

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—178⁰ korr. erhalten. Die Mischprobe gab keine Depression.

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

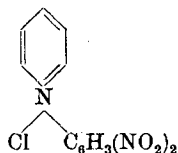
61. Eine kolorimetrische Bestimmung des Nicotinsäure-amids¹⁾

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)).

Derivaten des Glutacon-aldehyds aufgespalten werden. Nicotinsäureamid verhält sich hier wie andere Pyridinverbindungen. Es kann also nur bei Abwesenheit anderer Pyridinderivate mit unserer Methode ermittelt werden. Bei der Untersuchung tierischer Organe werden Störungen durch andere Stoffe kaum zu befürchten sein, da man andere, im Tierreich verbreitete Pyridinkörper nicht kennt; etwas anders liegen die Verhältnisse im Pflanzenreich, indem dort durch die nicht sehr häufigen, aber immerhin da und dort auftretenden Pyridinalkaloide Störungen veranlasst werden können.

Ausser Nicotinsäureamid würde auch Nicotinsäure bei unserer Methode mitbestimmt. Dies dürfte aber für die hier interessierenden Probleme von keinem wesentlichen Nachteil sein, da Nicotinsäure Nicotinsäureamid als Ergänzungsstoff der Nahrung ersetzen kann.

Die Farbintensität der erhaltenen gelben Lösung messen wir mit dem Leifostufenphotometer. Aus der mit bekannten Mengen Nicotinsäureamid angelegten kolorimetrischen Eichkurve lässt sich für jede gefundene Farbintensität der zugehörige Wert der Nicotinsäureamid-Menge entnehmen.

Zum Vergleich wurde die Kolorimetrierung auch mit dem *Rosenheim-Schuster'schen* Tintometer versucht. Man kann auch damit eine Farbskala aufstellen, welche den Zusammenhang zwischen Nicotinsäureamidmenge und Farbintensität wiedergibt; doch fanden wir diese Messungen weniger praktisch und weniger genau.

Aufstellung der Eichkurve.

Verschiedene, genau abgewogene Mengen Nicotinsäureamid (1 bis 25 mg) wurden mit je der 4-fachen Menge 2,4-Dinitro-1-chlorbenzol während einer Stunde bei 90° verschmolzen. Es ist darauf zu achten, dass die Schmelzen klar sind, da sonst die Möglichkeit besteht, dass nicht alles Nicotinsäureamid reagiert hat.

Nun behandelte man die erkaltete Schmelze mit Äther, der unverändertes Dinitrochlorbenzol löst, spülte den Ätherextrakt in einen Scheidetrichter und wusch das Gefäß, in dem die Schmelze ausgeführt worden war, mehrmals mit Äther und Wasser aus. Alle diese Extrakte wurden quantitativ in den Scheidetrichter gespült. In diesen gaben wir dann noch ca. 10 cm³ Wasser, schüttelten durch, trennten die wässrige Schicht ab und extrahierten die Ätherlösung noch zweimal mit Wasser. Die vereinigten wässrigen Extrakte brachte man in einen Messkolben und vertrieb durch vorsichtiges Erwärmen den darin gelöst gewesenen Äther. Nach dem Abkühlen wurde mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt und, falls nötig, eine Spur durch den Äther vorher in Lösung gehaltenes und jetzt ausgefallenes Dinitrochlorbenzol abfiltriert.

Hierauf wurde die klare Lösung in das Kolorimetergefäß eingefüllt und mit 1 bis 2 Tropfen 20-proz. Kalilauge versetzt. Die sofort auftretende Gelbrotfärbung gelangte ohne Verzögerung zur kolorimetrischen Messung, da sie mit der Zeit verblasst.

In dieser Weise erhielten wir die in der Tabelle 1 zusammengestellten Messresultate im Leifostufenphotometer; aus ihnen ist die nachfolgende Eichkurve I zur kolorimetrischen Bestimmung von Nicotinsäure-amid abgeleitet.

Tabelle 1.

Schmelze Nr.	Abgewogene Menge Nicotinsäure-amid in mg	Konzentration der untersuchten Lösung in mg Nicotinsäure-amid pro cm^3	Extinktionsmodul
1	25,0 mg	$5,0 \times 10^{-1} \text{ mg/cm}^3$	8,80
2	25,0 mg	$5,0 \times 10^{-1} \text{ mg/cm}^3$	8,91
1	25,0 mg	$2,5 \times 10^{-1} \text{ mg/cm}^3$	4,22
2	25,0 mg	$2,5 \times 10^{-1} \text{ mg/cm}^3$	4,16
2	25,0 mg	$1,25 \times 10^{-1} \text{ mg/cm}^3$	2,76
1	25,0 mg	$1,0 \times 10^{-1} \text{ mg/cm}^3$	1,92
2	25,0 mg	$1,0 \times 10^{-1} \text{ mg/cm}^3$	1,95
7	5,0 mg	$1,0 \times 10^{-1} \text{ mg/cm}^3$	2,00
8	5,0 mg	$1,0 \times 10^{-1} \text{ mg/cm}^3$	2,05
9	10,0 mg	$1,0 \times 10^{-1} \text{ mg/cm}^3$	1,87
2	25,0 mg	$7,5 \times 10^{-2} \text{ mg/cm}^3$	1,26
9	5,0 mg	$7,5 \times 10^{-2} \text{ mg/cm}^3$	1,20
7	5,0 mg	$7,5 \times 10^{-2} \text{ mg/cm}^3$	1,30
2	25,0 mg	$6,25 \times 10^{-2} \text{ mg/cm}^3$	1,01
1	25,0 mg	$5,0 \times 10^{-2} \text{ mg/cm}^3$	0,80
2	25,0 mg	$5,0 \times 10^{-2} \text{ mg/cm}^3$	0,81
3	1,0 mg	$5,0 \times 10^{-2} \text{ mg/cm}^3$	0,79
2	25,0 mg	$2,5 \times 10^{-2} \text{ mg/cm}^3$	0,51
4	1,0 mg	$2,0 \times 10^{-2} \text{ mg/cm}^3$	0,42
10	10,0 mg	$2,0 \times 10^{-2} \text{ mg/cm}^3$	0,43
1	25,0 mg	$1,0 \times 10^{-2} \text{ mg/cm}^3$	0,25
3	1,0 mg	$1,0 \times 10^{-2} \text{ mg/cm}^3$	0,23
5	0,5 mg	$1,0 \times 10^{-2} \text{ mg/cm}^3$	0,24
2	25,0 mg	$5,0 \times 10^{-3} \text{ mg/cm}^3$	0,10
3	1,0 mg	$5,0 \times 10^{-3} \text{ mg/cm}^3$	0,11
1	25,0 mg	$5,0 \times 10^{-3} \text{ mg/cm}^3$	0,099
1	25,0 mg	$1,0 \times 10^{-3} \text{ mg/cm}^3$	0,025
2	25,0 mg	$1,0 \times 10^{-3} \text{ mg/cm}^3$	0,023
8	5,0 mg	$1,0 \times 10^{-3} \text{ mg/cm}^3$	0,021

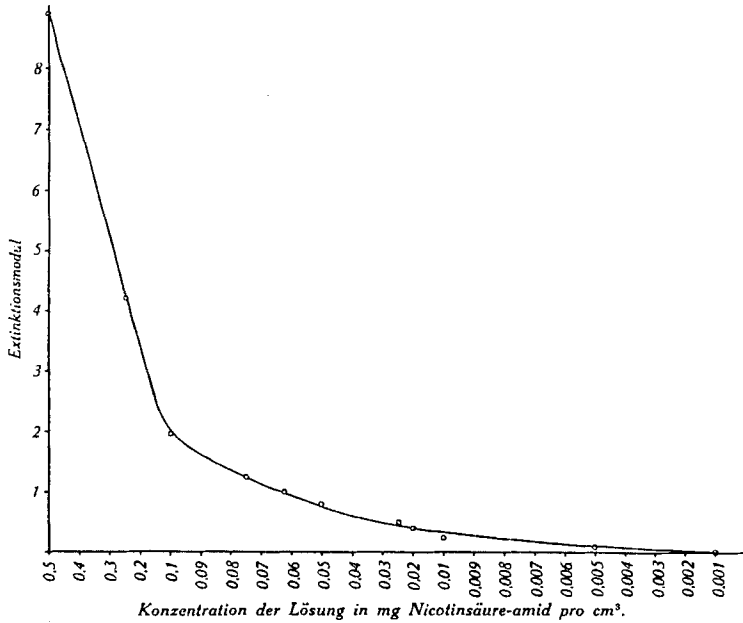


Fig. 1.

Aus vorstehender Eichkurve ergibt sich, dass den folgenden Extinktionsmoduln der untersuchten gelben Lösungen des Reaktionsproduktes aus Nicotinsäure-amid und Dinitrochlorbenzol die in Tabelle 2 folgenden Nicotinsäure-amidgehalte pro cm³ Flüssigkeit entsprechen.

Tabelle 2.

Extinktionsmodul	mg Nicotinsäure-amid in 1 cm ³ Lsg.	Extinktionsmodul	mg Nicotinsäure-amid in 1 cm ³ Lsg.
8,9	0,5	0,6	0,035
7	0,4	0,5	0,028
6	0,345	0,4	0,019
5	0,29	0,3	0,0145
4	0,24	0,2	0,0095
3	0,18	0,1	0,005
2	0,11	0,08	0,004
1	0,063	0,06	0,003
0,9	0,056	0,04	0,002
0,8	0,049	0,025	0,001
0,7	0,042		

Vergleichsweise wurden die gelbroten Reaktionslösungen auch im Tintometer von *Rosenheim-Schuster* kolorimetriert. Diese Messungen scheinen uns für eine quantitative Ermittlung des Nicotinsäure-amidgehaltes weniger geeignet, da die Rot-einheiten und Gelb-

einheiten, in denen die Messung erfolgt, bei Verdünnung der Reaktionslösungen nicht im selben Verhältnis abnehmen. Die Farbnuancen der Reaktionslösungen sind, mit anderen Worten, bei verschiedenen Verdünnungen nicht immer aus prozentual gleich viel Rot- und Gelbeinheiten zusammengesetzt. Zur Veranschaulichung des Gesagten führen wir in Tabelle 3 einige solche kolorimetrischen Messungen mit dem Tintometer auf und nachfolgend die daraus abgeleiteten „Eichkurven“ II:

Tabelle 3.

Schmelze Nr.	Konzentration der untersuchten Lösg. in mg Nicotinsäure-amid pro cm ³	Roteinheiten des Tintometers	Gelbeinheiten des Tintometers
2	$1,0 \times 10^{-1}$ mg/cm ³	28,7	9,0
3	$1,0 \times 10^{-1}$ mg/cm ³	29,4	9,0
7	$1,0 \times 10^{-1}$ mg/cm ³	29,9	9,0
2	$7,5 \times 10^{-2}$ mg/cm ³	28,1	8,2
3	$7,5 \times 10^{-2}$ mg/cm ³	28,7	8,4
2	$5,0 \times 10^{-2}$ mg/cm ³	20,1	10,1
7	$5,0 \times 10^{-2}$ mg/cm ³	19,8	10,6
3	$2,5 \times 10^{-2}$ mg/cm ³	9,0	18,7
2	$2,5 \times 10^{-2}$ mg/cm ³	8,7	21,3
7	$2,5 \times 10^{-2}$ mg/cm ³	9,4	20,0
2	$1,25 \times 10^{-2}$ mg/cm ³	6,0	10,4
7	$1,25 \times 10^{-2}$ mg/cm ³	5,8	10,0
3	$1,00 \times 10^{-2}$ mg/cm ³	4,0	6,0
5	$1,00 \times 10^{-2}$ mg/cm ³	3,7	5,6
2	$1,00 \times 10^{-2}$ mg/cm ³	4,2	5,1

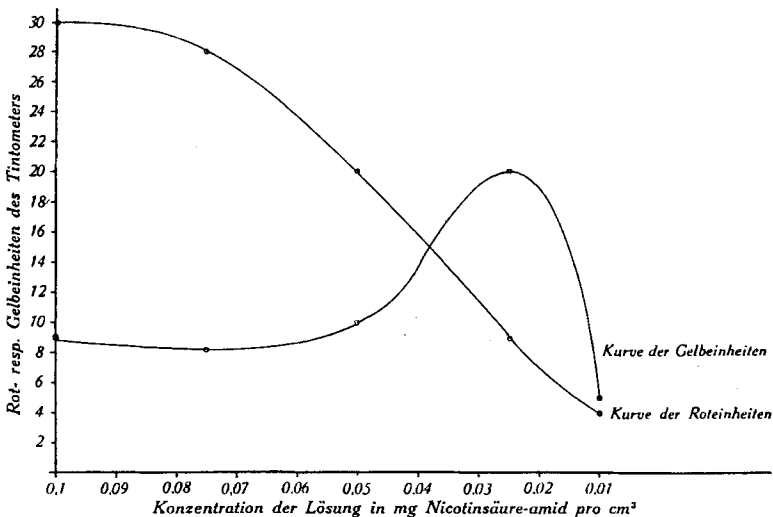


Fig. 2.

Nach der Aufstellung der beiden Eichkurven haben wir zunächst untersucht, ob es möglich ist, eine bestimmte Menge Nicotinsäureamid, die entweder mit der 10-fachen Quantität Zucker oder der 10-fachen Gewichtsmenge Gelatine vermischt worden war, mit unserer kolorimetrischen Methode wieder quantitativ zu erfassen. Zu diesem Zweck wurde die 10-fache Menge Zucker bzw. Gelatine mit Nicotinsäureamid in Wasser gelöst, die Flüssigkeit zur Trockene verdampft, der Rückstand getrocknet, pulverisiert und mit kochendem Benzol extrahiert. Nicotinsäureamid ist in heissem Benzol löslich. Den nach dem Verdampfen des Benzols zurückbleibenden Rückstand haben wir hierauf mit 4 Teilen 2,4-Dinitro-1-chlorbenzol in oben beschriebener Weise verschmolzen und weiter verarbeitet.

Hierbei konnten die in Tabelle 4 folgenden, kolorimetrischen Messungen (Leifstufenphotometer) aufgenommen werden.

Tabelle 4.

Angewandte mg Zucker	mg Nicotin- säureamid	Konzentration der untersuchten Lösg. mg Nicotinsäure- amid/cm ³	Extinktionsmodul	
			aus Versuch gefunden	Vergleichs- wert der Eichkurve
a) Aus dem Ansatz mit Zucker-Nicotinsäure-amidmischung:				
100 mg	10,0 mg	$5,0 \times 10^{-3}$ mg/cm ³	0,79	0,80
100 mg	10,0 mg	$1,0 \times 10^{-1}$ mg/cm ³	1,92	2,00
10 mg	1,0 mg	$1,0 \times 10^{-2}$ mg/cm ³	0,20	0,23
b) Aus dem Ansatz mit Gelatine-Nicotinsäure-amidmischung:				
Gelatine				
1000 mg	100,0 mg	$2,0 \times 10^{-2}$ mg/cm ³	0,39	0,42
100 mg	10,0 mg	$2,0 \times 10^{-2}$ mg/cm ³	0,40	0,42
50 mg	5,0 mg	$5,0 \times 10^{-2}$ mg/cm ³	0,80	0,80
10 mg	1,0 mg	$1,0 \times 10^{-2}$ mg/cm ³	0,21	0,23

Bestimmung von Nicotinsäure-amid in einem Cozymase-Präparat.

6 mg eines nicht ganz reinen Cozymasepräparates, für welches wir Herrn Prof. *H. v. Euler* zu Dank verpflichtet sind, wurden mit 10 cm³ 0.1-n. Kalilauge eine Stunde gekocht. Nach dem Erkalten neutralisierten wir die Lösung genau mit Salzsäure und verdampften sie im Vakuum zur Trockene. Den Rückstand extrahierten wir mehrmals mit kochendem Benzol, dampften die Benzolauszüge ein und verschmolzen den Rückstand mit Dinitro-chlorbenzol. Die weitere Verarbeitung geschah wie oben beschrieben.

Die Messung der Färbung am Leifophotometer ergab den Extinktionsmodul 0,381, was bei einer Gesamtflüssigkeit von 25 cm³ einem Gehalt von ca. 0,46 mg Nicotinsäure-amid entspricht. Wir fanden somit in diesem Cozymasepräparat mit unserer Methode ca. 7,5% Nicotinsäure-amidgehalt.

Bestimmung von Nicotinsäure-amid in Rindsleber.

500 g Rindsleber wurden fein gehackt, mit 2 Liter Wasser ausgekocht und die wässrigen Auszüge eingedampft. Von dem Trockenrückstand, der 22 g wog, haben wir 17 g eine Stunde mit 300 cm³ 0,1-n. Kalilauge erhitzt, hierauf die Flüssigkeit mit Salzsäure genau neutralisiert und im Vakuum zur Trockene gebracht. Den getrockneten Rückstand zogen wir wiederholt mit kochendem Benzol aus. Der nach dem Abdestillieren des Benzols verbleibende Rückstand wurde mit Dinitro-chlorbenzol in bekannter Weise verschmolzen und die Schmelze in oben beschriebener Weise aufgearbeitet und kolorimetriert.

Die Messung im Leifophotometer ergab den Extinktionsmodul 0,60, was einer Konzentration von 0,035 mg Nicotinsäure-amid pro cm³ entspricht. Da die gesamte wässrige Flüssigkeit des Reaktionsproduktes 50 cm³ betrug, berechnen sich für die angewandten 17 g Leberextrakt 1,75 mg Nicotinsäure-amid, oder 2,26 mg in 500 g Frischleber.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

62. Isolierung von *d*-Galaktose und *l*-Rhamnose aus dem Hydrolysat des spezifischen Polysaccharids von *Bact. dysenteriae* (*Shiga*)¹⁾

von W. Th. J. Morgan.

(31. III. 38.)

Durch ausgedehnte Arbeiten der letzten Jahrzehnte ist es bekannt geworden, dass für die immunologische Spezifität von vielen Bakterien-Antigenen ihr Gehalt an spezifischen Polysacchariden von grundlegender Bedeutung ist²⁾. Solche Polysaccharide spielen in diesen Fällen die Rolle von Haptenen, d. h. Bausteinen, die für die Spezifität des Vollantigens verantwortlich sind.

Auch für die glatten Stämme von *Bact. dysenteriae* (*Shiga*) ist ein ähnlicher Tatbestand durch frühere Arbeiten sichergestellt worden. Es lässt sich auch hier ein spez. Polysaccharid isolieren³⁾, das an sich nicht antigen wirksam ist, jedoch für die Spezifität des Vollantigens⁴⁾ verantwortlich ist.

Vorliegende Untersuchung befasst sich mit Versuchen zur Aufklärung der chemischen Zusammensetzung dieses Polysaccharids.

¹⁾ Diese Arbeit wurde mit Unterstützung der *Rockefeller Foundation* ausgeführt.

²⁾ Vgl. *K. Landsteiner*, *The Specificity of Serological Reactions*, Baltimore (1936).

³⁾ *W. Th. J. Morgan*, *Brit. J. Exptl. Path.*, **12**, 62 (1931), *Biochem. J.* **30**, 909 (1936).

⁴⁾ *W. Th. J. Morgan*, *Biochem. J.* **31**, 2003 (1937).