kondensation von 1*H*,3*H*-(3-Aminonaphtho[1,8-*cd*])pyran-1,3-dion mit *p*-Toluidin in $NaHSO_3$-Lösung. Nähere Angaben und Daten wurden dazu jedoch nicht mitgeteilt.

Da Thiophosgen und **4** in wäßriger Lösung nur schlecht, dagegen in Aceton gut löslich sind, wurde **5** in Aceton dargestellt. Die geringe Löslichkeit von **5** in Aceton vereinfachte auch die anschließende Aufarbeitung. Wahrscheinlich bildet **4** mit Thiophosgen zunächst ein Thiocarbamidsäurechlorid, das unter Chlorwasserstoffabspaltung **5**

Brought to you by | University
Authenticated
Download Date | 5/30/15 8:

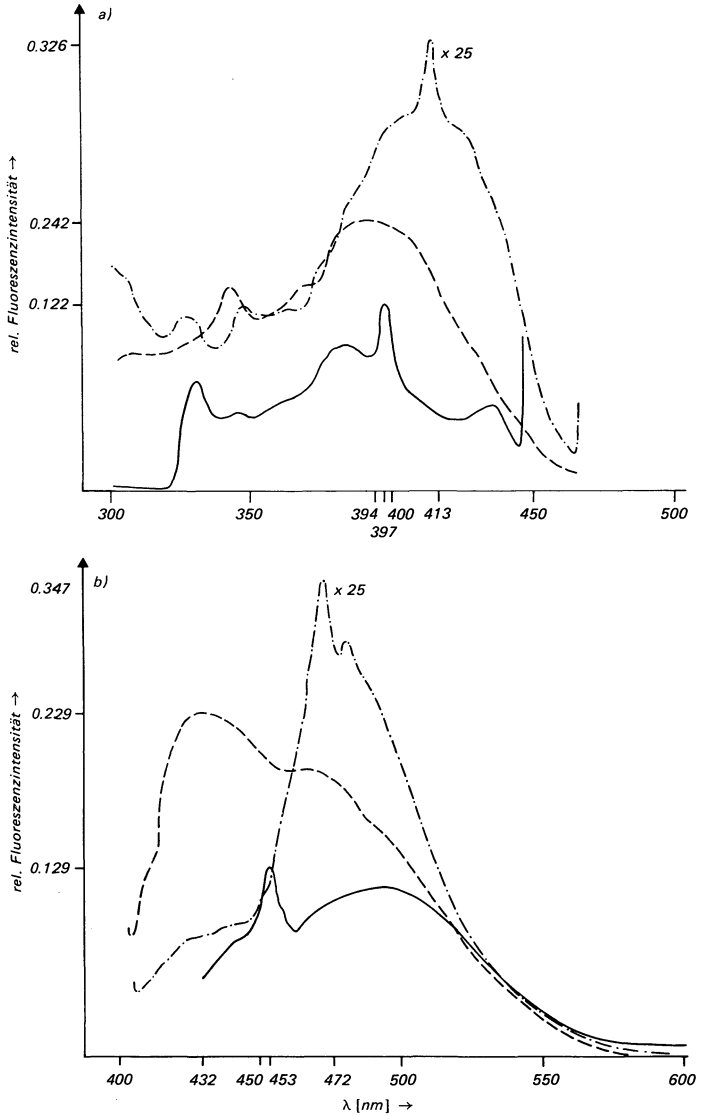



Abb. 1. Anregungsspektren (a) und Emissionsspektren (b) von **5** in Dioxan (–·–·–), Aceton (——) und Chloroform (– – –). Die Wellenlänge des anregenden Lichtes in b) entsprach jeweils dem $\lambda_{max}$-Wert aus a) (unkorr.).

Brought to you by | University of
Authenticated
Download Date | 5/30/15 8:

bildet oder mit **4** unter Bildung eines symmetrischen Thioharnstoffderivates reagiert[20]. Um das auszuschließen, ist Thiophosgen in ausreichendem Überschuß einzusetzen.

Das aus **4** hergestellte **5** ist gelblich gefärbt, reines **5** jedoch in festem Zustand nach Umkristallisieren aus Tetrachlormethan fast farblos. Umfällung von **5** aus Aceton-, Dioxan- oder Tetrahydrofuran-Lösungen mit Wasser liefert kein farbloses Produkt. In Chloroform gelöstes **5** zersetzte sich, als eine Reinigung über Aluminiumoxid- (neutral, sauer, basisch) und Kieselgelsäulen versucht wurde. Zur weiteren Charakterisierung von **5** wurde der Einfluß verschiedener Lösungsmittel auf $\lambda_{max}$ der Anregung und Emission und auf die Fluoreszenzintensitäten der Verbindungen **1** - **5** untersucht.

Die Nitroverbindungen **2** und **3** weisen im Gegensatz zu **1**, **4** und **5** keine merkliche Fluoreszenz auf. Vergleichsweise zu **4** fluoresziert **5** in allen Lösungsmitteln nur sehr gering. Diese Eigenschaft macht **5** für die quantitative Analyse wertvoll. Die Fluoreszenzintensität von **5** in den Lösungsmitteln nimmt bei konstanter Konzentration ($10^{-4}$ M) bei 20 °C in folgender Reihe ab*: *p*-Dioxan > Chloroform > Aceton.

Die Anregungs- und Emissionsspektren von **5** sind in Abb. 1 dargestellt. Die Fluoreszenzintensität von **5** nimmt in Übereinstimmung mit Befunden anderer Autoren[21] demnach mit zunehmenden Dielektrizitätskonstanten ($\epsilon$) und mit abnehmender Viskosität ($\eta$) der Lösungsmittel ab.

Bei histochemischen Färbungen mittels **5** zeigte sich auch nach längerer UV-Bestrahlung keine Ausbleichung.

Da **5** in Wasser schwer löslich, jedoch in Dioxan, Dimethylformamid, Pyridin oder Hexamethylphosphorsäuretriamid gut löslich ist, ist die Zugabe von wäßrigen Lösungen nur begrenzt möglich, damit eine Ausfällung vermieden wird. Abb. 2 gibt die Fällungskurve wieder und zeigt, wieviel Wasser zu 1 m*l* einer dioxanischen **5**-Lösung verschiedener Konzentrationen gegeben werden kann, um gerade keine Ausfällung herbeizuführen. Es ist zu erwähnen, daß **5** in Lösung auch mit Wasser reagiert, jedoch langsamer als mit Aminogruppen-haltigen Stoffen, wobei die

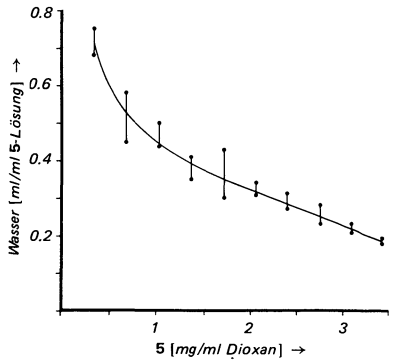



Abb. 2. Löslichkeit von **5** in Dioxan/Wasser bei 20 °C (Fällungskurve von **5** in Dioxan mit Wasser).

Reaktionsgeschwindigkeit in wäßriger Lösung von der Konzentration von **5**, der zugesetzten Wassermenge, der Temperatur und der Art des organischen Lösungsmittels sowie vom Basenzusatz abhängig ist. **5** ist in wasserfreiem Dioxan oder Aceton am stabilsten.

Diese Eigenschaften von **5** ermöglichen quantitative Bestimmungen von Aminen, Aminosäuren und anderen Aminogruppen-haltigen Stoffen mit kleinen Probenmengen. Außerdem kann **5** zur photometrischen oder fluorometrischen Bestimmung von Wasser bei höherer Temperatur in Dimethylformamid, Dioxan und anderen Lösungsmitteln verwendet werden.

Abb. 3 zeigt ein Dünnschichtchromatogramm der aus **5** und einigen Aminen (Anilin, Methyl-, Äthyl- und Diäthylamin) gebildeten 1,3-disubstituierten Thioharnstoffe **6** - **9**. Hierzu wurden $3 \times 10^{-4}$ mol **5** mit $4 \times 10^{-4}$ mol Amin in 20 m*l* Dioxan 2 h bei 40 °C umgesetzt.




| | 6 | 7 | 8 | 9 |
|---|---|---|---|---|
| R' | H | H | H | $C_2H_5$ |
| R" | $C_6H_5$ | $CH_3$ | $C_2H_5$ | $C_2H_5$ |

Schema 2. Formeln für **6** - **9**.

* Krause, Chr., Dissertation, Med. Hochschule Hannover, in Vorbereitung.

Brought to you by | University
Authenticated
Download Date | 5/30/15 8:

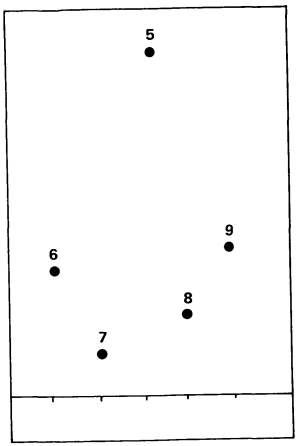



Abb 3. Dünnschichtchromatogramm von 6 - 9. Fließmittel: Chloroform/Essigester 7 : 3.

Ein weiteres Anwendungsbeispiel ist die Reaktion von **5** in Dioxan mit wäßrigen Aminosäurelösungen im Nanomolbereich (vgl. Abb. 4).

Zuletzt wurde **5** zur dünnschichtchromatographischen Identifizierung[22] und fluorometrischen Bestimmung (Chr. Krause*) von Aminosäuren sowie zur photometrischen Bestimmung von Aminen, biogenen Aminen, Aminosäuren und Albumin in Dioxan/Wasser bzw. Dimethylformamid/Wasser von uns eingesetzt. **5** soll auch zur fluorometrischen Bestimmung von Aminen, biogenen Aminen (H.-M. Preuß*) und Albumin, zur Fluoreszenzmarkierung von Eiweißkörpern und histologischen Materialien**) sowie zur Sequenzanalyse von Peptiden (P. Ilgner*) eingesetzt werden. Über diese Untersuchungen wird gesondert berichtet.

* Dissertationen, Med. Hochschule Hannover, in Vorbereitung.

** gemeinsam mit R. Schwarz und I. Bünger, Anatomisches Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover, Abt. für Histologie.

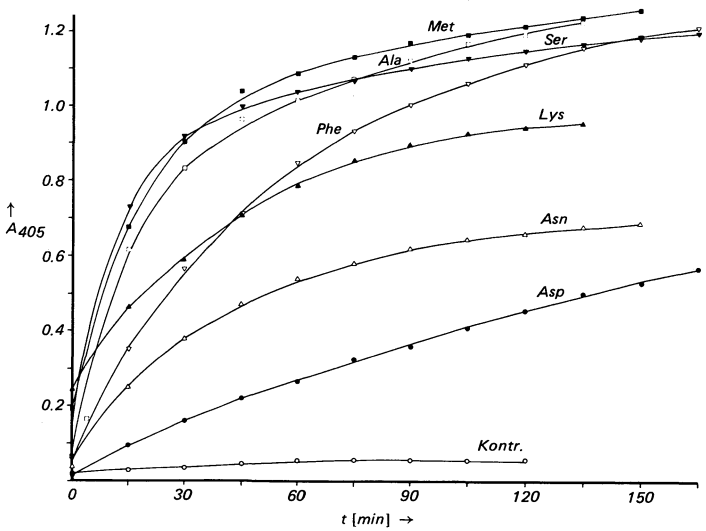



Abb. 4. Kinetische Untersuchungen von Aminosäuren mit **5**.

Der Ansatz enthielt 330 nmol Aminosäure in 1.25 *ml* 1.3mM $Na_2CO_3$ und 750 mmol **5** in 2.1 *ml* Dioxan. Die Messung erfolgte bei 405 nm gegen einen Ansatz ohne Aminosäure. Kontr. = ohne Aminosäure, Messung gegen Ansatz ohne $Na_2CO_3$.

Brought to you by | University
Authenticated
Download Date | 5/30/15 8:

Dem *Fonds der Chemischen Industrie* und der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* haben wir für die Bereitstellung von Forschungsmitteln sehr zu danken. Für die Palladiumkatalysatoren danken wir besonders der *Fa. Degussa.*

## Material und Methoden

Alle Schmelzpunkte wurden im Elektrothermal-Schmelzpunktbestimmungsapparat (ohne Korrektur) ermittelt. Schwefel wurde nach Schöniger in unserem analytischen Laboratorium von Herrn B. Diercks bestimmt. Die CHN-Analysen wurden im Mikroanalytischen Laboratorium Beller, Göttingen, angefertigt.

Die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen wurden mit SIF Kieselgel auf Aluminium (Fa. Riedel-de-Haën) in den Fließmitteln a) Chloroform, b) Chloroform/Essigester 7:3 durchgeführt. Zur Identifizierung diente eine UV-Lampe (Fa. Hanau) mit einem Strahlungsmaximum von 254 nm.

Die IR-Spektren (KBr) wurden mit dem Gerät Unicam SP 1000 aufgenommen.

Die fluorometrischen Untersuchungen wurden mit dem Schoeffel-Fluoreszenz-Spektralphotometer RRS 1000 bei 20 °C durchgeführt; Spaltbreiten für Anregung 1.5 nm und Emission 1.0 nm Bandbreite; Referenz: 1 $\mu$A; Signal 1 $\mu$A; Wellenlängenantriebsgeschwindigkeit: 25 nm/min; Lichtquelle: 150-W-Xenon-Kurzbogenlampe; Fluoreszenzdetektor: 1 P 28; Küvettenschichtdicke: 1 cm; Schreiber: X-Range: (0.1 V/cm ≙ 10 nm/cm); Y-Range: (20 mV/cm ≙ 2 nm/cm).

Die photometrischen Untersuchungen erfolgten bei 20 °C mit dem Eppendorf-Filterphotometer M 1101, Spaltbreite: A 2.5 × 8; Filter: Hg 405 nm; Küvettenschichtdicke: 1 cm.

Die Angaben über die Ausbeute beziehen sich jeweils auf das umkristallisierte Reaktionsprodukt.

*Reinigung*[23] *von 1H,3H-Naphtho[1,8-cd]pyran-1,3-dion (1)*

20.00 g **1** (100.9 mmol) (Fa. Merck) werden aus 700 m*l* Eisessig umkristallisiert und in 125 m*l* 2M KOH durch Erhitzen gelöst, mit 400 m*l* 5proz. Salzsäure ausgefällt, heiß abgesaugt und mit Wasser chloridfrei gewaschen. Der Filterkuchen wird nochmals aus 1.2 *l* Eisessig umkristallisiert, nach Abkühlung scharf abgesaugt, mit etwa 20 m*l* Eisessig gewaschen und bei 120 °C getrocknet.

Ausb.: 18.00 g (90% d.Th.); Schmp.: 274 °C (aus Eisessig); IR-Spektrum (KBr): 1750 und 1780 $cm^{-1}$ (CO-O-CO)

$R_F$-Wert: in a) 0.73, in b) 0.81.

*1H,3H-[3-Nitronaphtho[1,8-cd]pyran-1,3-dion (2)*

In 50 m*l* konz. Schwefelsäure werden unter Rühren 10.00 g (50.46 mmol) **1** gelöst und 4.50 g (52.95 mmol) $NaNO_3$ (Fa. Merck) portionsweise zugefügt. Nun rührt man bei 45 °C noch 30 min, läßt abkühlen und gießt das Reaktionsgemisch auf 100 g Eis. **2** wird scharf abgesaugt, ausreichend mit Wasser, danach mit etwa 10 m*l* Methanol gewaschen und bei 100 °C getrocknet.

Ausb.: 10.40 g (85% d.Th.), Schmp.: 246 °C (aus Eisessig), Schmp. Lit.[13]: 247 °C, Lit.[14]: 247 - 248 °C, Lit.[23]: 251 - 252 °C

IR-Spektrum (KBr): 1345, 1535 $cm^{-1}$ ($NO_2$)

$R_F$-Wert: in a) 0.58, in b) 0.75.

*5-Nitro-1,3-dioxo-2-p-tolyl-2,3-dihydro-1H-benz[de]-isochinolin (3)*

**3** wird ausgehend von **2** und *p*-Toluidin in Wasser (A) oder in Dimethylformamid (B) hergestellt. *p*-Toluidin (Fa. Riedel-de-Haën) wurde dazu durch Wasserdampf- oder Vakuumdestillation gereinigt.

Zu A): 21.60 g (88.82 mmol) **2** und 20.00 g (186.6 mmol) *p*-Toluidin wurden in 400 m*l* Wasser suspendiert und 2 h unter Rückfluß erhitzt. Das überschüssige *p*-Toluidin wurde durch Wasserdampfdestillation entfernt. Nach dem Erkalten wurde das Reaktionsprodukt scharf abgesaugt.

Zers.-P.: 302 - 303 °C (aus Eisessig nach Behandlung mit Aktivkohle)

Ausb.: 22.90 g (78% d.Th.)

Zu B): 5.00 g (20.56 mmol) **2** wurden in 50 m*l* Dimethylformamid (frisch destilliert) bei 90 °C unter Rühren im Wasserbad gelöst. Dazu tropft man eine Lösung von 2.50 g (23.33 mmol) *p*-Toluidin in 10 m*l* Dimethylformamid und rührt 3 h bei dieser Temperatur. Nach Abkühlung des Reaktionsgemisches wird scharf abgesaugt, mit kleinen Portionen kaltem Dimethylformamid und anschließend mit ca. 20 m*l* Wasser nachgewaschen. Das Produkt wird bei 80 °C getrocknet.

Ausb.: 5.40 g (79% d. Th.)

Zers.-P.: 299 - 300 °C (aus Eisessig nach Behandlung mit Aktivkohle)

IR-Spektrum (KBr):
1220, 1645, 1690 $cm^{-1}$ (CO-N-CO)
1340, 1545 $cm^{-1}$ ($NO_2$)

$R_F$-Wert: in a) 0.71, in b) 0.87.

$C_{19}H_{12}N_2O_4$ (332.3)

| | | | |
|---|---|---|---|
| Ber. | C 68.61 | H 3.61 | N 8.43 |
| Gef. | C 68.77 | H 3.72 | N 8.42 |

Brought to you by | University
Authenticated
Download Date | 5/30/15 8:

*5-Amino-1,3-dioxo-2-p-tolyl-2,3-dihydro-1H-benz[de]-isochinolin (4)*

39.60 g (119.2 mmol) **3** werden in 800 ml Äthanol bei 70 °C unter Rühren erhitzt und 200.00 g (886.4 mmol) $SnCl_2 \cdot 2\,H_2O$ (Fa. Merck) in 250 ml konz. Salzsäure zugetropft. Man rührt 3 h unter Rückfluß und engt auf die Hälfte ein. Nach dem Abkühlen des Reaktionsgemisches im Eisbad wird abgesaugt, zuerst mit 50 ml verd. Salzsäure und dann mit 200 ml Wasser gewaschen. Anschließend wird nacheinander mit 300 ml 1proz. Natronlauge und Wasser bis zur Säurefreiheit gewaschen. Nach Digerieren mit 50 ml kaltem Äthanol wird bei 80 °C getrocknet.

Ausb.: 30.00 g (83% d. Th.)
Zers.-P.: 309 - 310 °C (aus Methanol)
IR-Spektrum (KBr): 1300, 1630, 3360, 3460 $cm^{-1}$ ($NH_2$)
$R_F$-Wert: in a) 0.28, in b) 0.52

$C_{19}H_{14}N_2O_2$ (302.3)

| | | | |
|---|---|---|---|
| Ber. | C 75.41 | H 4.67 | N 9.26 |
| Gef. | C 75.45 | H 4.70 | N 9.18 |

*5-Isothiocyanato-1,3-dioxo-2-p-tolyl-2,3-dihydro-1H-benz[de]isochinolin (5)*

300 ml trockenes Aceton und 25 ml (37.70 g, 327.8 mmol) Thiophosgen (Fa. Merck-Schuchardt) werden vorgelegt und eine Lösung von 50.00 g (165.4 mmol) **4** in Aceton innerhalb 1 h zugetropft. Anschließend wird noch 2 h bei Raumtemperatur weitergerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird das Gemisch in Eis gekühlt (ca. 30 min) und das hellgelbe Produkt scharf abgesaugt. Der Rückstand wird portionsweise mit 200 ml kaltem Aceton gewaschen (das Filtrat kann für weitere Umsätze von **4** zu **5** verwendet werden) und **5** über KOH im Vak. getrocknet.

Ausb.: 53.00 g (93% d. Th.)
Zers.-P.: 278 - 280 °C (aus $CCl_4$ nach Aktivkohlebehandlung)
IR-Spektrum (KBr): 2065 $cm^{-1}$ (N=C=S)[24]
$R_F$-Wert: in a) 0.84, in b) 0.91

$C_{20}H_{12}SN_2O_2$ (344.4)

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Ber. | C 69.75 | H 3.49 | N 8.13 | S 9.29 |
| Gef. | C 69.79 | H 3.43 | N 8.17 | S 9.18 |

*Literatur*


1 Steiner, R. F. (1962) *Chem. Rev.* **25**, 457 - 483.
2 Chadwick, C. S., McEntegart, M. C. & Nairn, R. C. (1958 b) *Immunology* **1**, 315 - 327.
3 Weber, G. (1952) *Biochem. J.* **51**, 155 - 167.
4 v. Mayersbach, H. (1958) *Acta Histochem.* **5**, 351 - 368.
5 Poetschke, G. (1967) *Ergeb. Laboratoriumsmed.* **3**, 194 - 211.
6 Coons, A. H., Creech, H. J., Jones, R. N. (1941) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **47**, 200 - 202.
7 Coons, A. H., Creech, H. J., Jones, R. N. & Berliner, E. (1942) *J. Immunol.* **45**, 159 - 170.
8 Coons, A. H. & Kaplan, M. H. (1950) *J. Exp. Med.* **91**, 1 - 13.
9 Riggs, J. L., Seiwald, R. J., Burckhalter, J., Downs, C. M. & Metcalf, T. G. (1958) *Am. J. Clin. Pathol.* **34**, 1081 - 1097.
10 McKinney, R. M., Spillane, J. T. & Pearce, G. W. (1964) *Analyt. Biochem. (New York)* **7**, 74 - 86.
11 Browne, D. W. & Dyson, G. M. (1931) *J. Chem. Soc. (London)*, 3285 - 3308.
12 Browne, D. W. & Dyson, G. M. (1934) *J. Chem. Soc. (London)*, 178 - 179.
13 Zollinger, H. (1950) *Helv. Chim. Acta* **33**, 530 - 538.
14 Anselm, F. & Zuckmayer, F. (1899) *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **32**, 3283 - 3296.
15 Grabe, C. (1903) *Liebigs Ann. Chem.* **327**, 77 - 85.
16 Schröter, R. (1957) in Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl-Müller, Hrsg.) 4. Aufl., Bd. XI/1, S. 341 - 601, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart.
17 Spring, F. S. & Woods, J. C. (1945) *J. Chem. Soc. (London)*, 625 - 628.
18 Beckwith, A. L. J. (1970) in The Chemistry of Amides (J. Zabicky, Hrsg.) S. 92, Interscience Publ. J. Wiley & Sons, London–New York–Sydney–Toronto.
19 Podrezova, T. N., Reznichenko, V. V. & Plakidin, V. L., USSR Pat. 283210 v. 6.10.1970 [*C.A.* **75**, 63498 (1971)].
20 Dyson, G. M. & George, H. J. (1924) *J. Chem. Soc. (London)* **125**, 1702 - 1708.
21 Van Duuren, B. L. (1963) *Chem. Rev.* **63**, 325 - 354.
22 Görgen, H. & Dörpinghaus, J. (1977) Dissertation, Med. Hochschule Hannover, im Druck.
23 Mihailescu, A. & Steopoe, A. (1923) *Bull. Sect. Sci. Acad. Roum.* **8**, 102 - 110 [*C.A.* **18**, 831 (1924)].
24 Colthup, N. B., Daly, L. H. & Wiberley, St. E. (1964) Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy, S. 204, Academic Press, New York.


Dr. Hosni Khalaf und Prof. Dr. Manfred Rimpler, Medizinische Hochschule Hannover, Institut für Klinische Biochemie und Physiologische Chemie, Abt. Medizinische Chemie, Postfach 61 01 80, D-3000 Hannover 61.

Brought to you by | University
Authenticated
Download Date | 5/30/15 8:

Brought to you by | University
Authenticated
Download Date | 5/30/15 8: