

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.

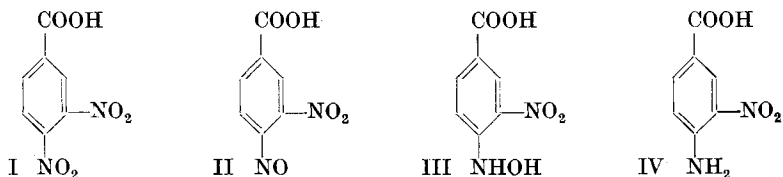
## 98. Quantitative Zuckerbestimmung mit 3,4-Dinitrobenzoesäure<sup>1)</sup>

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 worden<sup>2)</sup>. In der vorliegenden Arbeit wird die Verwendbarkeit von 3,4-Dinitrobenzoesäure studiert.

3,4-Dinitrobenzoesäure (I) wurde nach einer modifizierten Vorschrift von *Weygand & Hofmann*<sup>3)</sup> 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-amino-benzoesäure (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.

<sup>1)</sup> Vgl. Diss. *E. Borel*, ETH, 1953.

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

<sup>3)</sup> *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.

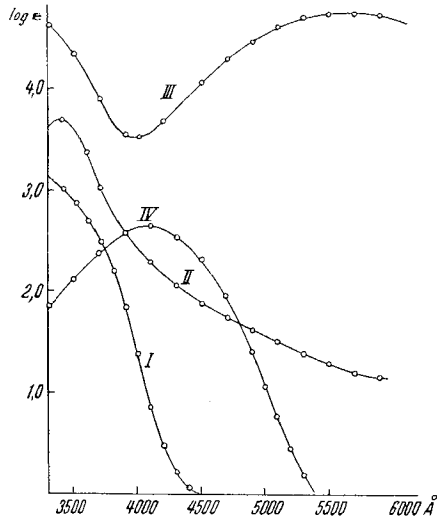


Fig. 1.

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-Dinitrobenzol<sup>1)</sup>. 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

<sup>1)</sup> R. Kuhn & F. Weygand, B. **69**, 1969 (1936).

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

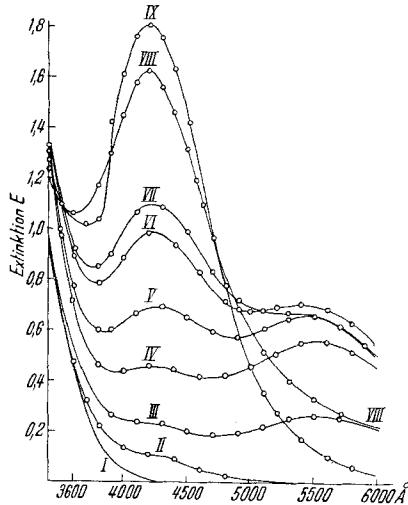


Fig. 2.

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

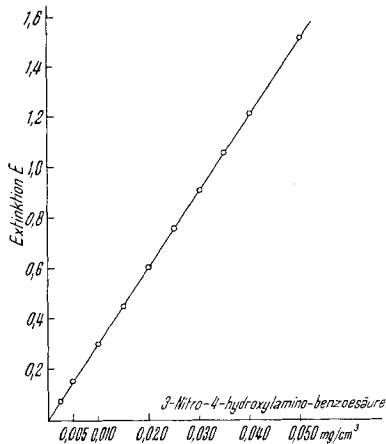


Fig. 3.

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.

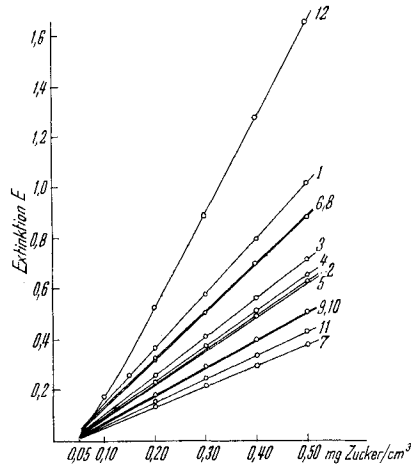


Fig. 4.

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

( ) = Kochdauer in Sek.

1. D-Xylose (90)	7. L-Rhamnose, H <sub>2</sub> O (150)
2. L-Arabinose (90)	8. D-Glucuronsäure (150)
3. D-Glucose (150)	9. D-Galakturonsäure, H <sub>2</sub> O (150)
4. D-Galaktose (150)	10. Maltose, H <sub>2</sub> O (150)
5. D-Mannose (150)	11. Lactose, H <sub>2</sub> O (150)
6. D-Fructose (90)	12. Ascorbinsäure (600; 20 <sup>0</sup> )

Die Mengen der gebildeten 3-Nitro-4-hydroxylamino-benzoesäure 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 papierchromatographischen Trennung quantitativ bestimmt. Im Polysaccharid aus der Knolle von *Amorphophallus Konjaku*<sup>1)</sup> wurden D-Glucose und D-Mannose im Verhältnis von 1:1,6 gefunden, im Polysaccharid aus dem Samen von *Trigonella Foenum graecum*<sup>2)</sup> D-Galaktose und D-Mannose im Verhältnis von 1:1 und im Polysaccharid aus dem Samen

<sup>1)</sup> 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).

<sup>2)</sup> 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*<sup>1)</sup> 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 <sub>2</sub> O . . . . .	0,023	0,0211
D-Glucuronsäure . . . . .	0,055	0,0488
D-Galakturonsäure, H <sub>2</sub> O . . . . .	0,034	0,0364
Maltose, H <sub>2</sub> O . . . . .	0,034	0,0618
Lactose, H <sub>2</sub> O . . . . .	0,029	0,0527
Ascorbinsäure . . . . .	0,109	0,0969

### Experimenteller Teil.

3,4-Dinitrobenzoesäure<sup>2)</sup>: 100 g p-Toluidin wurden in 170 cm<sup>3</sup> 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 cm<sup>3</sup> Salpetersäure (d = 1,4) und 47 cm<sup>3</sup> konz. Schwefelsäure eingetragen. Durch Kühlung wurde die Temperatur auf 30° bis 40° gehalten. Nach 15 Min. wurde die Lösung in 700 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O 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 cm<sup>3</sup> heissem Alkohol gelöst, mit einer Lösung von 41 g KOH in 48 cm<sup>3</sup> 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 cm<sup>3</sup> 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

<sup>1)</sup> 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).

<sup>2)</sup> 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 cm<sup>3</sup> konz. Schwefelsäure bei 30,0° gelöst<sup>1)</sup>. 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 CO<sub>2</sub> und 0,557 mg H<sub>2</sub>O

2,977 mg Subst. gaben 0,350 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (17°, 726 mm)

C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>N<sub>2</sub> Ber. C 39,63 H 1,90 N 13,21%

Gef. ,, 39,69 ,, 1,83 ,, 13,22%

3-Nitro-4-amino-benzoesäure<sup>2)</sup>: 100 g p-Amino-benzoesäure wurden mit 70 g trockenem Natriumacetat in 300 cm<sup>3</sup> 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 cm<sup>3</sup> 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 abgenutscht 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 cm<sup>3</sup> 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 CO<sub>2</sub> und 1,396 mg H<sub>2</sub>O

4,425 mg Subst. gaben 0,610 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (21°, 729 mm)

C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub> 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 cm<sup>3</sup> 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 CO<sub>2</sub> und 0,871 mg H<sub>2</sub>O

3,911 mg Subst. gaben 0,497 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (20,0°, 725 mm)

C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>O<sub>5</sub>N<sub>2</sub> 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 cm<sup>3</sup> Aceton und 25 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst. Nach 10 Min. wurde die gelb-orange Lösung mit 600 cm<sup>3</sup> Wasser verdünnt und viermal mit 150 cm<sup>3</sup> Essigester ausgeschüttelt. Die Essigesterazüge wurden mit 100 cm<sup>3</sup> Wasser gewaschen, und das Waschwasser wurde mit Essigester ausgeschüttelt. Die Essigesterazüge wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und dann im Vakuum ein-

<sup>1)</sup> H. Goldstein & R. Voegeli, Helv. 26, 475 (1943).

<sup>2)</sup> 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 CO<sub>2</sub> und 1,132 mg H<sub>2</sub>O

4,953 mg Subst. gaben 0,623 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (21,0°, 740 mm)

C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>N<sub>2</sub> 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 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pro l unter Erhitzung im siedenden Wasserbad.

Die Absorptionsmessungen erfolgten im *Beckman*-Spektrophotometer Modell DU bei 18° mit 3,18 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 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, ausgeführt<sup>1)</sup>. Die Zucker wurden jedoch aus dem Papierchromatogramm in einem verkleinerten Extraktionsapparat nach *Wasitzky* mit 1 cm<sup>3</sup> 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 Eiweissen<sup>2)</sup> 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 cm<sup>3</sup> 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 ± 5% bestimmt werden.

Agrikulturchemisches Institut  
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

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

<sup>2)</sup> *M. G. Sevag, Bioch. Z. 237, 419 (1934).*