

Über die Einwirkung von p -Bromphenylhydrazin auf Glukuron

von

G. Goldschmiedt, w. M. k. Akad., und Ernst Zerner.

(Aus dem II. chemischen Universitätslaboratorium in Wien.)

(Vorgelegt in der Sitzung am 11. Juli 1912.)

Als wir vor etwa zwei Jahren feststellten, daß das Scutellarin¹ eine gepaarte Glukuronsäure sei, haben wir uns unter anderem zur Identifizierung dieser Säure der von Neuberg² hierzu empfohlenen p -Bromphenylhydrazinverbindung bedient. Schon damals haben wir hervorgehoben, daß die Erscheinungen, die wir, nach Neuberg's Vorschrift arbeitend, bei der Darstellung dieser Verbindung zu beobachten Gelegenheit hatten, durchaus den von diesem Forscher geschilderten entsprachen, wir fügten aber hinzu, daß die Substanz, die wir erhielten, stets aschenhaltig gewesen sei.

Dieser Umstand sowie auch jener, daß die Natur der Verbindung keineswegs aufgeklärt worden ist, veranlaßte uns, uns nochmals mit derselben zu beschäftigen.

Neuberg hat auf Grund seiner Analysen, die zur empirischen Formel $C_{12}H_{17}O_7N_2Br$ führten, drei Strukturmöglichkeiten in Betracht gezogen, von welchen wir meinen, daß sie — alle drei — wenig Wahrscheinlichkeit für sich in Anspruch nehmen können, und zwar:

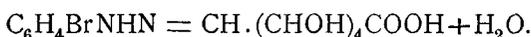
¹ M., 31 (1910).

² Ber., 32, 2895 ff. (1899).

1. Glukuronsaures *p*-Bromphenylhydrazin:



2. Glukuronsäure-*p*-Bromphenylhydrazon + H₂O:



3. Glukuronsäure-*p*-Bromphenylhydrazid + H₂O:



1. Es wäre zu erwarten, daß, wäre die Substanz glukuronsaures *p*-Bromphenylhydrazin, sie infolge ihrer Schwerlöslichkeit sofort zur Ausscheidung komme, sobald die Lösungen der Komponenten gemischt werden; daß dies nicht geschieht, geht aus Neuberg's Darstellung hervor und wir haben uns auch selbst oft davon überzeugt; auch würde ein solches Salz durch Barytwasser gewiß zerlegt werden, nach Neuberg's eigener Beobachtung wird es von diesem Reagens »beim Kochen wenig verändert«.

2. Von dem Glukuronsäure-*p*-Bromphenylhydrazon + H₂O wäre wohl anzunehmen, daß es, wie das zuerst von Giemsa¹ beschriebene Glukuron-*p*-Bromphenylhydrazon, was später Neuberg² bestätigte, farblos sein müßte. Auch ist der für die Übereinstimmung mit der Formel erforderliche Krystallwassergehalt analytisch nicht festgestellt worden.

3. Glukuronsäure-*p*-Bromphenylhydrazid + H₂O; die Bildung eines solchen in heißer, wässriger Lösung von so geringer Konzentration ist im höchsten Grade unwahrscheinlich;³ der negative Ausfall der Bülow'schen Reaktion würde

¹ B., 33, 2998 (1900).

² B., 33, 3319 (1900).

³ In einer unter meiner Leitung ausgeführten Untersuchung hat H. Mithrath (M., 29, 1908) gezeigt, daß die Acetylierung des Phenylhydrazins nach dreistündiger Erwärmungsdauer auf dem Wasserbad in geringer Menge (8·9% der theoretischen Ausbeute) noch erreicht wird, wenn die Essigsäure 7% und in der dem Phenylhydrazin äquivalenten Menge vorhanden ist. Dies entspricht einer rund 1·1-normalen Essigsäure. Die Konzentration der Glukuronsäure bei der von Neuberg empfohlenen Darstellungsweise berechnet sich 0·0455-normal, wobei das für die Lösung des *p*-Bromphenylhydrazinchlorhydrats und Natriumacetats erforderliche Wasser in die Rechnung nicht einbezogen worden ist.

nicht unbedingt gegen die Struktur eines Hydrazids, ebenso wenig aber ein positiver unbedingt für dieselbe sprechen. Die von Neuberg beobachtete Färbung von fuchsinschwefeliger Säure scheint uns keine strenge Beweiskraft zu besitzen. Der Wassergehalt des Hydrazids, welcher angenommen werden mußte, um eine Übereinstimmung mit den Analysen herzustellen, ist analytisch nicht nachgewiesen worden.

Wir haben eine sehr große Zahl von Versuchen ausgeführt, um die von Neuberg beschriebene *p*-Bromphenylhydrazinverbindung der Glukuronsäure zu erhalten und wollen gleich voreilend eingestehen, daß es uns weder bei Einhaltung der Neuberg'schen Vorschrift, noch unter sehr mannigfaltig variierten Versuchsbedingungen je gelungen ist. Wir konnten stets, wenn wir mit Salzen der Glukuronsäure oder auch mit Lösungen des Glukurons arbeiteten, dann aber mit salzsaurem *p*-Bromphenylhydrazin und Natriumacetat, Fällungen beobachten, die in ihrem Äußeren der Neuberg'schen Beschreibung entsprachen; sobald aber die Lösungen, aus welchen die Verbindung sich ausscheiden sollte, keinerlei Metallionen enthielten, bildeten sich in absolutem Alkohol leicht lösliche dunkelbraune Schmierer, die nur minimale Spuren eines hellgelben, kristallinischen, schwer löslichen Niederschlages zurückließen, welcher stets Asche hinterließ, dessen Bildung daher auf kleine Verunreinigungen eines der Ausgangsmaterialien zurückgeführt werden mußte. Die Vermutung, es könnte Glaslösung die Ursache sein, dürfte nicht zutreffen, da die Erscheinung auch eintrat und schätzungsweise in gleichem Maße, als wir im Quarzkolben arbeiteten. Schließlich fanden wir, daß das käufliche *p*-Bromphenylhydrazin, auch solches vom richtigen Schmelzpunkt, beim Verbrennen einen Aschenrückstand von zirka 1% seines Gewichtes zurückließ.

Hätte Neuberg¹ nicht zwei vollständige Analysen der Substanz ausgeführt, die zu der von ihm aufgestellten Bruttoformel führten, überdies auch A. Jolles² später eine mit diesem Befund übereinstimmende Analyse (Kohlen-, Wasser- und

¹ B., 32, 2395 (1899).

² M., 32, 628 (1911).

Stickstoffbestimmung) der Substanz veröffentlicht, so wäre man versucht, an der Existenz einer Verbindung dieser Zusammensetzung zu zweifeln und an das Übersehen des geringen Aschengehaltes zu glauben. Wenn wir trotz vielfacher Bemühungen doch nicht imstande gewesen sind, eine solche in unseren Händen entstehen zu sehen, so können wir nur annehmen, daß die Bereitungsvorschrift nicht ausreichend genau die Bedingungen klarstellt, unter welchen gearbeitet werden muß, um einen günstigen Erfolg zu haben.

In der Tat ist diese Vorschrift, nach deren Wortlaut man übrigens annehmen müßte, daß Konzentration der Lösungen, relative Mengen der reagierenden Substanzen, Reaktion der Flüssigkeit keine wesentliche Bedeutung für das Gelingen haben, an den verschiedenen Literaturstellen, wo sich dieselbe findet, in einigen Punkten nicht ganz eindeutig, in anderen auch nicht ganz übereinstimmend. Der Mißerfolg, den wir bei unseren Versuchen hatten, mußte uns zunächst die Vermutung nahelegen, daß die Ursache hiervon an diesen Dingen liegen könnte, insofern für die Durchführung des Versuches ein gewisser, wenn auch scheinbar geringer Spielraum blieb.

In der Abhandlung,¹ in welcher die *p*-Bromphenylhydrazinverbindung der Glukuronsäure zuerst beschrieben worden ist, wird die Darstellung aus »Glukuron« und die Anwendung von »*p*-Bromphenylhydrazinchlorhydrat und Natriumacetat« empfohlen, »denn so vermeidet man fast vollständig die bei dem käuflichen Präparate (*p*-Bromphenylhydrazin) und Verwendung freier Essigsäure stets unter gleichzeitiger Rotfärbung der Flüssigkeit eintretende Verharzung, welche die Reinigung der Hydrazinverbindung außerordentlich erschwert und verlustreich macht«. Das Erwärmen soll »im Wasserbad« geschehen.

In einer bald darauf erschienenen Arbeit Neuberg's² wird dieselbe Substanz, von welcher nebenbei gesagt wird, daß sie »aus der freien Glukuronsäure oder ihren Salzen in essigsaurer Lösung entsteht«, aus Giemsa's Glukuron-*p*-Bromphenylhydrazon erhalten; die allein ausgeführte Stickstoff-

¹ B., 32, 2395 (1899).

² B., 33, 3319 (1900).

bestimmung ergab aber einen höheren Wert (8·20%) statt der berechneten 7·35%.

In der »Zeitschrift für physiologische Chemie« sprechen sich P. Mayer und C. Neuberg¹ folgendermaßen aus: »Beide Substanzen verbinden sich zu einer von der Konzentration der Lösung und dem Verhältnis der Mengen von Glukuronsäure und *p*-Bromphenylhydrazin unabhängigen Verbindung $C_{12}H_{17}O_7N_2Br$, die aus der freien Säure wie ihren wasserlöslichen Salzen in essigsaurer Lösung, aber unter Vermeidung eines Überschusses an freier Essigsäure in guter Ausbeute entsteht.«

Es heißt ferner, daß die Verbindung, »deren Zusammensetzung der angeführten Formel unter allen Umständen entspricht, wahrscheinlich glukuronsaures *p*-Bromphenylhydrazin darstellt«.

In einer Fußnote auf p. 264 derselben Abhandlung wird nochmals vor »einem Überschuß freier Essigsäure« gewarnt.

In dem schönen Referat Neuberg's² »Die Physiologie der Pentosen und der Glukuronsäure« heißt es von dieser Verbindung, sie habe »den Vorzug, daß sie unabhängig von dem Verhältnis von Glukuronsäure zu dem Bromphenylhydrazin aus der freien Säure wie ihren Salzen entsteht, wenn sie in essigsaurer Lösung gekocht werden«; es wird hervorgehoben, daß das optische Verhalten von bemerkenswerter Konstanz sei, während es vorkommt, daß der Schmelzpunkt durch minimale Beimengungen herabgedrückt wird und auch die analytischen Daten nicht absolut scharf ausfallen.

Auch andere Forscher haben sich der von Neuberg entdeckten Reaktion zum Nachweis von Glukuronsäure bedient.

Paul Mayer³ hat mit Hilfe derselben Glukuronsäure im Rinderblut nachgewiesen; die Substanz zeigte in jeder Beziehung die von Neuberg geschilderten Eigenschaften; der Stickstoff entsprach jenem der Neuberg'schen Formel; die Glukuronsäure lag als Natriumsalz vor.

¹ Bd. 29, 260 (1900).

² Ergebnisse der Physiologie, Bd. III, 1, 392 (1904).

³ Zeitschrift für physiol. Chemie, 32, 528 (1901).

In einer umfangreichen Schrift »Recherches biochimiques sur l'indol et l'acide glucuronique« (Thèse) beschäftigt sich Hervieux mit der *p*-Bromphenylhydrazinverbindung der Glukuronsäure.

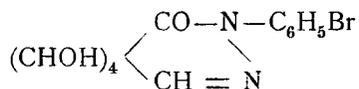
Er empfiehlt die Anwendung von freiem *p*-Bromphenylhydrazin und Essigsäure statt des Chlorhydrats und Natriumacetats, da die Base, seitdem Neuberg seine Versuche angestellt hat, im reinen Zustande zu erhalten sei. Bei Beobachtung besonderer Vorsicht gelingt es nach ihm, die Verbindung selbst aus sehr verdünnten Lösungen zu erhalten; absolute Reinheit der Glukuronsäure sei vor allem erforderlich; er erzielt dieselbe durch Fällung mit Quecksilbernitrat und Entfernung des überschüssigen Quecksilbers mit Zinkstaub, so daß er schließlich Zinkglukuronat in Lösung hat. »Le liquide original (Lösung von Glukuron), qui reagissait mal ou pas du tout avec l'hydrazine, donne cette fois une abondante précipitation d'aiguilles de la combinaison parabromphenylhydrazinique de l'acide glucuronique.»

Die Vorschrift, die Hervieux gibt, ist keineswegs präzise, denn er gibt keinerlei Verhältnisse der angewendeten Substanzen an, es heißt nur, man habe einen Tropfen Eisessig für jeden Kubikzentimeter Lösung zuzufügen; da er mit Harn arbeitet, sind die Lösungen unter allen Umständen sehr verdünnt an Glukuronsäure, daher die Menge Essigsäure relativ sehr groß. Hervieux macht aber andererseits ausdrücklich darauf aufmerksam, daß ein Überschuß an Essigsäure schädlich wirke. Es sei darauf hingewiesen, daß Hervieux vermöge der angewandten Behandlungsweise des Harnes nicht mit freier Glukuronsäure, sondern mit Bariumglukuronat arbeitet. Die Niederschläge, welche Hervieux erhält, entsprechen in bezug auf Aussehen, Schmelzpunkt, Drehungsvermögen, Löslichkeit in Pyridin-Alkoholgemisch etc. durchaus der Beschreibung Neuberg's, nur der von Neuberg konstatierten Löslichkeit in 60% Alkohol wird keine Erwähnung getan.

Hervieux hat von der Substanz mehrere gut übereinstimmende Brombestimmungen ausgeführt, von welchen nur

¹ I von. Impr. Reunies, 1908, 5, 124 ff.

eine mitgeteilt wird, die 23·59% Brom ergeben hat, d. i. 2·6% mehr als die Neuberg'sche Formel verlangt. Auf Grund dieser Bestimmung bestreitet er die Richtigkeit dieser Formel und stellt eine neue auf, die dem von ihm gefundenen Bromgehalt entspricht, und zwar jene eines Lactazames:



Genauer gibt Bernier¹ die bei der Reaktion im Harne einzuhaltenden Verhältnisse an, und zwar:

50 *cm*³ des mit Schwefelsäure hydrolysierten, neutralisierten und mit Mercurosalz gereinigten Harnes,

0·8 *g* Bromphenylhydrazin,

80 Tropfen Essigsäure.

Auf diese Weise erhielt er einen reichlichen, zum Teil in absolutem Alkohol löslichen Niederschlag, dessen unlöslicher Anteil auf dem bloc Maquenne bei 235 bis 236° schmolz und auch sonst die Eigenschaften der Neuberg'schen *p*-Bromphenylhydrazinverbindung zeigte.

Tschirch und Gauchmann,² welche die Glycyrrhizinsäure als Glukuronsäureverbindung erkannt haben, haben aus einer Lösung des daraus gewonnenen Glukurons mit freiem *p*-Bromphenylhydrazin und überschüssiger Essigsäure gelbe Nadeln erhalten, die in absolutem Alkohol unlöslich waren, den Schmelzpunkt 225 bis 230° unter Zersetzung und starke Linksdrehung im Pyridin-Alkoholgemisch zeigten.

Vor kurzer Zeit hat Jolles³ gezeigt, daß bei der Oxydation von Glukose mit Wasserstoffsperoxyd Glukuronsäure in geringer Menge gebildet werde. Sie wurde unter Anwendung von *p*-Bromphenylhydrazinchlorhydrat und Natriumacetat in Neuberg's *p*-Bromphenylhydrazinverbindung nach der Vorschrift dieses Forschers übergeführt und so identifiziert. Die Substanz lieferte bei der Analyse die von Neuberg's Formel

¹ Sur la présence de l'acide glucuronique et de certains hydrates de carbone dans l'urine normal. Thèse. Paris Impr. de la cour. d'appel 1910, p. 58.

² Arch. d. Pharmazie, 246 (1908).

³ M., 32. 623 (1911).

geforderten Prozentzahlen an Kohlenstoff, Wasserstoff und Stickstoff, auch Schmelzpunkt und Drehungsvermögen waren übereinstimmend.

Lépine und Boulut¹ haben sich ebenfalls der Reaktion, ohne näheres mitzuteilen, bedient.

In der Deutschen medizinischen Wochenschrift² bezeichnet P. Mayer die Neuberg'sche Reaktion als zweifellos »die sicherste Methode« des Nachweises der Glukuronsäure im Harn; »die Darstellung dieser Verbindung ist aber nur möglich, wenn sich größere Mengen von Glukuronsäure im Harn finden«; an einer anderen Stelle³ teilt derselbe Forscher mit, er habe aus Harn von Kaninchen, welchen 15 g glukuronsaures Natrium subkutan beigebracht worden war, die *p*-Bromphenylhydrazinverbindung Neuberg's dargestellt, die sich in allen Eigenschaften identisch mit Neuberg's Substanz zeigte; auch die Stickstoffbestimmung war übereinstimmend. In einem zweiten Falle⁴ gleicher Art wurde die Identität durch eine Brombestimmung erwiesen.

Bial und Huber⁵ haben nach Mentholdarreicherung in den Faeces (nach der Hydrolyse neutralisiert) mit salzsaurem *p*-Bromphenylhydrazin und Natriumacetat die Verbindung erhalten, die auch vollste Übereinstimmung mit den Neuberg'schen Angaben zeigte; überdies wurde die Identität von diesem selbst bestätigt.

Naidus⁶ scheint keine guten Erfahrungen mit der Reaktion gemacht zu haben, denn er sagt »*p*-Bromphenylhydrazin kann nicht als bequemes und gutes Reagens für Glukuronsäure genommen werden«.

Aus vorstehender Literaturübersicht, welche möglicherweise nicht ganz vollständig ist, geht hervor, daß in einer größeren Zahl von Fällen die ihrer Struktur nach unaufgeklärte *p*-Bromphenylhydrazinverbindung der Glukuronsäure ent-

¹ C. r. de la société de Biologie, 1901, p. 1041.

² Deutsche medizinische Wochenschrift, 27, p. 243 (1901).

³ Zeitschrift für klin. Medizin, 47, 68 (1902).

⁴ Zeitschrift für klin. Medizin, 47, 68 (1902).

⁵ Beiträge zur chem. Physiologie und Pathol., 1902, Bd. 2, 532.

⁶ Ref. Biochem. Zentralblatt, Bd. 1, 258 (1903).

sprechend der Neuberg'schen Bruttoformel und mit den von ihm festgestellten charakteristischen Eigenschaften erhalten werden konnte; nicht in allen Fällen jedoch liegt eine analytische Kontrolle vor.

Wir stellen im nachstehenden sämtliche Analysenergebnisse zusammen, die wir in der Literatur auffinden konnten:

	Gefunden							
	Neuberg		Hervieux		P. Mayer		Jolles	
C	37·68	37·71	—	—	—	—	—	37·53
H	4·30	4·50	—	—	—	—	—	4·64
N	7·55	7·64	8·20	7·51	—	7·72	7·68	7·21
Br.....	20·89	21·06	—	—	23·59	20·78	—	—
					Berechnet für $C_{12}H_{17}O_7N_2Br$			
C					37·80			
H					4·46			
N					7·21			
Br.....					21·00			

Es ist bereits erwähnt worden, daß wir eine große Zahl von Versuchen, es waren deren rund 30, ausgeführt haben, wobei wir uns zunächst genau an die Neuberg'sche Vorschrift gehalten haben, ohne daß es uns geglückt wäre, das von ihm beschriebene Produkt zu erhalten. Verwendet wurde ganz reines Glukuron aus Euxanthinsäure und käufliches salzsaures *p*-Bromphenylhydrazin, das wir zuerst wiederholt aus verdünnter Salzsäure umkrystallisierten; später allerdings, nachdem wir uns überzeugt hatten, daß der Erfolg mit dem Kahlbaum'schen Präparat kein anderer war, haben wir auf diese Reinigung verzichtet.

Auch mit dem freien Phenylhydrazin haben wir in essigsaurer Lösung gearbeitet, in diesem Falle aber stets ein negatives Resultat erhalten, wenn wir das Glukuron nicht zuvor mit einer Base abgesättigt hatten; die minimalen Spuren leuchtendgelben krystallisierten Niederschlages — in einem kontrollierten Versuch 0·1% der theoretischen Ausbeute auf Grund der Neuberg'schen *p*-Bromphenylhydrazinverbindung berechnet — hinterließen Asche und ihr Entstehen mußte auf

kleine Verunreinigungen der Materialien zurückgeführt werden. Wenn wir hingegen mit Lösungen glukuronsaurer Salze arbeiteten, war der Erfolg in der Regel positiv, aber auch da war die Ausbeute eine wechselnde und weit hinter jener zurückbleibend, die Neuberg erhalten hat (80 bis 85% der Theorie).¹

Sämtliche Fällungen, die wir zu beobachten Gelegenheit hatten, entsprachen der Beschreibung Neuberg's, waren aber stets aschenhaltig. Es scheint uns keineswegs ausgeschlossen, daß auch andere Beobachter solche aschenhaltige Niederschläge in Händen gehabt haben könnten, ohne darauf aufmerksam geworden zu sein.

Da die relative Menge der Asche so groß war, daß sie nicht durch Verunreinigungen bedingt gewesen sein konnte, mußten wir zur Meinung kommen, daß es sich um Salze einer Verbindung der Glukuronsäure mit *p*-Bromphenylhydrazin handeln müsse und es erschien uns daher geboten, die Darstellung solcher Salze mit verschiedenen Kationen zu versuchen. Dies ist uns in der Tat gelungen und die Ermittlung ihrer Zusammensetzung und Struktur fiel dann nicht schwer.

Natriumsalz. Glukuron mit *p*-Bromphenylhydrazin und Essigsäure in den von Neuberg angegebenen Mengen und Konzentrationsverhältnissen auf dem Wasserbad erhitzt, lieferten uns, nach Lösung der entstandenen dunklen, amorphen Fällungen in absolutem Alkohol, nur Spuren eines leuchtendgelben, krystallinischen, in absolutem Alkohol und Wasser praktisch unlöslichen Niederschlages, der Asche hinterließ, sonst aber der Beschreibung Neuberg's entsprach; wir müssen dessen Bildung auf mineralische Verunreinigungen des *p*-Bromphenylhydrazins zurückführen. Oft wiederholte Versuche hatten stets dasselbe Resultat. Die Schmelzpunkte sind nicht scharf zwischen 185 und 190° unter Zersetzung gelegen. Besser, immer aber ungünstig in bezug auf Ausbeute, verlief die

¹ B., 32, 2396 (1899). Bial und Huber (Berliner klinische Wochenschrift, 40, 405 [1903]) weisen darauf hin, daß sich aus Neuberg's und P. Mayer's Zahlen entnehmen lasse (Zeitschr. f. physiol. Ch., 32, 529 [1901]), daß sie (die *p*-Bromphenylhydrazinmethode) nur einen Ausfall von zirka 20 bis 30% selbst bei verhältnismäßig sehr reinen Lösungen zeigt.

Reaktion, als wir mit Lösungen von glukuronsaurem Natrium arbeiteten. Die Anwendung von salzsaurem *p*-Bromphenylhydrazin und Natriumacetat ist unter allen Umständen vorteilhafter als jene von *p*-Bromphenylhydrazin und freier Essigsäure; augenscheinlich spielt die Natriumionenkonzentration der Lösung eine Rolle. Wiederholt konnten wir konstatieren, daß der Zusatz einer kleinen Menge freier Essigsäure die Bildung des Salzes fördert, denn, wenn Lösungen von glukuronsaurem Natrium in zwei gleiche Teile geteilt, mit den gleichen Mengen von *p*-Bromphenylhydrazinchlorhydrat und Natriumacetat versetzt, auf dem Wasserbad erwärmt wurden, nachdem der einen Probe etwas freie Essigsäure zugesetzt worden war, erhielten wir stets aus dieser Lösung mehr von dem kristallinen Niederschlag.

Im allgemeinen haben wir die von Neuberg empfohlenen Verhältnisse eingehalten und 3 cm^3 Eisessig zugesetzt. Nachdem die Zusammensetzung des Salzes ermittelt worden war, erschien es angezeigt, von dem *p*-Bromphenylhydrazinchlorhydrat und Natriumacetat eine größere Quantität anzuwenden, wir haben diese verdoppelt, nicht aber die Menge der freien Essigsäure.

Für den Nachweis der Glukuronsäure kann das Verfahren nicht empfohlen werden, denn der Verlauf der Reaktion ist offenbar von kleinen, unkontrollierbaren Umständen stark beeinflußt, liefert wechselnde und, soweit unsere Erfahrungen reichen, stets schlechte Ausbeuten.

Die Substanz ist hygroskopisch, muß daher vor der Analyse getrocknet werden; wir haben stets im Toluolbad zur Gewichtskonstanz gebracht.

Die Analyse ergab nachstehende Ergebnisse, aus denen mit Sicherheit hervorgeht, daß die Substanz das Natriumsalz der *p*-Bromphenylosazonglukuronsäure ist:

- I. 0·1291 *g* Substanz lieferten 0·0391 *g* Wasser und 0·1855 *g* Kohlendioxyd.
- II. 0·00340 *g* Substanz lieferten 0·333 cm^3 Stickstoff ($B=711$ *mm*, $T=20^\circ$).
- III. 0·006355 *g* Substanz lieferten 0·612 cm^3 Stickstoff ($B=711$ *mm*, $T=19^\circ$).
- IV. 0·1423 *g* Substanz lieferten 0·0982 *g* Bromsilber.
- V. 0·3378 *g* Substanz lieferten 0·0482 *g* Natriumsulfat.

In 100 Teilen:

	Gefunden					Berechnet für
	I	II	III	IV	V	$C_{18}H_{17}O_5N_4Br_2Na$
C	39·19	—	—	—	—	30·13
H	3·39	—	—	—	—	3·09
N	—	10·68	10·54	—	—	10·15
Br	—	—	—	29·37	—	28·96
Na	—	—	—	—	4·62	4·17

Herr Prof. F. Pregl in Innsbruck hatte die große Liebenswürdigkeit, die Stickstoffbestimmungen nach seinem neuen mikroanalytischen Verfahren¹ auszuführen, wofür wir ihm auch an dieser Stelle unseren Dank aussprechen.

Auf das Umkrystallisieren aus 60% Alkohol, welches Neuberg bei seiner Verbindung mit Erfolg angewendet hat, haben wir verzichtet, obwohl das Salz sich in sehr großen Mengen dieses Lösungsmittels auflöst und sich in schönen, langen, gelben Nadelchen daraus ausscheidet. In Pyridin löst sich das Salz leicht auf, auf Zusatz von Wasser scheidet es sich gelatinös aus.

In dem zur Bestimmung der optischen Aktivität von Neuberg empfohlenen Pyridin-Alkoholgemisch löst sich die Substanz schwer auf; löst man sie jedoch zuvor in Pyridin, so scheidet sie sich auf Zusatz des Alkohols nicht mehr aus. In einer so hergestellten Lösung haben wir die Drehung bestimmt, die ein spez. Drehungsvermögen von -259° ergab. Es zeigt daher das Salz der Osazonsäure auch eine enorme negative Drehung so wie der Körper Neuberg's.

Bariumsalz. Zur Darstellung dieses Salzes hat sich folgendes Verfahren bewährt:

1 g Glukuron wurde in 100 cm^3 Wasser gelöst und mit Barytwasser bis zur bleibenden alkalischen Reaktion versetzt — die Neutralisation erfolgt nur allmählich —, hierauf wird zur Abscheidung des überschüssigen Bariumhydroxyds Kohlendioxyd eingeleitet, einige Zeit auf dem Wasserbad erwärmt, das Bariumcarbonat abfiltriert. Dem Filtrat wird eine Auf-

¹ Abderhalden, Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden.

kochung von 4 g *p*-Bromphenylhydrazinchlorhydrat und 6 g krystallisiertem Bariumacetat in 100 cm^3 Wasser zugesetzt, zirka 2 Minuten ins kochende Wasserbad gestellt, wiederholt energisch geschüttelt und heiß filtriert. In das etwas trübe, gelb gefärbte Filtrat werden nun 3 cm^3 Eisessig gegeben und dann im kochenden Wasserbad erhitzt. Es scheiden sich bald gelbe Nadeln aus, die abfiltriert, mit Wasser und kochendem absoluten Alkohol gewaschen werden; dieses Verfahren wurde fünfmal wiederholt; das Erhitzen dauerte 10 Minuten, 15 Minuten, 25 Minuten, 33 Minuten, 1 Stunde, die Gesamtausbeute betrug 1.72 g. Bei einem zweiten, in gleicher Weise ausgeführten Versuche, bei welchem die Glukuronsäure nicht durch Bariumhydroxyd neutralisiert worden war, 1.63 g, das sind 50% der theoretischen Ausbeute. Es sei bemerkt, daß sich bei weiterem Erhitzen der Lösungen noch Ausscheidungen bildeten, die jedoch dunkler gefärbt waren und daher nicht berücksichtigt wurden.

Dieses Salz ist noch hygroskopischer als das Natriumsalz und wurde zur Analyse im Toluolbad bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

- I. 0.2055 g Substanz gaben 0.0563 g Wasser und 0.2727 g Kohlendioxyd.
 II. 0.007315 g Substanz gaben 0.656 cm^3 Stickstoff ($B = 711$ mm, $T = 20^\circ$).
 III. 0.2710 g Substanz gaben 0.0525 g Bariumsulfat.
 IV. 0.05018 g Substanz gaben 0.01012 g Bariumsulfat.

In 100 Teilen:

	Gefunden				Berechnet für
	I	II	III	IV	$C_{18}H_{17}O_5N_4Br_2Ba$
C	36.19	—	—	—	36.14
H	3.07	—	—	—	2.85
N	—	9.77	—	—	9.37
Ba	—	—	11.40	11.87	11.49

Auch diese Stickstoffbestimmung verdanken wir Herrn Prof. Pregl. Das *p*-bromphenylosazonglukuronsaure Barium stellt hellgelbe mikroskopische Nadeln dar.

In 60% Alkohol löst sich die Substanz nur sehr wenig, aus der kochenden Lösung scheidet sie sich beim Erkalten in

gelben schönen Nadelchen aus, auch in Pyridin ist sie schwer löslich; die Lösung erstarrt beim Erkalten gelatinös, auch durch Wasser wird gelatinös ausgefällt. Das Salz schmilzt unter Zersetzung, daher ist auch die zur Beobachtung gelangende Schmelztemperatur je nach der Geschwindigkeit des Erhitzens nicht dieselbe. Bei raschem Erwärmen fanden wir im Thiele'schen Apparat 215 bis 217°, doch bräunte sich die Probe schon etwas früher.

Calciumsalz. Es wurde in ganz analoger Weise wie das Bariumsalz hergestellt und sieht dem Bariumsalz sehr ähnlich. Die Ausbeute an dem nur einmal dargestellten Salz betrug 25% der Theorie.

0.3206 g Substanz gaben 0.0402 g Calciumsulfat.

In 100 Teilen:

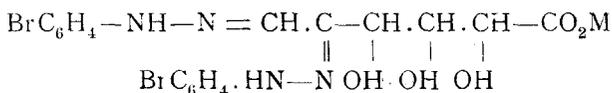
	Gefunden	Berechnet für C ₁₈ H ₁₇ O ₅ N ₁ Br ₂ Ca
Ca	3.69	3.67

Wir haben ferner auch das Kalium-, Zink- und Bleisalz dargestellt, die unter analogen Verhältnissen erhalten worden sind und sich nur wenig voneinander unterscheiden; nur die Farbe des Zinksalzes war etwas dunkler.

Durch die mitgeteilten Beobachtungen erscheint es sichergestellt, daß die beschriebenen Verbindungen, die in ähnlicher Weise entstehen wie Neuberg's *p*-Bromphenylhydrazinverbindung der Glukuronsäure unbekannter Struktur,

p-bromphenylosazonglukuronsaure Salze

sind:



Das Bariumsalz insbesondere entsteht nach unserer Vorschrift leicht und sicher in guter Ausbeute, während die Gewinnung der Neuberg'schen Verbindung nach unseren Erfahrungen doch recht schwer und unsicher sein muß.

Es kann keinem Zweifel unterliegen, daß der Nachweis der Glukuronsäure durch deren Überführung in dieses Bariumsalz sich besser eignet als die Neuberg'sche Reaktion.
