

In der Tat bestätigte der direkte Vergleich der beiden Basen und ihrer Salze ihre Identität. Damit ist der Name „Kamassin“ aus der Literatur zu streichen.

Auch das in der Fig. 1 wiedergegebene IR.-Spektrum<sup>1)</sup>, das für Quebrachamin beiderlei Herkunft praktisch identisch ist, zeigt die typische Iminobande (2,87  $\mu$ ) und die für viele Indole charakteristische Abwesenheit von Banden im Gebiet 6,0–6,6  $\mu$ <sup>2)</sup>. Dies ist ein weiterer Beweis dafür, dass Quebrachamin ein Alkaloid der Indolklasse ist, wie auch die Farbenreaktionen (*Hopkins-Cole*, *Ehrlich*) und das UV.-Spektrum<sup>3)</sup> bereits vermuten liessen.

Über den genaueren Bau des Quebrachamins soll in Kürze berichtet werden<sup>4)</sup>. Die zur Strukturermittlung verwandten Methoden lehnen sich an die bereits bei Modellverbindungen angewandten spezifischen Oxydations-, Umlagerungs- und Isomerisierungsreaktionen an<sup>5)</sup>.

Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel und  
National Heart Institute, National Institutes of Health,  
Washington 14, D.C.

## 15. Quantitative Zuckerbestimmung mit 3,5-Dinitrosalicylsäure und Phenol

von E. Borel, F. Hostettler und H. Deuel.

(29. XI. 51.)

Zur quantitativen Bestimmung von Zuckern, die papierchromatographisch getrennt<sup>6)</sup> und mit Wasser aus dem Filtrierpapier<sup>7)</sup> extrahiert werden, ist eine empfindliche Methode erforderlich. Dazu wurden Titrationen mit dem Kupferreagens nach *Somogyi*<sup>7)</sup>, mit Perjodsäure<sup>8)</sup> oder mit Natriumhypoiodit nach *Willstätter & Schudel*<sup>9)</sup> benutzt. Kürzlich wurde von einer empfindlichen kolorimetrischen Bestimmung mit Hilfe von *Fehling*'scher Lösung und Arsenmolybdat-Reagens<sup>10)</sup> berichtet. Die kolorimetrische Me-

<sup>1)</sup> Das Spektrum wurde in Chloroform-Lösung mit einem selbstregistrierenden Spektrophotometer (*Perkin-Elmer*, Modell 21) aufgenommen, unter Verwendung folgender Justierung: „Resolution“ 4; „Response“ 1; „Gain“ 5,8; „Speed“ 4/3; „Suppression“ 0.

<sup>2)</sup> Vgl. *B. Witkop*, *Am. Soc.* **72**, 633 (1950).

<sup>3)</sup> *B. Witkop*, *Am. Soc.* **71**, 2559 (1949).

<sup>4)</sup> *B. Witkop*, *ibid.*, in Vorbereitung.

<sup>5)</sup> *B. Witkop & J. B. Patrick*, *Exper.* **6**, 183, 461 (1950).

<sup>6)</sup> *S. M. Partridge*, *Nature* **158**, 270 (1946); *Biochem. J.* **42**, 238 (1948); in *R. T. Williams & R. L. M. Syngé*, *Partition Chromatography*, Cambridge 1949, S. 52; *M. A. Jermyn & F. A. Isherwood*, *Biochem. J.* **44**, 402 (1949); *L. Boggs et al.*, *Nature* **166**, 520 (1950); *F. Cramer*, *Angew. Ch.* **62**, 73 (1950); *Papierchromatographie*, S. 45, Weinheim 1952.

<sup>7)</sup> *A. E. Flood, E. L. Hirst & J. K. N. Jones*, *Nature* **160**, 86 (1947); *Soc.* **1948**, 1679.

<sup>8)</sup> *E. L. Hirst & J. K. N. Jones*, *Soc.* **1949**, 1659; *F. Weygand & H. Hofmann*, *B.* **83**, 405 (1950).

<sup>9)</sup> *J. R. Hawthorne*, *Nature* **160**, 714 (1947).

<sup>10)</sup> *J. Sundman, J. Saarnio & C. Gustafsson*, *Paper and Timber B.* **1951**, Nr. 4a, 115.

thode mit 3,5-Dinitrosalicylsäure nach *Sumner*<sup>1)</sup> eignet sich nur für mehr als 0,4 mg Zucker<sup>2)</sup>. Die Brauchbarkeit von 3,5-Dinitrosalicylsäure-Phenol-Reagens, das ebenfalls von *Sumner*<sup>3)</sup> angegeben und wiederholt zur Zuckerbestimmung<sup>4)</sup> verwendet wurde, soll im folgenden eingehender geprüft werden.

Zunächst wurde die Extinktion des Farbstoffes, der sich bei Reaktion zwischen D-Xylose bzw. D-Galakturonsäure und dem 3,5-Dinitrosalicylsäure-Phenol-Reagens bildet, ermittelt (Fig. 1). Das Absorptionsmaximum liegt bei 500 m $\mu$  und ist gegenüber der *Sumner*'schen Reaktion ohne Phenol<sup>5)</sup> um 15–20 m $\mu$  nach längeren Wellenlängen verschoben. Dies ermöglicht eine Messung am Absorptionsmaximum des Farbstoffes, da die alkalische 3,5-Dinitrosalicylsäure selbst bei 500 m $\mu$  nur noch eine geringe Absorption aufweist. Bei Reaktion mit verschiedenen Zuckern wird wahrscheinlich der gleiche, unbekannte Farbstoff gebildet.

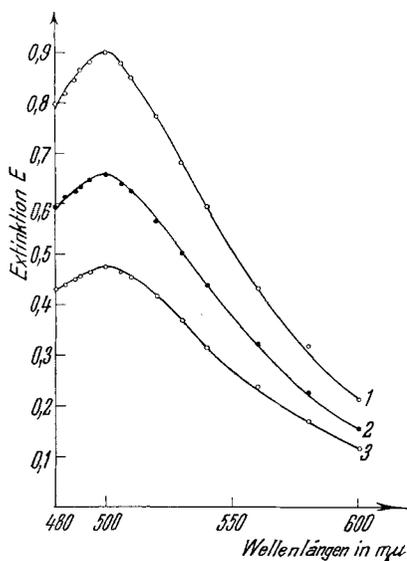


Fig. 1.

Extinktionen mit D-Xylose und D-Galakturonsäure. 1: 0,5 mg D-Xylose; 2: 0,5 mg D-Galakturonsäure-hydrat; 3: 0,4 mg D-Galakturonsäure-hydrat.

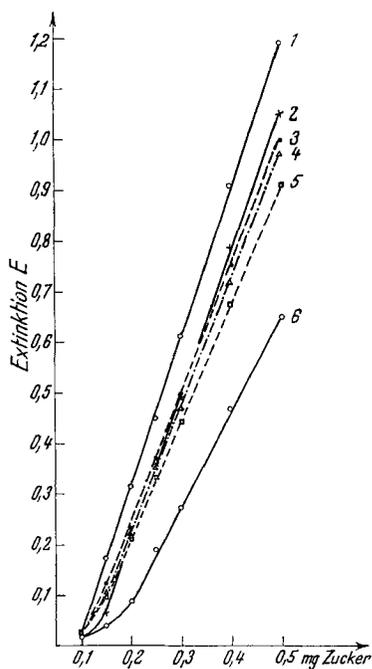


Fig. 2.

Konzentrations-Extinktionskurven mit verschiedenen Zuckern bei 500 m $\mu$  (Mittelwerte aus je 5 Messungen). 1: D-Glucose; 2: L-Arabinose; 3: D-Mannose; 4: D-Galaktose; 5: D-Xylose; 6: D-Galakturonsäure-hydrat.

<sup>1)</sup> *J. B. Sumner & V. A. Graham*, *J. Biol. Chem.* **47**, 5 (1921); *J. B. Sumner*, *ibid.* **62**, 287 (1924). <sup>2)</sup> *F. Hostettler, E. Borel & H. Deuel*, *Helv.* **34**, 2132 (1951).

<sup>3)</sup> *J. B. Sumner*, *J. Biol. Chem.* **65**, 393 (1925).

<sup>4)</sup> *J. B. Sumner & S. F. Howell*, *J. Biol. Chem.* **108**, 51 (1935); *F. G. Edson & C. F. Poe*, *J. Assoc. Off. Agr. Chem.* **31**, 769 (1948); *G. N. Smith & C. Stocker*, *Arch. Biochem.* **25**, 95 (1949).

<sup>5)</sup> *F. Hostettler, E. Borel & H. Deuel*, *loc. cit.*

Für einige Zucker wurden mit dem 3,5-Dinitrosalicylsäure-Phenol-Reagens bei 500  $m\mu$  Konzentrations-Extinktionskurven aufgenommen (Fig. 2). Man erhält für weite Konzentrationsbereiche recht steile Geraden, die eine sehr genaue quantitative Bestimmung von 0,1–0,5 mg Zucker gestatten. Geordnet nach dem Reduktionsvermögen zeigen die Zucker hier eine etwas andere Reihenfolge als bei der Reaktion mit 3,5-Dinitrosalicylsäure ohne Phenol.

Der mit D-Galakturonsäure gebildete Farbstoff ist bei Zimmertemperatur mindestens 3 Std. stabil (Tab. 1). Schon von *Smith & Stocker*<sup>1)</sup> wurde Konstanz der Extinktion während 2 Std. festgestellt.

**Tabelle 1.**

Stabilität der Farbstofflösung aus Galakturonsäure-hydrat.  
Extinktion bei 500  $m\mu$ .

| Zeit in Minuten     | 17    | 47    | 77    | 107   | 167   | 227   |
|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Uronsäure 0,5 mg .. | 0,660 | 0,657 | 0,658 | 0,665 | 0,655 | 0,648 |
| Uronsäure 0,4 mg .. | 0,472 | 0,473 | 0,472 | 0,471 | 0,470 | 0,462 |
| Uronsäure 0,3 mg .. | 0,302 | 0,302 | 0,300 | 0,298 | 0,295 | 0,293 |

Es wurden nun quantitative Analysen der einzelnen Komponenten von künstlichen Zuckermischungen vorgenommen. Dazu wurden die Zucker papierchromatographisch getrennt, aus den ausgeschnittenen Filtrierpapierstückchen extrahiert und mit dem 3,5-Dinitrosalicylsäure-Phenol-Reagens kolorimetrisch bestimmt (Tab. 2). Es

**Tabelle 2.**

Quantitative Bestimmungen an Zuckermischungen.  
Angaben in mg.

| Mischung I           | D-Glucose                | L-Arabinose | D-Xylose | Total (ber.) |
|----------------------|--------------------------|-------------|----------|--------------|
| Vorgelegt . . . . .  | 0,333                    | 0,333       | 0,333    | 0,999        |
| Einzelbestimmung 1   | 0,355                    | 0,360       | 0,325    | 1,040        |
| 2                    | 0,360                    | 0,315       | 0,305    | 0,980        |
| 3                    | 0,295                    | 0,300       | 0,325    | 0,920        |
| 4                    | 0,290                    | 0,280       | 0,360    | 0,930        |
| 5                    | 0,240                    | 0,360       | 0,390    | 0,990        |
| 6                    | 0,335                    | 0,330       | 0,365    | 1,030        |
| Mittel der 6 Best. . | 0,313                    | 0,324       | 0,345    | 0,982        |
| Mischung II          | D-Galakturonsäure-hydrat | D-Mannose   | D-Xylose | Total (ber.) |
| Vorgelegt . . . . .  | 0,333                    | 0,333       | 0,333    | 0,999        |
| Mittel von 6 Best. . | 0,309                    | 0,343       | 0,323    | 0,975        |

<sup>1)</sup> G. N. Smith & C. Stocker, Arch. Biochem. **25**, 95 (1949).

werden brauchbare Resultate erhalten, wenn man die Mittelwerte aus einigen Parallelbestimmungen berechnet. Die Genauigkeit dieser Methode entspricht den mit titrimetrischen Methoden<sup>1)</sup> erhaltenen Ergebnissen.

In gleicher Weise wurden die Zucker im Hydrolysat von Konjakumannan untersucht (Tab. 3). Bei der Hydrolyse mit  $H_2SO_4$  wurde ein Verhältnis von D-Glucose zu D-Mannose von 1:1,58 und mit HCl von 1:1,59 gefunden; in der Literatur<sup>2)</sup> wird ein Verhältnis von 1:2 angegeben.

**Tabelle 3.**

Quantitative Bestimmungen an Hydrolysaten von Konjakumannan.  
Angaben in mg.

|   | D-Glucose | D-Mannose | Total (ber.) |
|---|-----------|-----------|--------------|
| Je 0,591 mg Konjakumannan mit $H_2SO_4$ hydrolysiert: |           |           |              |
| Mittel von 3 Best. . .                                | 0,222     | 0,352     | 0,573        |
| Je 0,582 mg Konjakumannan mit HCl hydrolysiert:       |           |           |              |
| Mittel von 4 Best. . .                                | 0,215     | 0,336     | 0,551        |

### Experimenteller Teil.

*Herstellung von 3,5-Dinitrosalicylsäure-Phenol-Reagens<sup>3)</sup>*: 10 g kristallines Phenol und 22 cm<sup>3</sup> 10-proz. Natronlauge werden in Wasser gelöst und auf 100 cm<sup>3</sup> aufgefüllt. 6,9 g Natriumhydrogensulfit werden in 69 cm<sup>3</sup> der alkalischen Phenollösung aufgelöst. 255 g *Seignette*-Salz löst man in 300 cm<sup>3</sup> 4,5-proz. Natronlauge und versetzt mit 880 cm<sup>3</sup> 1-proz. 3,5-Dinitrosalicylsäurelösung. Die hydrogensulfithaltige, alkalische Phenollösung wird darauf zur 3,5-Dinitrosalicylsäurelösung gegeben. Diese Reagenslösung wird zwei Tage stehengelassen, filtriert und im Dunkeln aufbewahrt. Das Reagens bleibt mehrere Monate beständig.

*Kolorimetrische Bestimmung*: 3—4 cm<sup>3</sup> Zuckerlösung (mit 0,1—0,5 mg Zucker) werden in einem Reagensglas mit 3 cm<sup>3</sup> Reagens, 2 cm<sup>3</sup> 6-n. NaOH und 1 cm<sup>3</sup> *Seignette*-Salzlösung (mit 0,5 g *Seignette*-Salz) versetzt. Es wird genau auf 10 cm<sup>3</sup> mit Wasser aufgefüllt und durchgeschüttelt. Die Lösung wird genau 10 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt und anschliessend mit fliessendem, kaltem Wasser abgekühlt. Die kolorimetrische Bestimmung erfolgt etwa 15 Min. später im *Beckman*-Spektrophotometer Modell DU (meist bei 500 m $\mu$ ). Als Nulllösungen dienen gleichbehandelte, zuckerfreie Lösungen. Aus den Extinktionsdifferenzen zwischen Nulllösung und Farbstofflösung ergeben sich mit Hilfe der Konzentrations-Extinktionskurven (Fig. 2) die Zuckermengen.

*Papierchromatographische Zuckertrennung*: *Whatman*-Papier Nr. 1 wird in Streifen von 15 cm Breite und 55 cm Länge geschnitten. Am unteren Ende der Papierstreifen

<sup>1)</sup> A. E. Flood, E. L. Hirst & J. K. N. Jones, Soc. 1948, 1679; E. L. Hirst & J. K. N. Jones, Soc. 1949, 1659.

<sup>2)</sup> K. Nishida & H. Hashima, ref. C. 1931, I, 295; T. Otuki, ref. in W. W. Pigman & R. M. Goepf, Chemistry of the Carbohydrates, S. 616, New York 1948.

<sup>3)</sup> J. B. Sumner, J. Biol. Chem. 65, 393 (1925).

werden Zacken von 2 cm Breite und 1,5 cm Tiefe angebracht.  $\frac{1}{3}$  jedes Streifens wird als Teststreifen verwendet. Auf den restlichen  $\frac{2}{3}$  werden, auf 3 Flecken verteilt, genau je 0,1 cm<sup>3</sup> der 1-proz. Zuckerlösung mit einer Spezialmikropipette<sup>1)</sup> im Warmluftstrom aufgetropft. Die aufgetragenen, zuckerhaltigen Flecken haben Durchmesser von weniger als 1 cm. Die Chromatogramme werden 95–140 Std. bei 20° mit einem Propionsäure-Butanol-Wassergemisch laufen gelassen, das das ganze Papier durchläuft und unten abtropft. (Herstellung des Lösungsmittels: 100 g Propionsäure, 400 cm<sup>3</sup> Butanol und 500 cm<sup>3</sup> Wasser werden gut durchgemischt und drei Tage bei 20° stehengelassen. Die untere, wässrige Schicht wird abgetrennt und auf den Boden des Chromatographiegefäßes gegeben. Die obere Schicht wird als Lösungsmittel verwendet<sup>2)</sup>.) Die Papierstreifen werden dann 10 Min. bei 105° im ventilierten Trockenschrank getrocknet. Der Teststreifen wird hierauf abgeschnitten, mit Phtalsäure-Anilin<sup>3)</sup> besprüht und 5 Min. bei 105° im Trockenschrank erhitzt. Hexosen und Uronsäuren können als braune, Pentosen als rotbraune Flecken identifiziert werden. Auf dem restlichen Streifen werden nun die den Zuckerflecken entsprechenden Stellen ausgeschnitten und einzeln in einen vereinfachten Extraktionsapparat nach Wasitzky<sup>4)</sup> (Fig. 3) gegeben. Dieser besteht aus einem kalibrierten Reaktionsgefäß R mit Marken bei 5 und 10 cm<sup>3</sup>. Am Wasserkühler K ist am unteren Ende ein Glasstäbchen mit einer hakenförmigen Spitze H angeschmolzen. Das zu extrahierende Filtrierpapier F wird zusammengerollt und am Haken derart befestigt, dass es die Glaswand nicht berührt. Zur Extraktion wird der Apparat mit 4,5 cm<sup>3</sup> Wasser beschickt und 30 Min. im Ölbad von 120° erhitzt. Nach Abkühlung werden 3,5-Dinitro-salicylsäure-Phenol-Reagens, NaOH und *Seignette*-Salzlösung, wie beschrieben, direkt zur im Reaktionsgefäß befindlichen Zuckerlösung zugesetzt. Mit Wasser wird genau bis zur 10-cm<sup>3</sup>-Marke aufgefüllt. Die kolorimetrische Bestimmung erfolgt dann nach obiger Vorschrift. Als Nulllösung dient ein gleichbehandelter Extrakt aus zuckerfreiem Filtrierpapier.

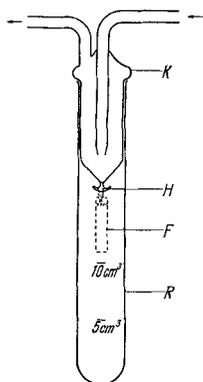


Fig. 3.

**Herstellung der Hydrolysate von Konjakumannan:** Konjakumannan<sup>5)</sup> wurde mit HCl-Alkohol gewaschen, in Wasser gelöst und mit Alkohol gefällt. Nach einer weiteren Umfällung wurde bis zur Cl<sup>-</sup>-Freiheit mit verd. Alkohol gewaschen. 0,2000 g gereinigtes Konjakumannan wurden mit 30 cm<sup>3</sup> 4-proz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (bzw. 20 cm<sup>3</sup> 4-proz. HCl) 72 Std. (bzw. 24 Std.) bei 100° im Wasserbad erhitzt. Ein unhydrolysierbarer Rückstand von 0,0028 g (bzw. 0,0057 g) wurde abfiltriert. Zur vollständigen Entfernung der Mineralsäure wurde das Hydrolysat durch eine Säule von Anionenaustauscher Amberlite IR—4B perkoliert, dann eingedampft und auf genau 20 cm<sup>3</sup> mit Wasser aufgefüllt. Zur papierchromatographischen Trennung wurden je 0,6 cm<sup>3</sup> dieser Lösungen entsprechend 0,591 mg gereinigtem Konjakumannan (bzw. 0,582 mg) verwendet. Es wurden nur D-Glucose und D-Mannose nachgewiesen und nach obiger Methode kolorimetrisch bestimmt.

Diese Untersuchung wurde durch Mittel aus den *Arbeitsbeschaffungskrediten des Bundes* ermöglicht, für die wir bestens danken.

<sup>1)</sup> Mikrojektionspritze der Firma *Burroughs, Wellcome & Co.*, London.

<sup>2)</sup> *L. Boggs et al.*, *Nature* **166**, 520 (1950).

<sup>3)</sup> *S. M. Partridge*, *Nature* **164**, 443 (1949).

<sup>4)</sup> *A. A. Morton*, *Laboratory Technique in Organic Chemistry*, S. 202, New York 1938; s. auch *A. E. Flood, E. L. Hirst & J. K. N. Jones*, *Soc.* **1948**, 1679; *F. Weygand & H. Hofmann*, *B.* **83**, 405 (1950); *F. H. Pollard & J. F. W. McOmie*, *Endeavour* **10**, 213 (1951).

<sup>5)</sup> Wir danken Herrn Dr. *G. H. Kraay*, Rubberstichting, Delft, für die Überlassung des Präparates.

### Zusammenfassung.

Zuckermengen von 0,1–0,5 mg lassen sich mit dem phenolhaltigen 3,5-Dinitrosalicylsäure-Reagens nach *Sumner* quantitativ kolorimetrisch bestimmen. Am geeignetsten ist die Messung bei 500 m $\mu$ , dem Absorptionsmaximum des gebildeten Farbstoffes. Die einzelnen Zucker von Zuckermischungen oder Polysaccharidhydrolysaten können so nach papierchromatographischer Trennung mit einer Genauigkeit von etwa  $\pm 5\%$  bestimmt werden. Mit dieser Methode wurden im Konjakumannan D-Glucose und D-Mannose im Verhältnis 1:1,6 gefunden.

Agrikulturchemisches Institut  
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

## 16. Qualitative und quantitative Bestimmungen papierchromatographisch getrennter Metallionen

von H. Seiler, E. Sorkin und H. Erlenmeyer.

(30. XI. 51.)

In vorangegangenen Mitteilungen wurde über die Möglichkeit einer papierchromatographischen Trennung von Cu<sup>++</sup> und Co<sup>++</sup><sup>1)</sup> sowie der Alkali- und Erdalkali-Ionen<sup>2)</sup> und über die Sichtbarmachung der getrennten Ionen in Form farbiger Violurate berichtet.

Da die verschiedenen Metallviolurate sich deutlich in der Farbe unterscheiden, war damit eine sehr einfache Methode für eine *qualitative* Prüfung auf die genannten und andere Ionen gegeben.

Um eine derartige Untersuchung praktisch durchzuführen ist es notwendig, wenn die Metalle als Salze der Salzsäure, Schwefelsäure oder einer anderen starken Säure vorliegen, diese zuerst mit Hilfe eines Ionenaustauschers in die Acetate zu verwandeln.

Als Austauscher fand ein Amberlite 410 in seiner Acetatform Verwendung<sup>3)</sup>. Die Austauschgeschwindigkeit, d. h. die Zeit bis zum Einstellen des Gleichgewichts ist relativ kurz. Die Säulenhöhe war in unserem Fall 15 cm bei 1 cm Durchmesser. Die Durchlaufgeschwindigkeit wird so reguliert, dass ca. 3 cm<sup>3</sup> per Min. durchlaufen. Das Filtrat wird im Vakuum bis zur Trockene eingedampft, mit möglichst wenig Wasser aufgenommen und die so gewonnene Lösung nach dem angegebenen Verfahren untersucht. Das mit Violursäure behandelte Chromatogramm wird bei 60° getrocknet.

<sup>1)</sup> H. v. Hahn, E. Sorkin & H. Erlenmeyer, *Exper.* **7**, 258 (1951).

<sup>2)</sup> H. Erlenmeyer, H. v. Hahn & E. Sorkin, *Helv.* **34**, 1419 (1951).

<sup>3)</sup> Liegen zu konzentrierte Lösungen (über 0,05-n.) vor, so ist es ratsam, diese zu verdünnen.