

60. *d*-Ascorbinsäure aus *d*-Sorbitose

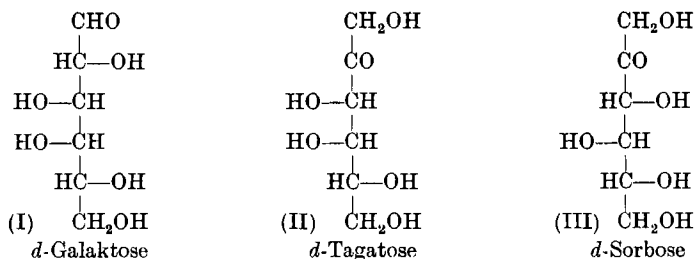
von K. Gätzi¹⁾ und T. Reichstein.

(28. III. 38.)

d-Ascorbinsäure (IX), der Antipode der natürlichen Ascorbinsäure, ist, soweit bekannt, bisher nur aus *d*-Xyloson nach der Blausäuremethode bereitet worden²⁾. Diese Methode ist sehr mühsam und für die Herstellung grösserer Mengen daher wenig geeignet. Für biologische Versuche war es erwünscht, über etwas reichlichere Mengen der *d*-Säure zu verfügen.

Von Reichstein und Grüssner³⁾ ist eine Methode angegeben worden, die von *l*-Sorbitose ausgehend über die *l*-Gulonsäure (= 2-Keto-*l*-gulonsäure) in sehr guten Ausbeuten zur *l*-Ascorbinsäure führt. Es war naheliegend, für die Versuche zur Bereitung von *d*-Ascorbinsäure einen analogen Weg, ausgehend von *d*-Sorbitose (III) einzuschlagen, da sich reine *d*-Sorbitose gegen optisch inaktive Reagenzien ganz analog verhalten muss wie die *l*-Form.

d-Sorbitose (III) (früher *l*-Sorbitose oder ψ -Tagatose genannt) ist nach der Methode von C. A. Lobry-de Bruyn und W. A. v. Ekenstein⁴⁾ aus *d*-Galaktose (I) durch Umlagerung mit Alkalien leicht erhältlich. Die Schwierigkeit dabei ist nur, dass nebenher auch *d*-Tagatose (II) entsteht, die mit *d*-Sorbitose isomorph kristallisiert und daher schwer ganz abzutrennen ist.



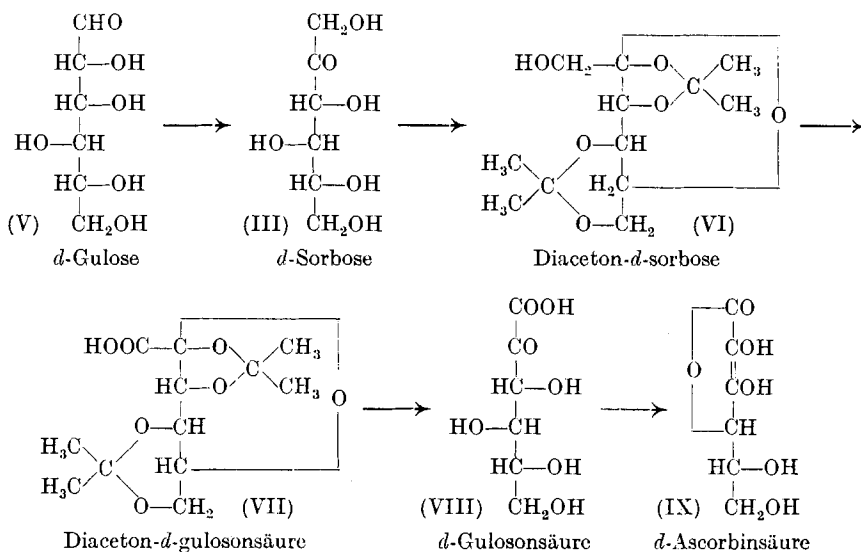
Der Versuch mit einer nach den Angaben der holländischen Autoren bereiteten *d*-Sorbitose vom Smp. ca. 154° ergab, dass aus einer solchen Sorbitose auf dem angegebenen Weg keine reine *d*-Gulonsäure erhältlich ist. Die durch Acetonierung erhaltene Diacetonverbindung wurde sorgfältig gereinigt und im Hochvakuum destilliert.

¹⁾ Ich danke der Firma J. R. Geigy, Basel, für ein Arbeitsstipendium.

²⁾ Helv. **16**, 561 (1933); Nature **131**, 280 (1933); Helv. **16**, 1020 (1933); W. N. Hawthorth und Mitarbeiter, J. Soc. Chem. Ind. **52**, 645 (1933); Soc. **1933**, 1419.

³⁾ Helv. **17**, 311 (1934).

⁴⁾ R. **16**, 267 (1837); **19**, 1 (1900).



Aus dieser *d*-Sorbose liess sich leicht eine Acetonverbindung (VI) gewinnen, die bei der Oxydation mit Permanganat sofort reine Diaceton-*d*-gulosonsäure (VII) lieferte. Aus dieser konnte weiter die freie *d*-Gulosonsäure (VIII) und durch alkalische Umlagerung des Methylesters derselben die *d*-Ascorbinsäure (IX) bereitet werden. Für die letzten Stufen steht zwar heute die saure Umlagerungsmethode¹⁾ zur Verfügung, die in guter Ausbeute direkt von (VII) zu (IX) führen sollte. Wegen der geringen vorhandenen Mengen zogen wir es vor, die uns besser bekannte ältere Methode zu verwenden.

Da die Bereitung der *d*-Gulose aber recht mühsam ist, so ist auch die Herstellung der reinen *d*-Sorbose auf diesem Wege so wenig ergiebig, dass vorläufig die Blausäure-ozon-Methode immer noch das einfachste Verfahren darstellt, um zur *d*-Ascorbinsäure zu gelangen.

Experimenteller Teil.

d-Sorbose aus *d*-Galaktose.

In geringer Variation der Vorschrift von *C. A. Lobry-de Bruyn* und *W. A. v. Ekenstein*²⁾ wurden 50 g *d*-Galaktose in 250 cm³ Wasser gelöst und im Wasserbad auf 70° erwärmt. Unter lebhaftem Schwenken wurde bei dieser Temperatur eine Lösung von 1,5 g Kaliumhydroxyd in 25 cm³ Wasser innerhalb 20 Minuten zulaufen gelassen und die Mischung hierauf noch 3 Stunden weiter auf 70° erwärmt, wobei sie sich rotbraun färbte. Hierauf wurde mit der Mischung von 1,0 g konz. Schwefelsäure und 5 cm³ Wasser versetzt, wodurch die

¹⁾ *F. Elger*, Festschrift für *E. C. Borell*, Basel (1936), S. 229.

²⁾ *R.* **16**, 267 (1897); **19**, 1 (1900).

Farbe nach Orange umschlug und die Lösung schwach kongosauer reagierte. Sie wurde im Vakuum bei 45° Badtemperatur zum Syrup eingedampft, der 78 g wog. Dieser wurde vorsichtig in kleinen Portionen mit insgesamt 100 cm³ absolutem Alkohol versetzt und die Krystallisation von Anfang an durch Impfen mit *d*-Galaktose und Durchreiben eingeleitet. Nach vollständigem Zusatz der genannten Alkoholmenge wurde zunächst unter öfterem Umschwenken bei Zimmertemperatur und dann über Nacht bei 0° krystallisieren gelassen. Hierauf wurde abgenutscht, mit Alkohol nachgewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wurden 17 g *d*-Galaktose zurückerhalten, die etwas Kaliumsulfat enthält, aber für eine weitere Umlagerung gleich wieder verwendet werden kann. Die Mutterlaugen wurden eingedampft, mit etwas Methanol verflüssigt und mit absolutem Alkohol bis zur beginnenden Trübung versetzt. Durch Impfen und längeres Stehen liessen sich noch 3 g *d*-Galaktose abtrennen. Die verbleibende Lösung wurde im Vakuum eingedampft und vollständig getrocknet. Es verblieben 38 g Syrup, der in 250 cm³ Wasser aufgenommen, in einer Glasstopfenflasche mit 28 g Brom versetzt wurde. Es wurde bis zur Lösung des Broms geschüttelt und 16 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Hierauf wurde im Vakuum der Überschuss des Broms völlig entfernt und die verbleibende Lösung in der Wärme mit etwa 80 g reinem Bleicarbonat bis zur neutralen Reaktion auf Lackmus verrührt. Es wurde abgekühlt, durch eine Nutsche filtriert und der Niederschlag mit Wasser nachgewaschen. Die blanke Lösung wurde im Vakuum zum dünnen Syrup (ca. 150 g Rückstand) eingedampft. Unter starkem Umschütteln wurde allmählich mit so viel Methylalkohol versetzt, bis keine weitere Fällung mehr eintrat (ca. 300 cm³ sind nötig). Die ausgefallenen Bleisalze wurden abgenutscht und mit Methylalkohol gut gewaschen. Die Lösung wurde im Vakuum zum Syrup eingengt und nochmals mit Methylalkohol gefällt. Nach Abnutschen dieser zweiten, geringeren Menge von Bleisalzen wurde die Lösung im Vakuum eingedampft und vollständig getrocknet. Der Rückstand wurde in wenig Methanol aufgenommen und mit so viel absolutem Alkohol versetzt, bis keine weitere Fällung mehr eintrat. Hierzu sind ca. 350 cm³ erforderlich. Es wurde filtriert, die Fällung mit absolutem Alkohol gewaschen und die leicht gelb gefärbte Lösung im Vakuum zum dünnen Syrup eingedampft. Dieser erwies sich als praktisch brom- und bleifrei. Nach längerem Stehen, beim Impfen mit *d*-Sorbitose sofort, begann die Krystallisation, die schliesslich durch zweitägiges Stehen bei 0° vervollständigt wurde. Es wurde abgenutscht, mit etwas Methanol, dann mit absolutem Alkohol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die Ausbeute betrug 6,9 g rein weisse Krystalle vom Smp. 140—145°. Durch Umkrystallisieren aus ½ Teil Wasser unter Zusatz von Alkohol wurde der Smp. 152

bis 154° erreicht. Bei grösseren Ansätzen wurden analoge Ausbeuten erhalten.

Versuche zur Überführung der wie oben bereiteten
d-Sorbose in *d*-Gulosonsäure.

15 g *d*-Sorbose (aus *d*-Galaktose) vom Smp. 152—154° wurden, genau wie bei der *l*-Form beschrieben¹⁾, mit Aceton und Schwefelsäure umgesetzt und entsprechend aufgearbeitet. Die zuletzt durch Waschen der ätherischen Lösung mit verdünnter Sodalösung gereinigte Diacetonverbindung wurde im Hochvakuum bei 0,05 mm und 105—110° destilliert. Es wurden 10,3 g erhalten, die ein sehr dickes, leicht gelblich gefärbtes Öl darstellten.

Zur Oxydation wurden sie mit einer Lösung von 4,7 g Kaliumhydroxyd in 100 cm³ Wasser aufgeschwemmt und, wie bei der *l*-Form beschrieben¹⁾, mit insgesamt 8,8 g Kaliumpermanganat oxydiert. Nach Entfernung des Braunsteins durch Filtration wurde die klare Lösung zunächst mit etwas Kohlendioxyd, dann mit verdünnter Schwefelsäure soweit neutralisiert, dass Phenolphthalein nicht mehr gerötet, Lackmus jedoch noch deutlich gebläut wurde. Diese Lösung wurde im Vakuum völlig zur Trockne gedampft. Dem Rückstand wurde durch Ausschütteln mit Äther zunächst unangegriffene Diacetonverbindung vollständig entzogen. Es wurden ca. 2,5 g davon erhalten. Die verbliebenen Salze wurden mit Methylalkohol ausgekocht und von unlöslichen, rein anorganischen Anteilen durch Filtration befreit. Der Methanolauszug wurde im Vakuum völlig eingedampft und der Rückstand in 200 cm³ absolutem Alkohol aufgenommen. Da sich auch nach längerem Stehen nichts ausschied (höchstens Spuren von anorganischem Material fielen nach einigen Wochen bei 0° aus), wurde im Vakuum vollständig eingedampft. Der Rückstand wurde mit einer Spur absolutem Alkohol verflüssigt und mit 200 cm³ Aceton warm versetzt. Nach längerem Stehen krystallisierte allmählich ein Kaliumsalz aus. Es wurde abgenutscht, mit Aceton gewaschen und getrocknet. Die Ausbeute betrug 4,4 g. Aus der Mutterlauge liess sich noch 1,3 g gewinnen. Es handelt sich um diaceton-*d*-tagaturonsaures Kalium. In absolutem Alkohol ist es leicht löslich.

Zur Isolierung der freien Säure wurde das Kaliumsalz in zwei Teilen Wasser gelöst, mit etwas Eis versetzt und dann mit einer Mischung von je ½ Teil konz. Salzsäure, Wasser und Eis versetzt. Es fiel sofort ein krystalliner Niederschlag aus, der abgenutscht, mit etwas Eiswasser gewaschen, kurz im Exsikkator, dann an der Luft getrocknet wurde. Das Produkt schmolz im offenen Röhrchen bei 107—109°. Die Diaceton-*d*-tagaturonsäure aus reiner Diaceton-

¹⁾ T. Reichstein, A. Grüssner, Helv. 17, 311 (1934).

d-tagatose¹⁾ sowie die Mischprobe schmolzen genau gleich, wenn gleich erhitzt wurde. Die Spaltung mit Wasser¹⁾ ergab die freie *d*-Tagaturonsäure zunächst als Syrup, der beim Stehen über Nacht nicht erstarrte, jedoch beim Animpfen mit krystallisierter *d*-Tagaturonsäure sofort krystallisierte. Die mit Alkohol gewaschenen Krystalle zeigten einen Schmelzpunkt von 108—110°. Nach Umkrystallisieren aus absolutem Alkohol stieg er auf 109,5—111°. Die Mischprobe mit *d*-Tagaturonsäure, die nach *Ehrlich* und *Guttman*²⁾ bereitet worden war, zeigte keine Depression. Die spez. Drehung betrug $[\alpha]_D^{19} = -13,2^{\circ}$ (nach 30 Minuten, $c = 0,9$ in Wasser) resp. $-10,5^{\circ}$ nach 24 Stunden. *Ehrlich* und *Guttman* fanden $[\alpha]_D^{21} = -14,15^{\circ}$ (nach 2 Minuten) resp. $-9,8^{\circ}$ nach 24 Stunden.

Auch bei Wiederholung der Versuche unter etwas abgeänderten Bedingungen konnte kein anderes Resultat erhalten werden. Aus den Mutterlaugen des diaceton-*d*-tagaturonsauren Kaliums liess sich auch durch Wechsel der Lösungsmittel kein diaceton-*d*-gulonsaures Kalium erhalten, auch die aus den amorphen Kaliumsalzen freigesetzten Säuren lieferten keine reine Diaceton-gulonsäure.

d-Sorbose aus *d*-Gulose.

d-Gulose wurde nach *E. Fischer* und *R. Stahel*³⁾ aus *d*-Xylose über das *d*-Gulonsäure-lacton bereitet. 20 g *d*-Gulonsäure-lacton gaben bei der Reduktion mit Natrium-amalgam unter den bei *M. Steiger*⁴⁾ angegebenen Bedingungen 10 g farblosen rohen *d*-Gulose-syrup und etwa 9 Lacton zurück (über das Bariumsalz abgetrennt).

Die 10 g *d*-Gulose-Syrup wurden in 100 cm³ wasserfreiem Pyridin heiss gelöst (wobei etwa 1 g harziges Material ungelöst zurückblieb), und 6 Stunden unter Rückfluss gekocht (Ölbad ca. 150°). Dann wurde im Vakuum eingedampft und der Rückstand zur Entfernung des Pyridins mehrmals unter Wasserzusatz im Vakuum eingedampft. Der pyridinfreie Rückstand wurde mit Wasser auf 200 cm³ verdünnt, in einer Glasstopfenflasche mit 10 g Brom versetzt, bis zur Lösung desselben energisch geschüttelt und 14 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Das überschüssige Brom wurde im Vakuum vollständig entfernt und die mit Wasser auf 250 cm³ verdünnte Lösung in der Wärme mit 120 g reinem Bleicarbonat vollständig neutralisiert. Dauer 2 Stunden. Dann wurde der Niederschlag abgenutscht, mit Wasser gewaschen und die leicht trübe Lösung noch über wenig Kohle filtriert und im Vakuum zum dünnen Syrup eingedampft, wobei sich reichlich weitere Bleisalze ausschieden. Das Konzentrat wurde unter Schütteln vorsichtig mit insgesamt $\frac{1}{2}$ Liter Methanol versetzt, wobei der grösste Teil des gulon-

¹⁾ *T. Reichstein, W. Bosshard, Helv. 17, 753 (1934).*

²⁾ *F. Ehrlich, R. Guttman, B. 67, 573 (1934).*

³⁾ *B. 24, 532 (1891).*

⁴⁾ *Helv. 19, 189 (1936).*

sauren Bleis ausfällt. Dieses wog nach dem Trocknen im Vakuum 4,8 g. Die Methanollösung wurde im Vakuum zum Syrup eingengt, der schon während dem Eindampfen zu krystallisieren begann. Die Krystalle wurden abgenutscht und mit Methanol gewaschen. Die Mutterlauge wurde vollständig getrocknet, mit wenig Methanol verflüssigt und mit viel absolutem Alkohol versetzt, wobei noch etwas Verunreinigungen ausfielen, die abgenutscht wurden. Die verbleibende Alkohollösung gab nach dem Einengen im Vakuum beim Impfen noch eine weitere kleine Menge *d*-Sorbose. Total wurden 3,3 g Rohprodukt erhalten. Zur Reinigung wurde in ca. 150 cm³ heissem Methanol gelöst, mit etwas Kohle filtriert und stark (auf etwa 20 cm³) eingengt. Die Sorbose schied sich in farblosen Krystallen aus, die bei 162—165° korr. schmolzen. Ausbeute 2,6 g. Eine Probe wurde nochmals umkrystallisiert und schmolz dann scharf bei 165,5—166° korr. Ein weiterer Ansatz mit 13,9 g Gulose-Syrup gab nochmals 4,2 g rohe *d*-Sorbose.

Diaceton-d-gulosonsäure (= *Diaceton-2-keto-d-gulonsäure*) (VII).

5,4 g *d*-Sorbose (aus *d*-Gulose) vom Smp. 160—165° wurden wie bei der *l*-Form beschrieben¹⁾ acetoniert. Es wurden 5,9 g im Hochvakuum bei 0,1 mm und 109—110° destillierte Diacetonverbindung erhalten, deren Krystallisation nicht abgewartet wurde. Sie wurde gleich wie bei der *l*-Form beschrieben¹⁾ mit Kaliumpermanganat oxydiert und wie dort angegeben aufgearbeitet. Es wurden 4,3 g krystallisiertes diaceton-*d*-gulosonsaures Kalium erhalten. Daneben wurden 0,9 g unangegriffenes Ausgangsmaterial zurückerhalten.

4,2 g obigen Kaliumsalzes wurden in 9 g Wasser gelöst, mit 2 g Eis und dann unter Rühren mit einer Mischung von 2,1 cm³ konz. Salzsäure, 2,1 cm³ Wasser und 2,1 g Eis versetzt. Es fiel eine krystallisierte Säure aus, die mit Eiswasser gewaschen, zuerst kurz im Exsikkator, dann an der Luft getrocknet wurde. Den wässrigen Lösungen wurden die Reste sofort durch Ausschütteln mit Essigester entzogen. Insgesamt wurden 4 g erhalten.

d-Gulosonsäure (= *2-Keto-d-gulonsäure*) (VIII).

3,9 g der obigen acetonierten Säure wurden mit 40 cm³ Wasser 45 Minuten auf dem siedenden Wasserbad erhitzt und die Lösung dann im Vakuum zur Trockne gedampft. Der Rückstand gab beim Anreiben mit Aceton 1,4 g krystallisierte Säure vom Smp. 173—174° korr. unter Zersetzung.

Methylester. 1,3 g *d*-Gulosonsäure wurden in 50 cm³ Methanol gelöst und bei 0° mit ätherischer Diazomethanlösung versetzt, bis die Gelbfärbung für kurze Zeit bestehen blieb. Nach dem Eindampfen im Vakuum und Anreiben mit wenig Aceton wurde 0,7 g krystallisierter Methylester vom Smp. 147—155° korr. erhalten.

¹⁾ T. Reichstein, A. Grüssner, Helv. 17, 311 (1934).

d-Ascorbinsäure (IX).

0,7 g obigen Methylesters wurden in 7 cm³ Methanol gelöst und in der Hitze mit 1,17 cm³ einer Lösung versetzt, die aus 1 g Natrium und 15 cm³ Methanol bereitet worden war. Die Mischung wurde eine Minute gekocht, abgekühlt und mit so viel einer frisch bereiteten Lösung von Salzsäuregas in Methanol versetzt, als in einer Parallelbestimmung zur Neutralisation von 1,17 cm³ der oben verwendeten Natrium-methylatlösung erforderlich waren. Es wurde im Vakuum eingedampft, der Rückstand mit heissem absoluten Alkohol ausgezogen, die Lösung filtriert und im Vakuum eingedampft. Der Syrup krystallisierte beim Animpfen mit *d*-Ascorbinsäure sofort. Es wurden 0,3 g vom Smp. 176—178^o korr. erhalten. Die Mischprobe gab keine Depression.

Laboratorium f. Organ. Chemie, Eidg. Techn. Hochschule, Zürich.

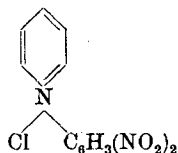
61. Eine kolorimetrische Bestimmung des Nicotinsäure-amids¹⁾

von P. Karrer und H. Keller.

(29. III. 38.)

Da Nicotinsäure-amid als Bestandteil der Codehydrasen und als Ergänzungsstoff der tierischen Nahrung (Vitamin) grössere Bedeutung erlangt hat, haben wir versucht, eine Methode auszuarbeiten, die den Nachweis und die Bestimmung kleiner Mengen dieser Verbindung erlauben soll. Diese Methode ist eine kolorimetrische und daher mit jenen Fehlermöglichkeiten belastet, die fast allen kolorimetrischen Verfahren eigen sind. Unser Versuchsmaterial reicht auch noch nicht aus, um anzugeben, wie gross die Versuchsfehler bei Verwendung von verschiedenartigem tierischen oder pflanzlichen Ausgangsmaterial ausfallen. Bis hierüber noch mehr Erfahrungen vorliegen, möchten wir das Verfahren zunächst zu grössenordnungsmässigen Bestimmungen empfehlen.

Die Methode, die wir benutzen, beruht auf der bekannten Reaktion der Pyridinverbindungen, mit 2,4-Dinitro-1-chlorbenzol Pyridiniumsalze zu liefern, die durch Alkali zu tiefenfarbigen (gelbroten)



¹⁾ Anmerk. b. d. Korrektur. S. P. Vilter, T. D. Spiess und A. P. Mathews schlagen soeben in einer vorläufigen Mitteilung ohne nähere experimentelle Angaben ein ähnliches Verfahren zur Bestimmung von Nicotinsäure-amid vor, wie wir es hier beschreiben. (Am. Soc. 60, 731 (1938)).