

Ueber d-Arabinose, d-Arabonsäure und die quantitative Bestimmung von Arabinose.

Von

C. Neuberg und J. Wohlgemuth.

(Aus dem chemischen Laboratorium des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)
(Der Redaction zugegangen am 15. Februar 1902.)

In der folgenden Mittheilung berichten wir über Versuche, zu denen wir grössere Mengen der 3 Arabinosen und einiger ihrer Derivate benöthigten. Für die Darstellung von l-Arabinose und ihren Abkömmlingen liefert die Natur im Kirschgummi ein ergiebiges und billiges Material: für die Gewinnung von d- und r-Arabinose ist man aber — wenn man von der Pentosurie als Quelle für die racemische Arabinose absieht — auf die synthetische resp. partiell-synthetische Bereitung angewiesen.

Die Beschaffung grösserer Mengen dieser Zucker verursachte insofern Schwierigkeiten, als sich die Unzulänglichkeit der in der Litteratur beschriebenen Methoden für Arbeiten im grösseren Stil herausstellte.

I. Darstellung von d-Arabinose.

Man kennt zur Zeit zwei Wege, welche die synthetische Bereitung von d-Arabinose gestatten, das Abbauverfahren von A. Wohl,¹⁾ welches vom Glucosoxim ausgeht, und die Oxydationsabbaumethode von O. Ruff,²⁾ welche über die d-Gluconsäure führt.

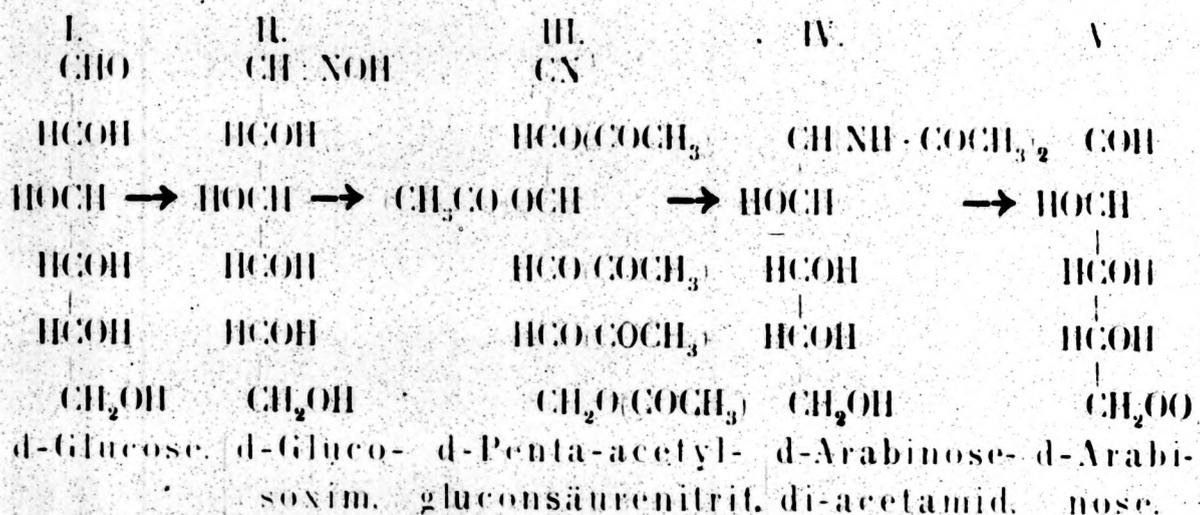
Da uns dieses letztere Verfahren nur schwankende Ausbeuten lieferte, haben wir auf die ältere Methode von Wohl zurückgegriffen, welche von dem Autor bei Anwendung auf

1) Ber. der deutschen chem. Gesellsch., Bd. 26, S. 730 (1893).

2) Ber. der deutschen chem. Gesellsch., Bd. 32, S. 553 (1899).

die niederen Zuckerarten bereits gegenüber den ursprünglichen Angaben verbessert ist, und die noch weit günstigere Resultate gibt, wenn man, wie es hier zuerst geschehen ist, statt der von Wohl angestrebten direkten Reindarstellung des Zuckers, den Weg über das Diphenylhydrazon einschlägt.

Die Phasen der Wohlschen Reaction sind schematisch folgende:



Die Menge Arabinose, die man auf dem ursprünglichen Wege erhält, beträgt ca. 8% der Theorie; die grossen Verluste sind durch die Unmöglichkeit bedingt, einmal die Pentose-di-acetamid-Verbindung (Phase IV) und dann den Zucker selbst (Phase V) von den grossen Mengen gleichzeitig gebildeten essigsäuren Ammons bzw. Acetamids in befriedigender Weise zu trennen.

Diesen Mangel kann man in einfacher Weise auf die angegebene Art, durch den Weg über das Hydrazon, beseitigen. Hierdurch wird nicht einmal die Zahl der erforderlichen Operationen vergrössert, weil die verlustreiche Isolirung der Acetamid-Verbindung (Phase IV) fortfällt; die Ausbeute steigt aber auf das Dreifache, auf fast 35%. Denn man kann annähernd die gesammte gebildete Pentose aus der hydrolysirten Lösung der rohen Diacetamidverbindung als Diphenylhydrazon gewinnen, dessen Abscheidung durch essigsäures Ammon und Acetamid nicht wesentlich erschwert wird. Dieses Hydrazon ist, wie der eine¹ von uns früher gezeigt hat, am besten zur Isolirung von Arabinose geeignet und gestattet die quantitative Regenerirung des Zuckers.

¹ C. Neuberg, Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 33, S. 2243 (1900).

Die Darstellung von d-Arabinose gestaltet sich dann folgendermassen.

α d-Glucosoxim.

In eine zum Sieden erhitzte chlorfreie alkoholische Hydroxylaminlösung, die nach Vorschrift von Wohl und Neuberger¹⁾ aus 280 g salzsaurem Hydroxylamin bereitet ist, rührt man in kleinen Portionen 500 g wasserfreie, feingepulverte Glucose ein, indem man mit jedem neuen Zusatz bis zum völligen Verschwinden des Traubenzuckers wartet. Die klare Flüssigkeit belässt man dann 36 Stunden im Brutschrank bei 40°, giesst von einer geringen, am Glase haftenden klebrigen Ausscheidung ab und engt auf dem Wasserbad zum dünnen Sirup ein.²⁾ Dieser erstarrt nach einiger Zeit von selbst, nach Impfung innerhalb eines Tages zu einem kaum gelblich gefärbten harten Krystallkuchen, der zerkleinert und mit Methylalkohol gewaschen wird. Man erhält dann ein feines Krystallpulver, das ohne jegliche Reinigung (F. 136° statt 137,5°) für die Weiterverarbeitung geeignet ist.

Ausbeute: 520 g, d. i. 96% der Theorie, auf Glucose berechnet.

β) d-Pentaaethylgluconsäurenitril.

Die besten Ausbeuten an dieser Verbindung erhält man, wenn man das Oxim nur in kleinen Mengen der Acetylierung unterwirft.

In die in einem offenen Kolben siedende Lösung von 5 g geschmolzenem essigsäuren Natron in 50 cem. frisch destilliertem Essigsäureanhydrid wirft man 10 g gut getrocknetes Glucosoximpulver, das sich unter heftigem Aufwallen löst. Nach weiterem Sieden von etwa einer Minute ist die Reaction be-

1) Ber. der deutschen chem. Ges., Bd. 33, S. 3105 (1900).

2) Man kann auch, unbeschadet der Ausbeute, die 500 g Traubenzucker vorsichtig mit wenig Wasser zu einem Sirup schmelzen und diesen mit der Hydroxylaminlösung mischen etc.; auch in wässrig-alkoholischer Lösung verwandelt überschüssiges Hydroxylamin die Glucose fast quantitativ in ihr Oxim.

endet: man giesst sofort in 150 ccm. kaltes Wasser und neutralisirt mit concentrirter Sodalösung. Durch Abgiessen und Decantiren wäscht man die klebrige Masse, die an den Gefässwandungen haftet, löst sie dann in der gerade nöthigen Menge heissen 60^o igeu Alkohols und entfärbt mit Knochenkohle: aus dem Filtrat krystallisiren dann ca. 10 g Pentaacetylgluconsäurenitril = ca. 50^o der Theorie.

γ) d-Arabinosediphenylhydrazon.

Zu einer erkalteten Lösung von 100 g d-Pentaacetylgluconsäurenitril in 280 ccm. Alkohol von 96^o fügt man eine Lösung von 34 g Silberoxyd (bereitet aus ca. 50 g AgNO₃) in 500 ccm. wässrigem Ammoniak von 30^o. Nach 48stündigem Stehen entfernt man das krystallinisch abgeschiedene Silbercyanid durch Filtration, vertreibt das Ammoniak durch Concentration im Vacuum auf etwa $\frac{1}{3}$ des ursprünglichen Volumens, filtrirt und füllt mit Wasser wieder zu ca. 500 ccm. auf. Nach Fällung des gelösten Silbers durch Schwefelwasserstoff kann die resultirende Lösung von d-Arabinose-diacetamid ohne die verlustreiche Isolirung dieser Substanz direkt zur Darstellung der Pentose, zunächst in Form ihres Diphenylhydrazons, dienen.

Zu diesem Zweck wird die Flüssigkeit, deren Volumen ca. $\frac{1}{2}$ l. betragen soll, zur Entfernung des Schwefelwasserstoffs aufgeköcht und mit 100 ccm. rauchender Salzsäure (von 37^o) etwa $\frac{3}{4}$ Stunde im Wasserbad erhitzt: dabei wird die Acetamidverbindung im Wesentlichen in Zucker und essigsaures Ammon gespalten. Man neutralisirt noch heiss mit reinem, zuvor in Wasser aufgeschlemmtem Bleicarbonat und filtrirt nach völligem Erkalten. Die klare Lösung wird dann auf dem Wasserbad auf etwa 250 ccm. eingedampft und mit dem gleichen Volumen heissen Alkohols von 96^o versetzt; dadurch fallen einige flockige Verunreinigungen und Chlorblei aus, von denen man nach zweistündigem Stehen abfiltrirt.

Zu der schwach gelblichen Arabinoselösung, die bereits durch das kohlensaure Blei hinreichend entfärbt ist, fügt man dann eine concentrirte alkoholische Lösung von Diphenyl-

hydrazin,¹⁾ dessen Menge man durch Fällung einer Probe oder durch polarimetrische Bestimmung berechnet.

Beim Erhitzen auf dem Wasserbade beginnt alsbald die Abscheidung des Hydrazons, dessen Menge nach 30 Minuten in der Wärme nicht mehr zunimmt. Nach zwölfstündigem Stehen saugt man ab und wäscht mit kaltem gewöhnlichen Alkohol aus: dabei bleibt das Hydrazon weiss und vollständig rein zurück.

Ausbeute: 62,3 g = 76%,₀ der Theorie.

0,2071 g Substanz gaben 0,4902 CO₂ und 0,1208 H₂O.

0,2308 „ „ „ 18 ccm. N bei 18° und 750 mm.

Daraus ergibt sich: C = 64,41; H = 6,48, N = 8,89.

Berechnet für CH₂·OH-CH·OH-CH·OH-CH·OH-CH·N : N(C₆H₅)₂
= C₁₇H₂₀N₂O₄: C = 64,56%, H = 6,33%, N = 8,87%.

Das Hydrazon schmilzt (schnell erhitzt) bei 216—218° und gleicht in allen Stücken dem früher beschriebenen l-Arabinosediphenylhydrazon.²⁾

Wie die Analyse zeigt, ist das Diphenylhydrazon bei genauer Einhaltung der gegebenen Vorschriften ohne Weiteres rein und zur Weiterverarbeitung geeignet. Dieses ist deshalb wünschenswerth, weil das Hydrazon in allen in Betracht kommenden Solventien, selbst in Pyridin, ausserordentlich schwer löslich ist, sodass zur Reinigung grösserer Mengen durch Umkrystallisiren sehr unbequeme Flüssigkeitsquanten nothwendig werden. Es erfordert nämlich zur Lösung (bei 15°):

0,1 g d-Arabinosediphenylhydrazon: 400 ccm. H₂O.

600 ccm. abs. Alkohol.

310 ccm. Pyridin.

1) Statt der freien Base kann man auch ihr beständiges und käufliches salzsaures Salz verwenden und folgendermassen verfahren: Zu der concentrirten Lösung des Diphenylhydrazinchlorhydrats in heissem Wasser setzt man die äquivalente Menge krystallisirtes Natriumacetat; dabei scheidet sich die freie Hydrazinbase in Oeltröpfchen ab, die man durch Zusatz von absolutem Alkohol wieder in Lösung bringt. Letztere kann dann ebenso gut wie reines Diphenylhydrazin verwendet werden, da Salze die Abscheidung des Arabinosediphenylhydrazons kaum beeinträchtigen, ein bei der Hydrazonbildung von Zuckern seltener Fall.

2) C. Neuberg, Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 33, S. 2243 (1900).

Die Darstellung der reinen

δ) d-Arabinose

aus dem Hydrazon gelingt leicht mit der kleinen, von einem von uns bei der Harnpentose angegebenen Abänderung nach dem Formaldehydverfahren¹⁾ oder mittelst Benzaldehyd.²⁾ Der Sirup, der in beiden Fällen resultirt, erstarrt von selbst in ein bis zwei Tagen, nach dem Impfen in einigen Stunden, wenn man ihn in einen Vacuumexsiccator über concentrirte Schwefelsäure stellt. Nach einmaligem Umkrystallisiren aus 90%igem Alkohol erhält man annähernd die berechnete Menge reiner d-Arabinose.

1 g Diphenylhydrazon lieferte 0,45 g krystallisirten Zucker = 95% der Theorie.

Die schliessliche Ausbeute an d-Arabinose beträgt, auf den angewandten Traubenzucker bezogen, also: 0,95. 0,76. 0,50. 96 = 34,7% der Theorie, d. h. man erhält durchschnittlich $\frac{1}{3}$ der Arabinosemenge, die aus dem Ausgangsmaterial überhaupt entstehen kann.

II. Darstellung von d-Arabonsäure.

Emil Fischer hat gelegentlich der Configurationsbestimmung der optisch activen Weinsäuren³⁾ gezeigt, dass die Wohlschen Acetamidverbindungen der Zucker direkt in die zweibasischen Säuren der Kohlehydrate übergeführt werden können, die sich in Form der unlöslichen Bleisalze dem Gemisch der Reactionsprodukte entziehen lassen.

Dagegen gelingt die Darstellung der Monocarbonsäure aus der hydrolysirten Diacetamidverbindung des Zuckers nicht, wie Wohl und List⁴⁾ am Beispiel der Lyxonsäure gezeigt haben, da sich das gesuchte Oxydationsprodukt nicht von gleichzeitig gebildeten Substanzen trennen lässt.

Günstiger liegen die Verhältnisse bei der d-Araban-

1) Ruff u. Ollendorff, ebendas. Bd. 32, S. 3234 (1899).

2) A. Herzfeld, ebendas. Bd. 28, S. 442, u. Annalen der Chemie, Bd. 288, S. 145.

3) Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 29, S. 1379. 1896.

4) Ebendas., Bd. 30, S. 3107. (1897.)

säure: da ihr Kalksalz durch grosse Krystallisationsfähigkeit ausgezeichnet ist und sich deshalb von Nebenprodukten befreien lässt, kann man auch hier die Reindarstellung der Diacetamidverbindung umgehen. Man verfährt zweckmässig folgendermassen:

Die Lösung von roher Diacetamidverbindung, die man in der beschriebenen Weise aus 50 g d-Pentaacetylgluconsäurenitril durch Behandlung mit ammoniakalischem Silberoxyd und dann mit Schwefelwasserstoff erhält (250 ccm.), wird durch halbstündiges Erwärmen auf 100° mit 120 ccm. rauchender Bromwasserstoffsäure ($D = 1,49$) hydrolysiert. Nach dem Erkalten setzt man 45 g Brom zu und beschleunigt seine Auflösung durch Schütteln. Nach zwei Tagen vertreibt man das überschüssige Brom durch einen Luftstrom, zuletzt durch Aufkochen und entfernt die Hauptmenge des gesammten Bromwasserstoffs durch aufgeschlämmtes Bleicarbonat, den Rest mittelst Silberoxyd. Nach Ausfällung der gelösten Metalle mit Schwefelwasserstoff sättigt man in der Siedehitze mit kohlensaurem Kalk, filtrirt und engt auf 100 ccm. ein. Durch Zusatz von 200 ccm. gew. Alkohol fällt man das arabonsaure Calcium als amorphe Masse, die durch nochmalige Lösung und Ausfällen mit Alkohol gereinigt wird. Man löst schliesslich in 100 ccm. Wasser, entfärbt heiss mit Knochenkohle und rekt die auf 60 ccm. eingeeengte Lösung mit einigen Krystallen reinen d-arabonsauren Kalks an, worauf nach einigen Tagen das reine Salz in blumenkohlähnlichen Massen auskrystallisirt.

Ausbeute: 21 g, d. i. 70% der Theorie, auf Pentaacetylgluconsäurenitril berechnet.

III. Quantitative Bestimmung von Arabinose.

Trotz der zahlreichen Mittheilungen von Tollens und seinen Mitarbeitern über die quantitative Bestimmung der Pentosen fehlt es bislang an einer Methode, welche die quantitative Bestimmung von Arabinose allein in Gegenwart anderer Kohlehydrate der 5-Kohlenstoffreihe gestattet. Jene erwähnten Verfahren beruhen sämmtlich auf Ermittlung des Furfurols, das durch Kochen mit Säuren zwar

aus allen Pentosen und der Glucuronsäure, wie aus den Substanzen, die durch Hydrolyse in jene übergehen (Pentosane und gepaarte Glucuronsäuren), aber in sehr wechselnder Menge entsteht.

Liegen nun Gemische dieser Substanzen vor, wie es bei Naturprodukten pflanzlichen und thierischen Ursprungs die Regel ist, so ist man auf mehr oder minder willkürliche Schätzungen angewiesen.

Zu unseren Versuchen, die wir in der folgenden Abhandlung mittheilen, haben wir eine neue, auf anderer Grundlage beruhende Methode ausgearbeitet, die sich gut bewährt hat. Sie besteht in der Abscheidung der Arabinose als Diphenylhydrazon, die unter bestimmten Verhältnissen annähernd quantitativ erfolgt. Die folgenden Angaben beziehen sich auf die quantitative Bestimmung von Arabinose im Harn; bei Abänderung der Besonderheiten, welche durch diese Flüssigkeit geboten sind, ist das Verfahren natürlich allgemeiner Anwendung fähig.

Die Ausführung der Methode sei zugleich mit den Beleganalysen beschrieben:

α) 100 ccm. Harn, in denen 1,0000 l. Arabinose gelöst waren, werden mit 2 Tropfen 30%iger Essigsäure angesäuert, auf dem Wasserbad auf 40 ccm. eingedampft und mit 40 ccm. heissen Alkohols von 96%o versetzt. Man lässt erkalten und 2 Stunden stehen, dann filtrirt man von den ausgeschiedenen Uraten und anorganischen Salzen ab und wäscht sorgfältig mit 40 ccm. Alkohol von 50%o nach. Zu dem Filtrat setzt man 1,4 g reines Diphenylhydrazin und erwärmt in einem nicht zu kleinen Becherglase 1/2 Stunde im siedenden Wasserbad, wobei man durch Ersatz des verdampfenden Spiritus einer Entmischung der Flüssigkeit vorbeugt. Nach 24 Stunden filtrirt man die ausgeschiedene Krystallmasse in einem Gooch-Tiegel, indem man zunächst immer die Mutterlauge zum Nachspülen verwendet, und wäscht schliesslich mit 30 ccm. 30%igen Alkohols aus, der die Verbindung blendend weiss zurücklässt. Der Gooch-Tiegel wird sodann bei 80° im Trockenschrank zur Gewichtskonstanz getrocknet, wobei das

Hydrazon höchstens einen schwach violetten Schimmer annehmen darf.

Es wurden gefunden: 2,1055 g Hydrazon, entsprechend 0,9993 g l-Arabinose = 99,93% der angewandten Menge.

β) In 50 cem. Harn wurden 0,4820 g d-Arabinose gelöst, dann wurde auf 20 cem. eingedampft und entsprechend den unter α) gemachten Angaben verfahren. Nach Zusatz von 0,8 g Diphenylhydrazin u. s. w. wurden erhalten: 1,0136 g Hydrazon, entsprechend 0,4810 g d-Arabinose = 99,80% der angewandten Menge.

γ) 100 cem. Harn, der 1,5 g r-Arabinose enthielt, wurden auf 40 cem. eingedampft und nach entsprechender Behandlung mit 2 g Diphenylhydrazin versetzt. Es wurden gewogen: 3,1593 g Hydrazon, entsprechend 1,5009 g r-Arabinose = 100,06% der angewandten Menge.

Da 150 g Arabinose theoretisch 316 g Diphenylhydrazon liefern, erhält man allgemein durch Multiplication mit 0,4747 oder Division durch 2,107 aus dem Hydrazon die entsprechende Menge Arabinose.

Diese Methode, die in gleicher Weise bei d-, l- und r-Arabinose anwendbar ist, kann, wie wir uns durch besondere Versuche überzeugt haben, allgemein zur Bestimmung dieser Zucker im Gemisch mit beliebigen Kohlehydraten dienen. Das ist selbstverständlich bei Pentosanen, gepaarten Glucuronsäuren und bei allen Verbindungen, die keine mit Diphenylhydrazin reagirende Gruppe enthalten: andere Zucker¹⁾ stören meist deshalb nicht, weil die Zeit der Hydrazonbildung bei ihnen grösser ist, oder die Hydrazone in verdünntem Alkohol leicht löslich sind.

Allgemein ist zu bemerken, dass die Menge des zugesetzten²⁾ Diphenylhydrazins zur Bindung aller vorhandenen Aldo- resp. Ketozucker genügen muss, da sonst eine Theilung

1) Hat man eine überwiegende Menge Mannose neben wenig Arabinose, so findet man leicht zuviel Hydrazon.

2) Durch Polarisation oder Titration annähernd zu ermitteln.

des Hydrazins unter sämtliche Zucker erfolgt und die Ausscheidung der Arabinoseverbindung unvollständig bleibt.

Besonders glatt lässt sich nach dieser Methode die sonst nur schwierig ausführbare Trennung von Arabinose und Xylose¹⁾ erreichen, selbst wenn der Holzzucker in überwiegender Menge vorhanden ist.

Zum Beweise des Gesagten mögen folgende Daten dienen: 100 cem. einer Lösung, die 1,0 g Glucose, 1,0 g Fructose, 1,5 g Xylose, 0,5 g Glucuronsäurelacton und 1,0066 g l-Arabinose enthielt, wurde auf dem Wasserbade auf 30 cem. eingedampft und mit einer Lösung von 6 g Diphenylhydrazin in 50 cem. 96%igen Alkohols eine halbe Stunde unter Ersatz des verdampfenden Spiritus im Sieden erhalten, nach 24 Stunden in einen Gooch-Tiegel abfiltrirt, mit 50 cem. Alkohol von 50%_o gewaschen und getrocknet. Gefunden 2,1143 g Hydrazon, entsprechend 1,0035 g Arabinose, d. i. 99,70%_o der angewandten Menge.

Voraussetzung bei Anwendung der Methode ist immer, dass der Gehalt an Arabinose nicht geringer als etwa 1%_o ist. Verdünntere Lösungen, so in der Regel genuiner Pentoseharn bei Pentosurie, müssen zuvor im Vacuum concentrirt werden.

¹⁾ Das bisher nicht erhaltene l-Xylosediphenylhydrazon wird folgendermassen dargestellt:

Man dampft eine concentrirte wässrige Lösung von l-Xylose (1,5 g) mit einer Lösung von 1,9 g Diphenylhydrazin in 30 cem. absoluten Alkohols mehrmals unter Ersatz des verdampfenden Alkohols auf dem Wasserbade ein und stellt den Sirup über Schwefelsäure in einen Vacuumexsiccator, worauf er schnell erstarrt.

Die abgesaugte Krystallmasse wird aus 40%igem Alkohol umkrystallisirt, wobei ein Theil stets als bald erstarrendes Oel ausfällt. Glänzende, schwach gelbe Plättchen vom Schmelzpunkt 128°.

Wenig löslich in kaltem, leichter in heissem Wasser, leicht in Methyl- und Aethylalkohol, Chloroform, heissem Toluol, Aceton und Essigester, unlöslich in Schwefelkohlenstoff, Ligroin und Aether.

In rein weissen Nadelchen erhält man die Substanz beim Umkrystallisiren der gelben Krystalle aus einem Gemisch von $\frac{5}{6}$ Ligroin und $\frac{1}{6}$ Pyridin.