

Benzoaten etwas deutlichere Unterschiede festzustellen. Odorobiosid-G-benzoat schmolz ca. 20° tiefer als das Benzoat der Substanz AA 55. Es dürfte sich somit um Isomere handeln, bei denen möglicherweise die Glucose an verschiedenen HO-Gruppen des Digitalose-Anteils eingreift. Substanz AA 55 wird Gracilosid genannt. Für Gracilosid und Odorobiosid kommen in erster Linie die Formeln I und VI in Betracht. Von diesen wurde dem Odorobiosid G bereits früher willkürlich Formel I zugeteilt. Sollte sich diese als richtig erweisen, so käme für Gracilosid vor allem Formel VI in Frage.

Pharmazeutische Anstalt und
Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel.

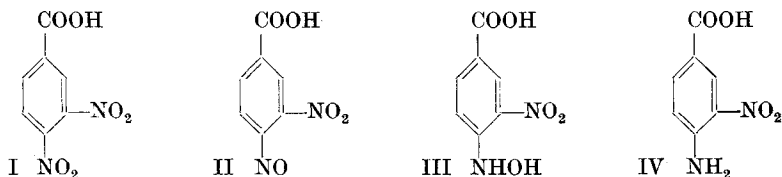
98. Quantitative Zuckerbestimmung mit 3,4-Dinitrobenzoesäure¹⁾

von E. Borel und H. Deuel.

(13. IV. 53.)

Verschiedene aromatische Nitroverbindungen eignen sich als Reagenzien für kolorimetrische Zuckerbestimmungen. Quantitative Zuckerbestimmungen mit 3,5-Dinitrosalicylsäure sind von uns kürzlich beschrieben worden²⁾. In der vorliegenden Arbeit wird die Verwendbarkeit von 3,4-Dinitrobenzoesäure studiert.

3,4-Dinitrobenzoesäure (I) wurde nach einer modifizierten Vorschrift von *Weygand & Hofmann*³⁾ hergestellt. Sie wird von Zuckern in der Hitze oder von Ascorbinsäure in der Kälte zu einem violetten Farbstoff reduziert. Für die Konstitutionsermittlung dieses Farbstoffes wurden die hypothetischen Reduktionsprodukte 3-Nitro-4-nitroso- (II), 3-Nitro-4-hydroxylamino- (III) und 3-Nitro-4-aminobenzoessäure (IV) synthetisiert. Die Absorptionsspektren dieser Verbindungen sind in Fig. 1 dargestellt.



Die Absorptionsmaxima liegen für I unter 3400 Å, für II bei 3400 Å, für III unter 3400 Å und bei 5600 Å und für IV bei 4100 Å.

¹⁾ Vgl. Diss. E. Borel, ETH, 1953.

²⁾ F. Hostettler, E. Borel & H. Deuel, *Helv.* **34**, 2132 (1951); E. Borel, F. Hostettler & H. Deuel, *Helv.* **35**, 115 (1952).

³⁾ F. Weygand & H. Hofmann, *B.* **83**, 405 (1950).

Das Absorptionsspektrum der 3,4-Dinitrobenzoesäure zeigt bei zunehmendem Alter oder bei Erhitzung der Lösung eine Zunahme der Extinktion zwischen 3400 und 5400 Å.

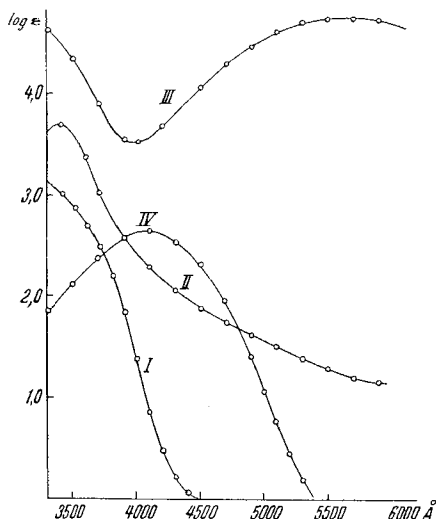


Fig. 1.

Absorptionsspektren von 3,4-Dinitro- (I), 3-Nitro-4-nitroso- (II), 3-Nitro-4-hydroxylamino- (III) und 3-Nitro-4-amino-benzoesäure (IV).

Die Lösungen, die bei Reaktion zwischen 3,4-Dinitrobenzoesäure mit Zucker bzw. Ascorbinsäure in alkalischem Milieu entstehen, wurden kolorimetrisch untersucht. Ascorbinsäure bewirkt in der Kälte die Bildung eines Farbstoffes, dessen Absorptionsspektrum mit demjenigen von 3-Nitro-4-hydroxylamino-benzoesäure vollkommen identisch ist. Werden Zucker mit 3,4-Dinitrobenzoesäure in alkalischem Milieu erhitzt, so werden in Abhängigkeit von der Zeit verschiedene Extinktionskurven erhalten. Aus den Kurven für D-Glucose (Fig. 2) kann ersehen werden, dass bei der Reaktion anfänglich vor allem 3-Nitro-4-hydroxylamino-benzoesäure gebildet wird, ähnlich wie o-Nitrophenylhydroxylamin aus o-Dinitrobenzol¹⁾. Mit fortschreitender Reaktion wird eine Zunahme von 3-Nitro-4-amino-benzoesäure beobachtet. 3-Nitro-4-nitroso-benzoesäure kann kolorimetrisch nicht erkannt werden.

Die kolorimetrischen Messungen wurden bei 5480 Å vorgenommen, da hier kein störender Einfluss der anderen Nitroverbindungen (3-Nitro-4-amino-benzoesäure und erhitzter 3,4-Dinitrobenzoesäure) erfolgen kann. Für die Reaktionen wurden optimale Reaktionsbedingungen (etwa entsprechend der Kurve VI der Fig. 2) ausgewählt. Bei 5480 Å

¹⁾ R. Kuhn & F. Weygand, B. **69**, 1969 (1936).

wurde eine Konzentrations-Extinktionskurve der reinen 3-Nitro-4-hydroxylamino-benzoesäure aufgenommen (Fig. 3).

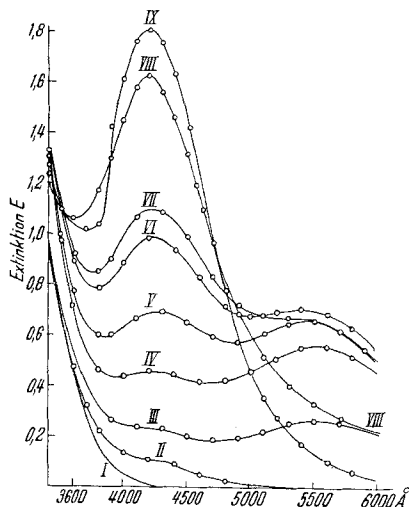


Fig. 2.

Extinktionskurven der Reaktionslösung 3,4-Dinitrobenzoesäure/p-D-Glucose.

Erhitzungszeiten in Minuten: 0 (I); 0,5 (II); 1,0 (III); 1,5 (IV); 2,0 (V); 2,5 (VI); 3,0 (VII); 5,0 (VIII); 10,0 (IX). — 0,5 g p-D-Glucose.

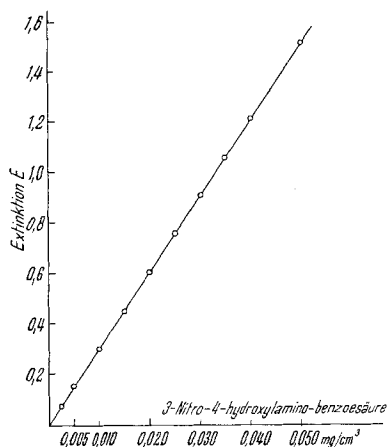


Fig. 3.

Konzentrations-Extinktionskurve der 3-Nitro-4-hydroxylamino-benzoesäure.

Für einige Mono- und Disaccharide wurden Konzentrations-Extinktionskurven bei 5480 Å aufgenommen (Fig. 4).

Die Redoxreaktionen dürften bei den verschiedenen Zuckern stets nach dem gleichen Mechanismus, aber mit verschiedenen Ge-

schwindigkeiten erfolgen. Pentosen und Fructose reagieren sehr viel rascher als die übrigen Monosaccharide, Disaccharide und Uron-säuren. Verschiedene Methylderivate von Zuckern zeigen keine Reaktion.

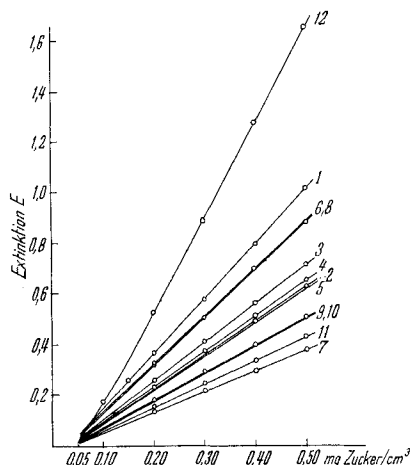


Fig. 4.

Konzentrations-Extinktionskurven der Reaktionslösungen 3,4-Dinitrobenzoesäure/Zucker.

() = Kochdauer in Sek.

1. D-Xylose (90)	7. L-Rhamnose, H ₂ O (150)
2. L-Arabinose (90)	8. D-Glucuronsäure (150)
3. D-Glucose (150)	9. D-Galakturonsäure, H ₂ O (150)
4. D-Galaktose (150)	10. Maltose, H ₂ O (150)
5. D-Mannose (150)	11. Lactose, H ₂ O (150)
6. D-Fructose (90)	12. Ascorbinsäure (600; 20°)

Die Mengen der gebildeten 3-Nitro-4-hydroxylamino-benzoe-säure wurden nach den Daten der Fig. 3 und 4 berechnet und betragen im Mittel ca. 0,05 Mol pro Mol Zucker (Tab. 1).

Mit Hilfe der angegebenen kolorimetrischen Methode wurden die Zuckerbausteine einiger Polysaccharide nach ihrer papierchromato-graphischen Trennung quantitativ bestimmt. Im Polysaccharid aus der Knolle von *Amorphophallus Konjaku*¹⁾ wurden D-Glucose und D-Mannose im Verhältnis von 1:1,6 gefunden, im Polysaccharid aus dem Samen von *Trigonella Foenum graecum*²⁾ D-Galaktose und D-Mannose im Verhältnis von 1:1 und im Polysaccharid aus dem Samen

¹⁾ K. Nishida & H. Hashima, ref. C. **1931**, I, 295; T. Otuki, ref. W. W. Pigman & R. M. Goepf, Chemistry of the Carbohydrates, S. 616, New York 1948; E. Borel, F. Hostettler & H. Deuel, Helv. **35**, 115 (1952).

²⁾ J. K. N. Jones & F. Smith, Adv. Carbohydrate Chem. **4**, 266 (1949); K. M. Daoud, Biochem. J. **26**, 255 (1932); C. R. H. Jyer & B. N. Saoti, J. Indian, Inst. Sci. **16A**, 88 (1933); P. Andrews, L. Hough & J. K. N. Jones, Soc. **1952**, 2744.

von *Tamarindus Indica*¹⁾ D-Xylose, D-Galaktose und D-Glucose im Verhältnis von 1:2:3. – Die Methode ist einfach zu handhaben. Der mittlere Fehler beträgt etwa $\pm 5\%$; er ist vor allem durch die Papierchromatographie bedingt. Auf die genaue Einhaltung der Reaktionszeit ist zu achten.

Tabelle 1.

Bildung von 3-Nitro-4-hydroxylamino-benzoesäure bei der Reaktion von 3,4-Dinitrobenzoesäure mit verschiedenen Zuckern.

Zucker	mg Farbstoff pro mg Zucker	Mol Farbstoff pro Mol Zucker
D-Xylose	0,067	0,0507
L-Arabinose	0,042	0,0317
D-Glucose	0,048	0,0434
D-Galaktose	0,043	0,0391
D-Mannose	0,042	0,0382
D-Fructose	0,059	0,0536
L-Rhamnose, H ₂ O	0,023	0,0211
D-Glucuronsäure	0,055	0,0488
D-Galakuronsäure, H ₂ O .	0,034	0,0364
Maltose, H ₂ O	0,034	0,0618
Lactose, H ₂ O	0,029	0,0527
Ascorbinsäure	0,109	0,0969

Experimenteller Teil.

3,4-Dinitrobenzoesäure²⁾: 100 g p-Toluidin wurden in 170 cm³ siedendem Benzol gelöst, mit 90 g Essigsäureanhydrid versetzt, 1 Std. weiter erhitzt und abgekühlt. Der entstandene Niederschlag wurde abgesaugt und mit Petroläther nachgewaschen. Ausbeute 129 g N-Acetyl-p-toluidin (92,7%, bezogen auf p-Toluidin). Smp. 147°. — Je 32 g N-Acetyl-p-toluidin wurden unter Rühren rasch in ein Gemisch von 118 cm³ Salpetersäure (d = 1,4) und 47 cm³ konz. Schwefelsäure eingetragen. Durch Kühlung wurde die Temperatur auf 30° bis 40° gehalten. Nach 15 Min. wurde die Lösung in 700 cm³ H₂O gegeben. Es bildete sich ein gelber Niederschlag von 3-Nitro-4-acetamino-toluol, der abgesaugt und mit Eiswasser gewaschen wurde. Ausbeute 40,8 g (97,3%, bezogen auf N-Acetyl-p-toluidin). Smp. 91°. — 163 g 3-Nitro-4-acetamino-toluol wurden in 206 cm³ heissem Alkohol gelöst, mit einer Lösung von 41 g KOH in 48 cm³ Wasser versetzt, 20 Min. erhitzt und abgekühlt. Aus der Lösung wurde 3-Nitro-4-amino-toluol in Form roter Kristalle gewonnen. Ausbeute 118,2 g (92,7%, bezogen auf 3-Nitro-4-acetamino-toluol). Smp. 114°. — 320 g Kaliumpersulfat wurden mit 280 cm³ konz. Schwefelsäure 1 Std. in einer eisgekühlten Schale zerrieben und in 3 l Eiswasser eingerührt. Zu dieser Lösung wurde eine Suspension von 87 g fein gepulvertem 3-Nitro-4-amino-toluol in 2 l Wasser zugegeben, dann wurde 24 Std. geschüttelt. Anschliessend wurde abfiltriert und der Niederschlag nochmals unter

¹⁾ T. P. Ghose & S. Krishna, Ind. chem. Soc. **5**, 115 (1942); S. Krishna & T. P. Ghose, Ind. Text. J. Bombay, May 1943; T. P. Ghose & S. Krishna, Curr. Sci. **14**, 299 (1945); T. P. Ghose & S. Krishna, Ind. Text. J. Bombay, March 1946; T. P. Ghose, S. Krishna & P. S. Rao, J. Sci. Ind. Research **4**, 705 (1946); P. S. Rao & S. Krishna, Curr. Sci. **15**, 133 (1946); ibid. **15**, 168 (1946); ibid. **16**, 256 (1947); R. S. Rao, Proc. Ind. Acad. Sci. **28**, 52 (1948); G. R. Savur & A. Sreenivasan, J. Biol. Chem. **172**, 501 (1948).

²⁾ F. Weygand & H. Hofmann, B. **83**, 405 (1950).

den gleichen Bedingungen, jedoch mit der Hälfte des Oxydationsmittels, 24 Std. geschüttelt. Ausbeute 87 g hellgelbes 3-Nitro-4-nitroso-toluol (92,0%, bezogen auf 3-Nitro-4-amino-toluol). Smp. 146°. — Je 10 g 3-Nitro-4-nitroso-toluol wurden langsam in die fünffache Menge rauchender Salpetersäure eingetragen. Durch Kühlung wurde die Temperatur auf 25° gehalten. Es wurde ein gelb-braunes Produkt, 3,4-Dinitro-toluol, erhalten, das abgesaugt und mit Wasser gewaschen wurde. Ausbeute 10,6 g (96,5%, bezogen auf 3-Nitro-4-nitroso-toluol). Smp. 56°. — 36 g 3,4-Dinitro-toluol wurden in 180 cm³ konz. Schwefelsäure bei 30,0° gelöst¹⁾. Nun wurden unter Rühren langsam in kleinen Dosen 60 g Chromsäureanhydrid in Schuppenform zugegeben. Durch Kühlung wurde die Temperatur auf 45—50° gehalten. Nach 4 Std. wurde die Mischung auf Eis gegossen, wobei sich ein grünlicher Niederschlag ausschied, der mehrmals aus Wasser-Alkohol umkristallisiert wurde. Ausbeute 37,5 g 3,4-Dinitrobenzoesäure (89,4%, bezogen auf 3,4-Dinitro-toluol). Smp. 166°.

3,399 mg Subst. gaben 4,944 mg CO₂ und 0,557 mg H₂O

2,977 mg Subst. gaben 0,350 cm³ N₂ (17°, 726 mm)

C₇H₄O₆N₂ Ber. C 39,63 H 1,90 N 13,21%

Gef. „ 39,69 „ 1,83 „ 13,22%

3-Nitro-4-amino-benzoesäure²⁾: 100 g p-Amino-benzoesäure wurden mit 70 g trockenem Natriumacetat in 300 cm³ Eisessig 10 Std. am Rückfluss erhitzt. Die warme Reaktionsmischung wurde in Eiswasser gegossen, wobei Acetamino-benzoesäure ausfiel. Ausbeute 107 g (81,9%). Smp. 154°. — 50 g dieser Verbindung wurden langsam zu 200 cm³ rauchender Salpetersäure unter Kühlung auf 10° zugegeben. Nach halbstündiger Reaktion wurde die Mischung auf Eis gegossen. Es schied sich ein gelber Niederschlag von 3-Nitro-4-acetamino-benzoesäure aus, der abgenußt und mit Eiswasser ausgewaschen wurde. Ausbeute 57,2 g (91,1%, bezogen auf p-Acetamino-benzoesäure). Smp. 221°. — 57 g 3-Nitro-4-acetamino-benzoesäure wurden in Suspension während 1 Std. in 600 cm³ konz. Salzsäure unter gutem Rühren erhitzt. Nach Abkühlung wurde filtriert und der erhaltene Niederschlag mit Wasser gut ausgewaschen. Die Verbindung wurde mehrmals aus heissem Alkohol umkristallisiert. Ausbeute 41,6 g 3-Nitro-4-amino-benzoesäure (89,9%, bezogen auf 3-Nitro-4-acetamino-benzoesäure). Smp. 284°.

4,635 mg Subst. gaben 7,850 mg CO₂ und 1,396 mg H₂O

4,425 mg Subst. gaben 0,610 cm³ N₂ (21°, 729 mm)

C₇H₆O₄N₂ Ber. C 46,16 H 3,32 N 15,38%

Gef. „ 46,22 „ 3,37 „ 15,35%

3-Nitro-4-nitroso-benzoesäure: 31,5 g 3-Nitro-4-amino-benzoesäure wurden in 0,5 l Wasser suspendiert und mit Caro'scher Säure (200 g Kaliumpersulfat in 142 cm³ konz. Schwefelsäure) 7 Std. bei 60° unter Rühren behandelt. Nach Filtration der Suspension wurde der Rückstand gut mit Eiswasser ausgewaschen und mehrmals aus Alkohol umkristallisiert. Ausbeute 24,8 g 3-Nitro-4-nitroso-benzoesäure (72,8%, bezogen auf 3-Nitro-4-amino-benzoesäure). Smp. 170°, unter Zersetzung.

4,827 mg Subst. gaben 7,625 mg CO₂ und 0,871 mg H₂O

3,911 mg Subst. gaben 0,497 cm³ N₂ (20,0°, 725 mm)

C₇H₄O₅N₂ Ber. C 42,87 H 2,06 N 14,28%

Gef. „ 43,11 „ 2,02 „ 14,12%

3-Nitro-4-hydroxylamino-benzoesäure: 0,5 g 3-Nitro-4-nitroso-benzoesäure wurden in einer Lösung von 0,1 g Ascorbinsäure in 100 cm³ Aceton und 25 cm³ Wasser gelöst. Nach 10 Min. wurde die gelb-orange Lösung mit 600 cm³ Wasser verdünnt und viermal mit 150 cm³ Essigester ausgeschüttelt. Die Essigesterazüge wurden mit 100 cm³ Wasser gewaschen, und das Waschwasser wurde mit Essigester ausgeschüttelt. Die Essigesterazüge wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und dann im Vakuum ein-

¹⁾ H. Goldstein & R. Voegeli, Helv. **26**, 475 (1943).

²⁾ A. Kaiser, B. **18**, 2942 (1895); E. Ritsert & W. Epstein, D.R.P. **151.725** (1903).

gedampft. Der kristalline Rückstand wurde umkristallisiert. Sämtliche Operationen erfolgten unter Stickstoff. Ausbeute 0,329 g 3-Nitro-4-hydroxylamino-benzoesäure (65,1%, bezogen auf 3-Nitro-4-nitroso-benzoesäure). Smp. 153° unter Zersetzung.

4,061 mg Subst. gaben 6,317 mg CO₂ und 1,132 mg H₂O

4,953 mg Subst. gaben 0,623 cm³ N₂ (21,0°, 740 mm)

C₇H₆O₅N₂ Ber. C 42,43 H 3,05 N 14,14%

Gef. „ 42,45 „ 3,12 „ 14,22%

Kolorimetrische Bestimmungen: Die Reaktion zwischen Zucker und 3,4-Dinitrobenzoesäure erfolgte stets in Lösungen mit 2 g 3,4-Dinitrobenzoesäure und 31,8 g Na₂CO₃ pro l unter Erhitzung im siedenden Wasserbad.

Die Absorptionsmessungen erfolgten im *Beckman*-Spektrophotometer Modell DU bei 18° mit 3,18 g Na₂CO₃ pro l. Für die quantitativen Zuckerbestimmungen wurden die Extinktionen nach 10facher Verdünnung der Reaktionslösungen bei 5480 Å gemessen.

Papierchromatographische Zuckertrennungen: Die papierchromatographischen Zuckertrennungen wurden, wie früher beschrieben, ausgeführt¹⁾. Die Zucker wurden jedoch aus dem Papierchromatogramm in einem verkleinerten Extraktionsapparat nach *Wasitzky* mit 1 cm³ Wasser während 3 Std. extrahiert.

Untersuchung einiger Polysaccharide: Die Ausgangsprodukte, Knollen von *Amorphophallus Konjaku*, Samen von *Trigonella Foenum graecum* und *Tamarindus indica*, wurden gereinigt, gemahlen und die Polysaccharide mit heissem Wasser extrahiert. Die Extrakte aus den Samen wurden zur Entfernung von Eiweissen²⁾ mit Amylalkohol-Chloroform ausgeschüttelt. Die Polysaccharide wurden mit HCl-Alkohol gefällt, mit HCl-Alkohol ausgewaschen und mit verd. Alkohol bis zur Chlorfreiheit nachgewaschen und vorsichtig getrocknet. Je 0,200 g der gereinigten Polysaccharide wurden mit Säure hydrolysiert. Anschließend wurden unhydrolysierbare Rückstände abfiltriert, die Lösungen über Anionenaustauscher Amberlite IR-4B perkoliert, eingedampft und auf genau 20 cm³ aufgefüllt.

Wir danken Herrn Dr. F. Hostettler für seine Anregungen. — Die Mikroanalysen wurden von Herrn A. Peisker, Mikroanalytisches Laboratorium, Brugg, ausgeführt. — Diese Untersuchungen wurden durch Mittel aus den *Arbeitsbeschäftigungskrediten des Bundes* ermöglicht, für die wir bestens danken.

Zusammenfassung.

3,4-Dinitro-, 3-Nitro-4-nitroso-, 3-Nitro-4-hydroxylamino- und 3-Nitro-4-amino-benzoesäure wurden synthetisiert und ihre Absorptionsspektren aufgenommen. Bei der Reduktion von 3,4-Dinitrobenzoesäure durch Zucker in alkalischem Milieu unter Erhitzung entsteht u. a. 3-Nitro-4-hydroxylamino-benzoesäure. Die unter Standardbedingungen gebildeten Mengen dieses Farbstoffes wurden für einige Mono- und Disaccharide bei 5480 Å kolorimetrisch ermittelt. Es können Zuckermengen von 0,05 bis 0,5 mg quantitativ bestimmt werden. Die einzelnen Zuckerkomponenten in Polysaccharidhydrolysaten können nach papierchromatographischer Trennung mit einer Genauigkeit von $\pm 5\%$ bestimmt werden.

Agrikulturchemisches Institut
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

¹⁾ E. Borel, F. Hostettler & H. Deuel, *Helv.* **35**, 115 (1952).

²⁾ M. G. Sevag, *Bioch. Z.* **237**, 419 (1934).