

Ueber die Phenylhydrazinverbindungen der Glycuronsäure.

Von

Dr. Paul Mayer,

Vol.-Assistenten der I. med. Universitätsklinik in Berlin.

(Aus dem chemischen Laboratorium des pathologischen Instituts zu Berlin.)

Der Redaction zugegangen am 12. November 1899.)

Seitdem durch die Auffindung einer Pentose im Harn durch Salkowski und Jastrowitz¹⁾ zum ersten Male der Nachweis erbracht wurde, dass Kohlehydrate mit fünf Atomen Kohlenstoff, denen man bisher nur im Pflanzenreiche begegnet war, auch im thierischen Körper eine Rolle spielen, haben verschiedene Forscher über das Vorkommen von Pentosen im Organismus eingehende Studien angestellt. Besonders die Untersuchungen von Kossel, Hammarsten, Salkowski und Blumenthal, denen sich Arbeiten von Neumann, Bang, Oswald und Notkin anschliessen, haben gezeigt, dass eine Reihe von Nucleoproteiden eine Pentosegruppe enthalten.²⁾ Indes der Nachweis, dass das fragliche Kohlehydrat eine echte Pentose sei, war zunächst nur durch die Schmelzpunktbestimmung des betreffenden Osazons geführt worden; und es wurden daher bald Zweifel laut, ob es gestattet sei, aus der

1) Salkowski und Jastrowitz, Centralbl. für die med. Wissenschaften, 1892, Nr. 19 u. 35.

2) Kossel, Arch. f. Anat. u. Physiol., 1893, S. 157.
Hammarsten, Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XIX, 1894, S. 28.
Salkowski, Berlin. klin. Wochenschr., 1895, Nr. 17.
Blumenthal, Zeitschr. f. klinische Medicin, Bd. 34, 1898.
Neumann, Engelmann's Arch. f. Physiologie, 1898, S. 374.
Bang, Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XXVI, 1898, S. 133.
Oswald, Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XXVII, 1899, S. 14.
Notkin, Virchow's Archiv, 144. Suppl., 1896, S. 236.

Schmelzpunktbestimmung des Osazons allein bindende Schlüsse auf die Natur eines Kohlehydrates zu ziehen, und besonders darauf hingewiesen, dass es sich in den genannten Fällen auch um Glycuronsäure handeln könne, die ja viele gemeinsame Eigenschaften mit den Pentosen zeigt. Nun liegen allerdings heute für das Osazon aus dem Harn und für das Osazon aus Pankreas Elementaranalysen vor, so dass für diese Körper die Pentosematur festgestellt ist.¹⁾ Immerhin könnten, da über die Phenylhydrazinverbindungen der Glycuronsäure eine einheitliche Auffassung bis nun nicht erzielt ist, Elementaranalysen dieser letzteren ähnliche Zahlen ergeben. Es erschien daher geboten, die Phenylhydrazinverbindungen der Glycuronsäure eingehend zu studiren. Ich habe deshalb, als ich auf Anregung von Herrn Professor Salkowski begann, mich mit der Glycuronsäure zu beschäftigen, auch dieser Frage mein Interesse zugewendet.

Die einzigen zuverlässigen Angaben über die Phenylhydrazinverbindungen der Glycuronsäure rühren von Thierfelder²⁾ her, dem wir die ersten eingehenden chemischen Untersuchungen über die Glycuronsäure überhaupt verdanken. Thierfelder stellte fest, dass das Glycuronsäureanhydrid bei der Behandlung mit Phenylhydrazin nur braune, allmählich zu Boden sinkende Tröpfchen und zähe, schwarze Massen bildet. Dagegen konnte er aus den Alkalisalzen der Säure eine Phenylhydrazinverbindung darstellen, die sich langsam in gelben, sich allmählich bräunenden Nadeln abscheidet, welche einen Schmelzpunkt von 114—115° zeigen. Die Analyse seiner Verbindung ergab, dass es sich um ein Gemisch von Osazon und Hydrazinsalz handelte, beziehungsweise um eine Verbindung beider nach gleichen Molekülen.

Weitere Angaben über die Phenylhydrazinverbindungen der Glycuronsäure finden sich bei Geyer³⁾ und Hirschl.⁴⁾

1) Salkowski, Berl. klin. Wochenschr. a. a. O. und Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XXVII, 1899, S. 537.

2) Thierfelder, Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XI, 1887, S. 395.

3) Geyer, Wiener med. Presse, 1889, Bd. 30, S. 1686.

4) Hirschl, Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XIV, 1890, S. 377.

Diese Autoren haben jedoch ihre Untersuchungen lediglich von dem einen Gesichtspunkt aus unternommen, ob die zum Nachweis von Zucker im Harn ausgeführte Phenylhydrazinprobe unbedingt eindeutig sei und nicht zu Verwechslungen mit etwa im Harn vorkommenden Glycuronsäureverbindungen Anlass geben könne. Sie haben daher das Hauptgewicht auf die Krystallform der betreffenden Verbindungen gelegt, ohne eingehende systematische Untersuchungen angestellt zu haben.

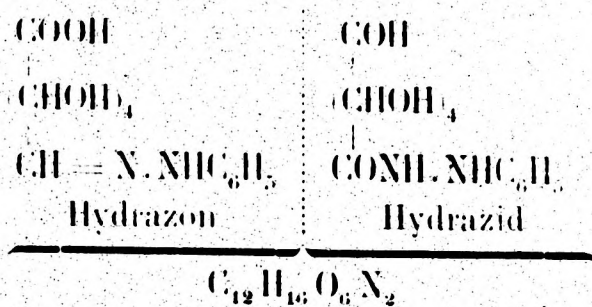
Während Geyer nur angibt, dass die gewonnenen Krystalle sich weder in der Form noch in ihren Löslichkeitsverhältnissen von denen des Phenylglucosazons unterscheiden, aber nicht einmal Schmelzpunktbestimmungen der erhaltenen Verbindungen gemacht hat, werden solche wenigstens von Hirschl mitgetheilt, wenn er auch sonst keine genauen Angaben über die Mengenverhältnisse der angewandten Substanzen macht. Hirschl erhielt beim Erhitzen von 10 ccm. einer Lösung von glycuronsaurem Natron (wie viel?) in einer Epruvette mit 2 Messerspitzen salzsauren Phenylhydrazins und 3 Messerspitzen essigsauren Natrons durch eine Viertelstunde im Wasserbad hellgelbe, in Wasser unlösliche Nadeln, die zwischen 110 und 114° schmolzen; kochte er eine halbe Stunde lang, so erhielt er einen braungelben, amorphen Niederschlag, der aus gelben, unregelmässigen Schollen bestand und einen Schmelzpunkt von 107—108° zeigte, während nach einstündigem Erhitzen dieselben amorphen Körnchen auftraten, die einen Schmelzpunkt von 150° zeigten. Ich glaube nicht, dass diese Angaben geeignet sind, die Verhältnisse wesentlich zu klären.

Bereits in einer früheren Arbeit habe ich mitgetheilt, dass ich aus verschiedenen glycuronsäurehaltigen Lösungen Phenylhydrazinverbindungen von verschiedenem Schmelzpunkt erhalten habe.¹⁾ Ich habe auch betont, dass die Verhältnisse bei der Glycuronsäure ungleich complicirter liegen als bei den Zuckerarten, da sie ausser der Aldehydgruppe noch eine Carboxylgruppe enthält. Während bei den Zuckern unter der

¹ Paul Mayer, Berl. klin. Wochenschr., 27 u. 28, 1899.

Einwirkung des Phenylhydrazins sich nur ein Hydrazon und ein Osazon bilden können, ist die Zahl der bei der Glycuronsäure in Betracht kommenden Verbindungen eine viel grössere, indem ausser Hydrazon und Osazon ein Hydrazid, ein Hydrazinsalz, ein Hydrazonhydrazid, ein Osazonhydrazid und eine Reihe von inneren Condensationsprodukten entstehen können.

Wenn man die elementare Zusammensetzung dieser verschiedenen Verbindungen berechnet, so ergeben sich Zahlen, die zum Theil sehr nahe bei einander liegen. Ja, das Hydrazon und das Hydrazid zeigen sogar eine vollkommen gleiche Zusammensetzung.



Es war daher a priori nicht unwahrscheinlich, dass die Elementaranalyse keinen sicheren Schluss gestatten würde, welche von den verschiedenen möglichen Verbindungsformen vorliegen würde, und es war von vornherein mit der Möglichkeit zu rechnen, dass die resultirenden Verbindungen keine einheitlichen Körper darstellen würden.

Die Glycuronsäure, welche ich für meine Untersuchungen verwendete, wurde aus der Euxanthinsäure, einer gepaarten Glycuronsäure, gewonnen, welche ich aus *Purrea arabica* (Indischgelb) darstellte. Der Farbstoff, welcher zum grössten Theil aus dem Magnesium- und Calciumsalz der Euxanthinsäure und beigemengtem Euxanthon besteht, wurde analog den Angaben von Thierfelder¹⁾ mit Wasser zu einem dünnen Brei verrieben und mit verdünnter Salzsäure gut zerrührt, bis die Masse die hellgelbe Farbe der freien Säure angenommen hat: dann wurde abgesaugt, und die Salzsäure durch Waschen mit Wasser entfernt. Sehr zweckmässig erwies es sich, nach der Vorschrift von Graebe²⁾ behufs vollkommener Entfernung des Euxanthon-

¹⁾ Thierfelder, a. a. O., S. 390.

²⁾ Graebe, Annal. d. Chem., 254, 1889.

den noch feuchten Rückstand in kohlensaurem Ammon zu lösen, in welchem das Euxanthon unlöslich ist. Nach dem Filtriren wird die Euxanthinsäure durch HCl wieder ausgefällt und dann aus verdünntem Alkohol umkrystallisirt. Auf diese Weise erhielt ich die Euxanthinsäure in prachtvollen goldgelben Krystallen vom Schmelzpunkt 162°. Behufs Abspaltung der Glycuronsäure aus der Euxanthinsäure hat Thierfelder¹⁾ die Euxanthinsäure im Papin'schen Topf mit 100—200 Theilen Wasser auf 100—125° erhitzt, während Mann und Tollens²⁾ die Spaltung mit 1%iger H_2SO_4 vornahmen.

Nachdem ich mich überzeugt hatte, dass das letztere Verfahren eine bedeutend bessere Ausbeute gibt, habe ich jedes Mal die Spaltung mit 1%iger H_2SO_4 ausgeführt. Es wurden 50 g Euxanthinsäure mit 700 ccm. einer 1%igen H_2SO_4 im Autoclaven in der Weise erhitzt, dass während der ersten Stunde der Druck langsam auf $2\frac{1}{2}$ —3 Atmosphären stieg und während der zweiten Stunde auf dieser Höhe erhalten wurde.

Nach diesem von Mann und Tollens angegebenen Verfahren erhielt ich aus 50 g Euxanthinsäure eine Lösung, die nach der polarimetrischen Bestimmung circa 20 g Glycuronsäure enthielt. Da die Krystallisation des Glycuronsäureanhydrids beziehungsweise einzelner glycuronsaurer Salze Schwierigkeiten machte, zog ich es vor, die glycuronsäurehaltigen Lösungen direkt zu verarbeiten. Denn für die Untersuchung der Phenylhydrazin-Verbindungen musste es gleichgültig sein, ob glycuronsaure Salze in krystallinischem Zustand verwendet würden, oder eine reine, glycuronsäurehaltige Lösung, da ja auch bei den ersteren nur die aus ihren Salzen frei gemachte Glycuronsäure in Wirksamkeit tritt.

Die nach der Spaltung vom Euxanthon abfiltrirte Lösung, welche natürlich alle der Glycuronsäure zukommenden Eigenschaften zeigte, wurde mit Natriumcarbonat neutralisirt und mit Essigsäure schwach angesäuert. Der Gehalt der so gewonnenen Lösung an Glycuronsäure wurde polarimetrisch bestimmt unter

1) Thierfelder, a. a. O., S. 391.

2) Mann u. Tollens, Annal. d. Chem., 290, 1896.

Zugrundelegung der von Thierfelder und Külz gefundenen spezifischen Drehung $[\alpha]_D = 19,4$.¹⁾ Da mich frühere orientirende Untersuchungen, wie ich bereits erwähnt habe, es für wahrscheinlich halten liessen, dass mehrere Phenylhydrazin-Verbindungen der Glycuronsäure existiren, bin ich so vorgegangen, dass ich successive 1, 2, 3 und 4 Moleküle Phenylhydrazin auf je ein Molekül Glycuronsäure zur Einwirkung brachte.

I.

1 Molekül Glycuronsäure. — 1 Molekül Phenylhydrazin.

Eine Lösung von 3 g Glycuronsäure wird mit 1,7 g in dem gleichen Volumen 50%iger Essigsäure gelöstem Phenylhydrazin versetzt (1 g Glycuronsäure entspricht 0,55 g Phenylhydrazin). Es entsteht sofort eine rothbraune Trübung, die sehr rasch eine zinnoberrothe Färbung annimmt, und es scheidet sich fast momentan ein rother flockiger Niederschlag aus. Die Untersuchung dieses bereits in der Kälte ausfallenden Körpers ergab kein positives Resultat. Er ist in heissem Wasser unlöslich und zersetzt sich beim Erhitzen zu einer braunschwarzen, schmierigen Masse. In heissem 90%igen Alkohol löst er sich ziemlich schwer und fällt auch nach dem Umkrystallisiren wieder als amorphe, rothe Verbindung aus, die sich bei 100° zu zersetzen beginnt und zwischen 105 und 110° schmilzt. Ich glaube nicht fehlzugehen, wenn ich annehme, dass dieser sich beim Erhitzen sofort zersetzende Körper die Ursache ist der harzigen, zähen Schmieren, die beim Einwirken von Phenylhydrazin auf Glycuronsäure so häufig auftreten. Bevor ich daher die mit Phenylhydrazin versetzte Lösung erhitzte, habe ich stets von diesem rothflockigen Niederschlag, dessen Abscheidung bald vollendet ist, abfiltrirt. Die filtrirte Lösung wird nun im Wasserbad erwärmt. Wenn man das Becherglas etwa eine halbe Stunde im Wasserbad belässt, so beginnt alsbald eine massenhafte Ausscheidung von Krystallen,

¹⁾ Thierfelder a. a. O. — Külz, Zeitschr. f. Biologie, 23. 175. 1887.

deren Isolirung und Reinigung jedoch durch die Beimengung zahlreicher Verunreinigungen sehr erschwert ist. Am zweckmässigsten erwies es sich mir, folgendermassen zu verfahren: Die Erhitzung im Wasserbad wird nur so lange fortgesetzt, bis die Flüssigkeit eine vollkommen undurchsichtige Beschaffenheit angenommen hat, am besten, bis sich gerade die ersten Krystalle abzuschneiden beginnen, was nach etwa 15 Minuten der Fall ist. Bei einiger Uebung lässt sich dieser Punkt sehr leicht erkennen. Dann wird eventuell unter Benutzung des Heisswassertrichters durch ein Faltenfilter filtrirt, und im Filtrat scheiden sich momentan die schönsten, lichtgelben Krystalle aus, die in einer ganz klaren, gelben Lösung suspendirt sind. Die Krystalle werden abfiltrirt, noch besser an der Säugpumpe abgesaugt und über H_2SO_4 getrocknet. Mikroskopisch betrachtet, stellen sie kleinere oder grössere Nadeln dar, welche denen des Glucosazons ausserordentlich ähnlich sind. Häufig sieht man ganz dieselben grossen, charakteristischen, zu Büscheln angeordnete Nadeln, wie sie dem Glucosazon eigenthümlich sind. Auch in seinen Löslichkeitsverhältnissen zeigt die Verbindung dem Glucosazon gegenüber keinen Unterschied. Sie ist unlöslich in heissem Wasser und in kaltem absoluten Alkohol und lässt sich aus verdünntem Alkohol umkrystallisiren. Ihre Lösung in Eisessig dreht die Ebene des polarisirten Lichtes nach links. Vor dem Umkrystallisiren zeigten die verschiedenen Verbindungen, die ich erhielt, einen Schmelzpunkt von $199-205^\circ$, so dass sie sich auch hierin ganz wie Glucosazon verhält. Nach wiederholtem Umkrystallisiren gelingt es allerdings, den Schmelzpunkt bis auf $210-217^\circ$ zu erhöhen.

Die Elementaranalyse¹⁾ ergab folgendes Resultat:

Substanz 0.1989, Gef. CO_2 0.4371.

H_2O 0.1188.

Hieraus folgt: C = 59.93%.

H = 6.63%.

Die N-Analyse ergab N = 15.52%.

1) Für die Ausführung der in dieser Arbeit vorkommenden Elementaranalysen bin ich Herrn C. Neuberger, dem Assistenten des Laboratoriums, zu grossem Danke verpflichtet.

Diese Zahlen stimmen für keine der oben beschriebenen möglichen Verbindungen. Dagegen zeigen sie eine auffallende Uebereinstimmung mit der elementaren Zusammensetzung des Glucosazons, für welches folgende Zahlen gefordert werden:

C = 60,34%; H = 6,15%; N = 15,64%.

Selbstverständlich kann die erhaltene Verbindung, trotzdem sie dieselben Eigenschaften und sogar dieselbe Zusammensetzung wie das Glucosazon zeigt, nicht mit diesem identisch sein. Da die Lösung ausser der Glycuronsäure kein Kohlehydrat enthält, ist es zweifellos, dass der gewonnene Körper eine Phenylhydrazin-Verbindung der Glycuronsäure darstellt.

II.

1 Molekul Glycuronsäure — 2 Moleküle Phenylhydrazin.

Eine Lösung von 3 g Glycuronsäure wird mit 3,5 g in 50% iger Essigsäure gelöstem Phenylhydrazin versetzt. Sofort beim Mischen der Lösungen entsteht eine weisse, momentan in gelbroth übergehende Trübung, die alsbald eine zinnoberrothe Farbe annimmt. Auch hier scheidet sich, allerdings erst nach einigem Stehen, ein rother flockiger Niederschlag ab, der sich aber nicht isoliren lässt, sondern sich beim Stehen nach kurzer Zeit an den Wandungen des Becherglases als schmierige, braunschwarze Masse festsetzt.

Es handelt sich also offenbar um denselben Körper wie bei den ersten Versuchen, der sich bei Anwesenheit von etwas mehr Phenylhydrazin bereits spontan zersetzt und verharzt. Die filtrirte Lösung wurde nun genau so behandelt, wie ich es für die obigen Untersuchungen beschrieben habe. Ich erhielt so eine Verbindung, deren Löslichkeit in Wasser weit grösser war als die der ersten, so dass ein grosser Theil erst nach dem Erkalten ausfiel. Sie lässt sich ebenfalls aus verdünntem Alkohol umkrystallisiren, ist aber in absolutem Alkohol nicht unlöslich. Die Krystallform dieses Körpers war eine sehr wechselnde. Meist sah man kleine, zu Rosetten angeordnete Nadeln, oder Balken, bisweilen krystallisirte er in Stechapfelform und Drusen. Nicht selten fiel die Verbindung nach dem

Umkrystallisiren amorph oder gar gallertartig aus. Wovon diese physikalischen Verhältnisse abhängen, ist schwer zu sagen. Meist gelingt es allerdings auch dann noch, nach wiederholtem Umkrystallisiren eine krystallinische Verbindung zu erhalten. Es zeigt aber diese Beobachtung von Neuem, wie wenig Werth man auf die Krystallform der Phenylhydrazin-Verbindungen legen darf. Der Schmelzpunkt der gewonnenen Verbindung liegt bei $159-164^{\circ}$ — ein Schmelzpunkt, der mit dem der Pentosazone vollkommen übereinstimmt. Dass aber ein solches nicht vorliegt, ergibt die Elementaranalyse:

Substanz 0,1510 g, Gef. CO_2 0,3491 g, H_2O 0,0820 g.

Substanz 0,2003 g, N 19,6 ccm. (17° , 770 mm.).

Hieraus folgt: C = 63,05%

H = 6,03%

N = 11,5%

Schon der N-Gehalt zeigt, dass es sich nicht um Pentosazon handeln kann, dem ein N-Gehalt von 17,07% zukommt. Ich bin aber ausser Stande, zu sagen, welche Phenylhydrazin-Verbindung der Glycuronsäure hier vorliegt, da die Analyse keine für eine der möglichen Verbindungsformen genau stimmenden Zahlen ergeben hat.

III.

1 Molekül Glycuronsäure — 3 und 4 Moleküle Phenylhydrazin.

Bei Einwirkung von 3 und 4 Molekülen Phenylhydrazin auf 1 Molekül Glycuronsäure erhielt ich stets dieselbe Verbindung wie bei Einwirkung von 2 Molekülen Phenylhydrazin, also die Verbindung vom Schmelzpunkt $159-164^{\circ}$. Ein Unterschied in dem Ablauf des Processes zeigt sich nur insofern, als der rothe flockige Niederschlag jetzt überhaupt nicht mehr auftritt, sondern sich beim Stehen der Lösung die bekannten schwarzbraunen Schmierchen absetzen.

Wenn ich die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammenfasse, so hat sich herausgestellt, dass die Glycuronsäure mit dem Phenylhydrazin zwei verschiedene Verbindungen liefert, von denen die eine die Eigenschaften und die Zusammensetzung des Hexosazons besitzt, und die andere den Schmelzpunkt des Pentosazons zeigt.

Bei den nahen Beziehungen der Glycuronsäure sowohl zu den Hexosen wie zu den Pentosen erscheint mir diese Thatsache von grosser Bedeutung zu sein, um so mehr, als die Glycuronsäure, wie ich dies in meiner früheren Arbeit ersichtlich gemacht zu haben glaube, häufiger vorkommt, als dies bisher angenommen wurde.

Man wird also, wenn man aus irgend welchen Organen oder Organtheilen Phenylhydrazin-Verbindungen gewinnt, in der Deutung derselben eine gewisse Vorsicht walten lassen müssen. Handelt es sich um eine Verbindung vom Schmelzpunkt des Pentosazon, so kann man durch die Elementaranalyse entscheiden, ob eine Pentose vorliegt. Bei einer Verbindung jedoch, welche nach allen ihren Eigenschaften als ein Hexosazon anzusprechen wäre, kann auch durch die Analyse keine Entscheidung herbeigeführt werden, und man wird in solchen irgendwie zweifelhaften Fällen stets bemüht sein müssen, die Anwesenheit von Glycuronsäure auszuschliessen, beziehungsweise zu erweisen. Dass die Glycuronsäure unter Umständen sich auch in Organen findet, erscheint a priori durchaus nicht unwahrscheinlich. Hat ja bereits Hammarsten¹⁾ in seiner Publication über das Nucleoprotein des Pankreas die Frage offen gelassen, ob als Spaltungsprodukt derselben sich neben einer Pentose nicht auch Glycuronsäure findet, da das Verhalten seiner Lösungen in mancher Hinsicht für eine solche Annahme sprach.

Zum Nachweis der Glycuronsäure wird man sich mit Erfolg einer Reaction bedienen, welche von keiner Hexose gegeben wird, nämlich der zuerst von Reichl²⁾ aufgefundenen, später von Allen und Tollens³⁾ beschriebenen Orcinprobe, die von Salkowski und Blumenthal⁴⁾ für den Nachweis

1) Hammarsten, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XIX, 1894, S. 31.

2) Cyrill Reichl, Ber. d. österr. Gesellsch. z. Förderung d. chem. Ind., Bd. 1, 1879.

3) Allen und Tollens, Annalen der Chemie, Bd. 260, S. 305.

4) Salkowski, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXVII, 1899 und Blumenthal, Zeitschr. f. klin. Medicin, Bd. 37, 1899.

der Pentosen im Harn eingeführt wurde, und die ich¹⁾ für die Erkennung der Glycuronsäure im Harn empfohlen habe. Das Phenylhydrazin ist, wie aus meinen Untersuchungen hervorgeht, für die Identificirung der Glycuronsäure nicht brauchbar. Einen hierzu geeigneten Körper hat aber in neuester Zeit C. Neuberg²⁾ in dem Bromphenylhydrazin gefunden, welches mit der Glycuronsäure eine wohl charakterisirte Verbindung eingeht. Durch die Darstellung dieser Bromphenylhydrazin-Verbindung wird sich in Zukunft in allen Fällen der sichere Nachweis erbringen lassen, ob Glycuronsäure vorliegt oder nicht.

¹⁾ P. Mayer, Berl. klin. Wochenschrift, Bd. 27, 1899.

²⁾ C. Neuberg, Ber. d. chem. Gesellschaft, Bd. 32, H. 13, 1899.