

Neue Reaktionen und Derivate der Glukuronsäure.¹⁾

VII. Mitteilung über Glukuronsäure.²⁾

Von

Carl Neuberg und Wilhelm Neimann.

(Aus dem chemischen Laboratorium des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 10. Februar 1905.)

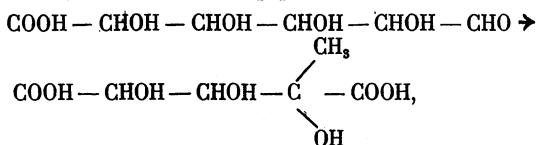
Durch Untersuchungen von Neuberg und Mayer über das Schicksal der stereoisomeren Mannosen im Tierkörper hat sich ergeben, daß die bekannte von Lobry de Bruyn und A. van Eckenstein aufgefundenene, unter dem Einfluß von Hydroxylionen vor sich gehende gegenseitige Umwandlung der Zucker in einander auch im lebenden Organismus statthaben kann. Bei der weiten Verbreitung der Glukuronsäure ist es denkbar, daß auch diese chemisch wie physiologisch den Kohlehydraten nahestehende Substanz ähnlichen Umwandlungen unterworfen ist.

Es wurde deshalb die Einwirkung von Alkalien auf Glukuronsäure zum Gegenstande einer Untersuchung gemacht, die aber bei der Schwierigkeit, die entstehenden Produkte von einander und dem Ausgangsmaterial zu trennen, bisher zu wenig befriedigenden Ergebnissen geführt hat. Dagegen glückte es, bei der Einwirkung von Kalk zu definierten Produkten zu gelangen. Unter dem Einflusse von Calciumhydroxyd erleidet nämlich die Glukuronsäure eine Umwandlung, welche der bekannten besonders

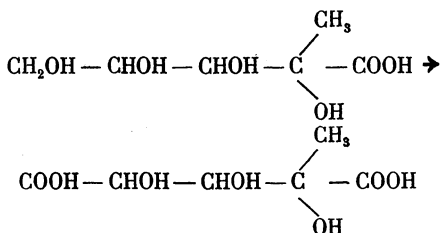
¹⁾ Vorgetragen in der Sitzung der Deutschen chemischen Gesellschaft vom 25. Januar 1904.

²⁾ Die früheren Mitteilungen siehe: 1. Ber., Bd. XXXII, S. 2395 (1899); 2. Diese Zeitschrift, Bd. XXIX, S. 256 (1900); 3. Ber., Bd. XXXIII, S. 3315 (1900); 4. Zentralblatt f. d. medicin. Wissenschaften, 1902, Nr. 32; 5. Diese Zeitschrift, Bd. XXXVI, S. 261 (1902); 6. Ergebnisse der Physiologie, Bd. III, S. 373—452 (1904).

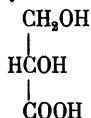
von Kiliani¹⁾ aufgeklärten Saccharinbildung des Traubenzuckers analog ist. Als Hauptprodukt der Reaktion entsteht



eine Dikarbonsäure, welche mit der von Kiliani durch Oxydation des Saccharins mit Salpetersäure erhaltenen Saccharonsäure



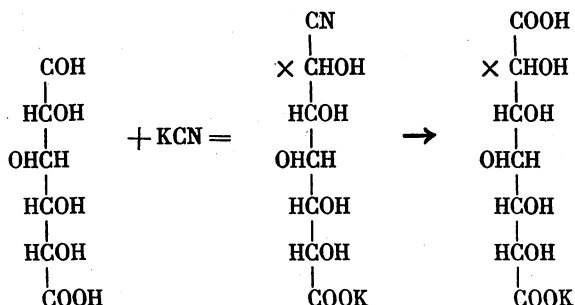
identisch ist. Genau wie bei der Saccharinumlagerung der Glukose wird auch hier eine Reihe anderer Säuren als Nebenprodukte erhalten, unter denen l-Glyzerinsäure



hat nachgewiesen werden können.

Von den in der Zuckerreihe mit so großem Erfolge angewandten Methoden des Zuckerauf- und -abbaues durch Anlagerung resp. Fortnahme der Elemente der Blausäure ist bisher nur der letztere Versuch auf Glukuronsäure übertragen worden. Es wurde daher auch die Einwirkung von Blausäure auf Glukuronsäure untersucht. Diese Anlagerung erreicht man nach unseren Erfahrungen am leichtesten durch Einwirkung eines geringen Überschusses von Cyankalium. Das entstehende Nitril haben wir nicht zu isolieren versucht, vielmehr durch Verseifung des Rohproduktes direkt eine Pentaoxypimelinsäure erhalten. Ein Blick auf die Formeln

¹⁾ H. Kiliani, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XV, S. 701 u. 2957.
H. Kiliani, Annalen, Bd. CCXVIII, S. 361.



lehrt, daß nach der Theorie die Entstehung zweier Säuren zu erwarten ist, indem das die Synthese vermittelnde Kohlenstoffatom (in den Formeln mit \times versehen) asymmetrisch wird. In reinem Zustande haben wir jedoch nur eine dieser Säuren erhalten können, und zwar die α -Säure. Diese ist identisch mit der Dikarbonsäure, welche zuerst Kiliani¹⁾ durch Oxydation der α -Glukosekarbonsäure und dann Emil Fischer²⁾ durch die der α -Glukoheptose selbst mit Salpetersäure erhielt. Es muß dahingestellt bleiben, ob hier tatsächlich, ähnlich wie bei der Blausäureanlagerung an Mannose,³⁾ ein asymmetrischer Verlauf der Synthese vorliegt oder ob die Isolierungsmethode hieran Schuld trägt.

Nicht unerwähnt möge bleiben, daß merkwürdigerweise freie Glukuronsäure und freie Blausäure selbst bei monatelanger Berührung nicht aufeinander einwirken und auch ein geringer Zusatz von Ammoniak hieran nichts ändert, da dieses infolge Bindung an die Karboxylgruppe der Glukuronsäure nicht wie bei den Zuckern als Überträger wirken kann.

Durch neuere Untersuchungen von N. Schoorl⁴⁾ ist bekannt geworden, daß fast alle Zucker die Fähigkeit besitzen, mit Harnstoff zu Verbindungen zusammenzutreten. Es war nun von besonderem Interesse, zu untersuchen, ob auch die

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XIX, S. 1917.

²⁾ Annalen, Bd. CCLXX, S. 64.

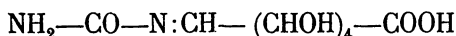
³⁾ E. Fischer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXII, S. 365; Bd. XXIII, S. 2226.

⁴⁾ Koninkl. Acad. von Weetenschappen te Amsterdam 1901 (10. Januar). Rec. d. trav. chim. d. Pays-Bas, Bd. XXII, S. 31 (1903).

Glukuronsäure hierzu befähigt ist. Denn die physiologischen Bedingungen für das Zustandekommen einer solchen Verbindung sind durchaus vorhanden. In der Tat gelingt es, Glukuronsäure und Harnstoff zu einer Verbindung zu vereinigen.

Läßt man im Brutschrank äquimolekulare Mengen von Glukuronsäure und Harnstoff unter Zusatz von fünfprozentiger Schwefelsäure stehen, so kann man bereits nach einigen Tagen eine Abnahme des Drehungsvermögens feststellen, welches jedoch erst nach mehrmonatlichem Stehen einen konstanten Wert erreicht. So leicht sich durch diese physikalischen Daten der Eintritt der Reaktion erkennen ließ, so bedeutende Schwierigkeiten machte die Isolierung und Reindarstellung der entstehenden Verbindung, welche schließlich in Form des Baryumsalzes gelang.

Die freie Ureïdoglukuronsäure neigt, wie zu erwarten war, zum Zerfall in die Komponenten, der langsam von selbst und leicht durch Hydrolyse mit verdünnten Mineralsäuren eintritt. Bemerkenswerterweise drehen die freie Harnstoffglukuronsäure sowie ihre Salze im Gegensatz zur freien Glukuronsäure links und zeigen somit ein Verhalten, wie es den eigentlichen gepaarten Glukuronsäuren eigen ist. Während diese aber nach dem Glykosid-Typus konstituiert sind (s. u.), entspricht die Ureïdoglukuronsäure dem Aldehydimin-Typus, da ihr nach der Synthese unzweifelhaft die Formel



zukommt.

Die Eigenschaften dieser Säure machen es nun wahrscheinlich, daß sie unter Umständen im Harn auftritt — wenigstens erklären ihre Eigenschaften (s. exper. Teil) in ungezwungener Weise eine ganze Anzahl merkwürdiger Harnbefunde, nämlich die Fälle, bei denen man eine Ablenkung der Polarisationssebene nach links konstatiert, die von selbst oder durch kurze Säurespaltung in eine solche nach rechts umschlägt, ohne daß man imstande wäre, die Vermehrung irgend eines der typischen Glukuronsäurepaarlinge (Phenol oder Indoxyl) nachzuweisen.

Die Existenz einer Harnstoffglukuronsäure ist gelegentlich bei klinischen Untersuchungen behauptet worden, ohne daß aller-

dings der Schatten eines Beweises für ihr Vorkommen bisher geliefert wäre; auch scheint bei ihrer Zersetzlichkeit die Aussicht gering, daß ihre Reindarstellung aus Produkten physiologischer Herkunft je möglich sein werde.

Der exakte Nachweis der Glukuronsäure bietet bekanntlich erhebliche Schwierigkeiten. Zur Zeit ist die Erkennung mit Hilfe der charakteristischen Bromphenylhydrazinverbindung¹⁾ die relativ leichteste und sicherste. Bei der vielfachen Anwendung des gewöhnlichen Phenylhydrazins zum Nachweise der Zuckerarten war es wünschenswert, das Verhalten der Glukuronsäure zu Phenylhydrazin aufzuklären.

Aus kristallisiertem Glukuronsäurelaktone und der berechneten Menge Phenylhydrazin hat Giemsa²⁾ das Hydrazone des Glukuronsäureanhydrids dargestellt; allein in praxi hat man es niemals mit reinem kristallisiertem Glukuronsäurelaktone, sondern mit mehr oder minder verunreinigten Lösungen der freien Säure zu tun, aus denen die erwähnte Darstellung des Hydrazons nicht möglich ist. Aus solchen Lösungen Phenylhydrazinderivate der Glukuronsäure darzustellen, hat sich eine ganze Reihe von Autoren bemüht.

Zuerst gelang es Thierfelder,³⁾ eine bei 114° schmelzende Verbindung beim Kochen von Glukuronsäure mit essigsaurem Phenylhydrazin darzustellen, welche auf ein Mol. Glukuronsäure zweieinhalb Mol. Phenylhydrazin enthielt und deshalb kaum eine einfache Verbindung vorstellen kann. Sodann hat P. Mayer⁴⁾ gezeigt, daß man je nach den Mengenverhältnissen aus Phenylhydrazin und Glukuronsäure drei Produkte erhalten kann, welche bei 105—110°, 199—205°, 159—164° schmelzen, aber gleichfalls keine einheitlichen Verbindungen ergeben. Da die Schmelzpunkte der beiden letztgenannten Substanzen ganz in der Nähe derjenigen von Pentosazon und Glukosazon liegen und demnach bei Schmelzpunktsbestimmungen

¹⁾ C. Neuberg, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXII, S. 2395 (1899).

²⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXIII, S. 2996 (1900).

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XI, S. 395.

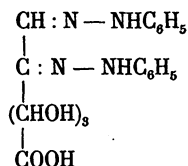
⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXIX, S. 59.

Berlin. Klin. Wochenschrift (1899), Nr. 27 u. 28.

leicht zu Verwechslungen Anlaß geben können, so erheischen diese Verhältnisse besondere Beachtung.

Durch einen kleinen Kunstgriff gelang die Reindarstellung des bisher unbekannten eigentlichen Glukuronsäureosazons auf folgende Weise:

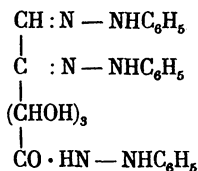
Läßt man ein Mol. Glukuronsäure mit drei Mol. Phenylhydrazin oder mehr im Brutschrank stehen, so tritt nach zwölf bis vierundzwanzig Stunden (je nach Konzentration) eine Abscheidung von schön gelben Kristallen ein, welche aus Knollen oder Büscheln bestehen und deren Menge sich nach drei bis vier Tagen nicht mehr vermehrt. Die Verbindung, aus verdünntem Alkohol umkristallisiert, schmilzt bei 200—205° und gibt sich durch die Analyse und Eigenschaften als Osazon der Glukuronsäure



zu erkennen. Es ist uns unmöglich gewesen, diese Verbindung, die dem Glukosazon zum Verwechseln ähnlich ist, auf dem üblichen Wege der Osazondarstellung durch Erwärmen auf dem Wasserbade in reinem Zustande zu erhalten, da sie unzweifelhaft mit einer oder mehreren der zahlreich möglichen Verbindungen der Glukuronsäure mit Phenylhydrazin gemischt ist.

Von diesen letztgenannten Substanzen konnten wir eine bisher unbekannte darstellen, und zwar ausgehend von dem eben erwähnten Osazon.

Erhitzt man ein Mol. Glukuronsäureosazon mit der zwanzigfachen Menge Alkohol und 1,2 Mol. Phenylhydrazin zwei Stunden im geschlossenen Rohre auf 150°, so entsteht das Osazonhydrazid:



Dieses ist erheblich schwerer löslich als das Osazon und scheidet sich daher beim Erkalten des Röhreninhalts direkt aus; durch Kristallisation aus pyridinhaltigem Alkohol kann es leicht rein erhalten werden.

Die Verbindung ist wie das Osazon gelb gefärbt und schmilzt bei ca. 212° unter lebhafter Gasentwicklung. Zum Nachweise der Glukuronsäure ist aber weder diese Verbindung noch das Osazon geeignet, und es muß nach den gemachten Erfahrungen ihre Darstellung aus unreinen Lösungen als völlig unmöglich bezeichnet werden.

Experimenteller Teil.

Einwirkung von Kalk auf Glukuronsäure.

Eine Lösung von 50 g Glukuronsäure in 300 ccm Wasser wurde mit 30 g Kalkhydrat versetzt und in verschlossener Flasche aufbewahrt. Nach dreimonatlichem Stehen bei Zimmertemperatur, während welcher Zeit eine merkliche Sauerstoffabsorption stattgefunden und sich eine Schicht eines voluminösen Kalksalzes abgelagert hatte, war das Reduktionsvermögen noch nicht geschwunden; die gesamte Flüssigkeit wurde deshalb noch einen Monat im Brutschrank bei 40° unter häufigem Umschütteln belassen, und nunmehr war vollständiger Verlust des Reduktionsvermögens eingetreten. Das Reaktionsgemisch wurde sodann ohne voraufgegangene Filtration zum Sieden erhitzt und mit Kohlensäure bis zum Eintritt der neutralen Reaktion behandelt. Das dunkelgelb gefärbte Filtrat der unlöslichen Kalksalze wurde auf etwa 50 ccm eingedampft und der fraktionierten Fällung mit Bleiacetat (Niederschlag I), Bleiessig (Niederschlag II) und Bleiessig unter Zusatz von Ammoniak (Niederschlag III) unterzogen. Die gut ausgewaschenen Bleiniederschläge wurden hierauf einzeln mit Schwefelwasserstoff, anfangs in der Kälte, schließlich in der Siedehitze behandelt und die Filtrate vom Schwefelblei auf dem Wasserbade eingeeengt. Dabei ergab die Bleizuckerfällung einen Sirup, der nach kurzem Stehen im Exsikkator fast vollständig kristallisierte. Die abgeschiedenen Kristalle wurden durch Streichen auf Ton von der zähen, braunen Mutterlauge befreit und ergaben nach Kristallisation, erst aus

Alkohol und dann aus heißem Wasser unter Zusatz von Knochenkohle eine nicht unbeträchtliche Menge (ca. 2 g) harter glasglänzender Kristalle.

Die Analyse ergab, daß die Verbindung 1 Mol. Kristallwasser enthält, welches im Vacuum bei 70° entweicht.

0,1830 g Substanz	verloren 0,0172 g H ₂ O
0,1515 „	„ : 0,2066 g CO ₂ und 0,0737 g H ₂ O
$C_6H_8O_6 + H_2O$	Berechnet: H ₂ O = 9,28; C = 37,11; H = 5,15%
	Gefunden : H ₂ O = 9,40; C = 37,22; H = 5,41%

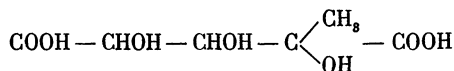
Die Verbindung ist optisch aktiv und zwar ist

$$[\alpha]_D = -5,99^\circ$$

$$(\alpha = -0,9^\circ; c = 15,2; l = 1)$$

Der Schmelzpunkt liegt bei 154—156° nach vorherigem Sintern.

Nach diesen physikalischen und chemischen Eigenschaften kann kein Zweifel bestehen, daß die Substanz mit dem Saccharon identisch ist, das Kiliani¹⁾ durch Oxydation des Saccharins mit Salpetersäure erhalten hat. Den Schmelzpunkt dieser Verbindung gibt Kiliani zu 156° an; er fand die Substanz gleichfalls linksdrehend ($[\alpha]_D = -6,1^\circ$) und nach der Formel $C_6H_8O_6 + H_2O$ zusammengesetzt. Die Substanz ist demnach das Anhydrid der sogenannten Saccharonsäure, der die Formel



zukommt.

Der Bleiessigniederschlag lieferte nach der Zerlegung und Konzentration des Filtrates vom Schwefelblei im Vacuum nur eine relativ geringe Menge (0,5 g) eines Sirups, welcher nach längerem Verreiben im Exsikkator von selber kristallisierte. Er war leicht löslich in Alkohol, etwas schwerer in Äther; der Verdampfungsrückstand des ätherischen Auszuges schied nach längerem Stehen spärliche Kristalle aus, deren Menge zur Analyse zu gering war. Aus dem amorphen Anteile haben wir irgend welche kristallisierbaren Salze nicht gewinnen können.

Der Bleiessigammoniakniederschlag ergab bei gleicher Behandlung einen ebenfalls nicht kristallisierenden Sirup, welcher

¹⁾ H. Kiliani, Annalen d. Chemie, Bd. CCXVIII, S. 363.

leicht in Alkohol, aber kaum in Äther löslich war. Von diesem ausgehend gelang es aber, ein kristallisierendes Salz herzustellen. Zu dessen Bereitung wurde der gesamte Sirup, etwa 3 g, in 60 cm gelöst und einige Zeit unter Ersatz des verdampfenden Wassers mit Kupferkarbonat gekocht. Aus der filtrierten und auf etwa 10 ccm eingeeengten Flüssigkeit schieden sich auf Zusatz der gleichen Menge absoluten Alkohols nach mehrstündigem Stehen in reichlicher Menge Kristalle von blaugrüner Färbung ab, die nach einigen Tagen abgesaugt und mit Alkohol gewaschen wurden. Durch Lösen in Wasser und Kristallisation aus der mit Alkohol versetzten Lösung wurden sie rein erhalten. Die bei 100° getrocknete Verbindung ergab bei der Analyse Zahlen, nach denen sie als glycerinsaures Kupfer¹⁾ zu betrachten ist.

0,1808 g Substanz: 0,1735 g CO₂ und 0,0636 g H₂O
und 0,0529 g CuO als Rückstand (= 0,0423 g Cu)

0,2006 g Substanz: 0,0577 g CuO (= 0,0462 g Cu)

(C₃H₅O₄)₂Cu

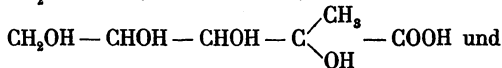
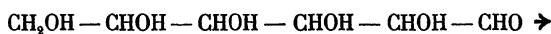
Berechnet: Cu = 23,08; C = 26,36; H = 3,67%

Gefunden: Cu = 23,03; C = 26,21; H = 3,92%

Cu = 23,41%.

Durch Behandlung des Kupfersalzes mit überschüssigem Barytwasser, Behandlung des Filtrats vom Cu(OH)₂ mit CO₂ und Konzentration der vom Baryumkarbonat abfiltrierten Flüssigkeit wurde ein glycerinsaures Baryum erhalten, dessen Lösung rechts drehte.²⁾ Die entstandene Glyzerinsäure selbst ist die l-Form (vergl. Seite 138).

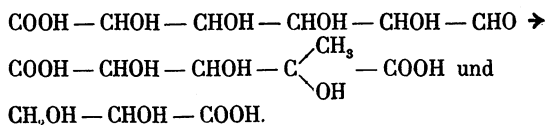
Die Einwirkung von Kalk auf Glukuronsäure vollzieht sich, soweit man aus den isolierten Produkten schließen kann, analog der von Kalk auf Traubenzucker. Hierbei entstehen bekanntlich als Hauptprodukte der Reaktion Saccharin und Milchsäure:



¹⁾ Huppert, Chem. Zentralbl., 1863, S. 835.

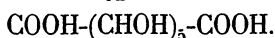
²⁾ Ber., Bd. XXXVII, S. 349.

In ähnlicher Weise entstehen aus der Glukuronsäure das Saccharon bzw. Saccharonsäure und Glycerinsäure



Einwirkung von Cyankalium auf Glukuronsäure.

Pentaoxypimelinsäure.



Wie schon hervorgehoben ist, reagieren Blausäure und freie Glukuronsäure bzw. Lösungen ihres Laktone nicht aufeinander, selbst nicht nach Zusatz einer kleinen Menge Ammoniak.¹⁾ Dagegen kann man die Anlagerung der Blausäure durch Einwirkung von Cyanammonium auf glukuronsaures Ammon, d. h. mit Ammoniak neutralisierte Glukuronsäure erreichen; am einfachsten aber gelingt die Prozedur bei Anwendung von freier Glukuronsäure und Cyankalium.

Zur Ausführung dieses Versuches wurden 26 g Glukuronsäure und 8 g Cyankalium in ca. 100 ccm Wasser gelöst und so lange bei gewöhnlicher Temperatur stehen gelassen, bis jede Reduktion verschwunden war, was eine Zeit von 10—14 Tagen erforderte. Das dickflüssige Reaktionsgemisch wurde sodann mit verdünnter Essigsäure bis zur deutlich saueren Reaktion versetzt und zur Vertreibung überschüssiger Blausäure, sowie zum Zwecke gleichzeitiger Verseifung des primär entstandenen Nitrils bzw. Amids einige Zeit über freier Flamme gekocht. Nach dem Verschwinden des Blausäuregeruches wurde die Flüssigkeit annähernd mit Ammoniak neutralisiert und nunmehr mit Bleiessig versetzt. Hierbei fiel ein dickes, hellgelb gefärbtes Bleisalz aus, welches abgesaugt, gut gewaschen und durch Schwefelwasserstoff in der Wärme zersetzt wurde. Die filtrierte Lösung lieferte beim Einengen auf dem Wasserbade schließlich einen dicken Sirup, welcher jedoch nicht zur Kristallisation zu

¹⁾ Vergl. die analogen Verhältnisse bei der Einwirkung von Cyanwasserstoff auf Glukosaminchlorhydrat (Neuberg und Wolff, Ber. der Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXV, S. 4018).

bringen war. Die Isolierung der Säure gelang indessen vermittelst ihres Kalksalzes.

Zu dessen Darstellung versetzten wir den mit der fünfzigfachen Menge Wasser verdünnten Sirup mit soviel Calciumkarbonat, daß bei erneutem Zusatz kein Aufbrausen mehr stattfand. Dann wurde unter Zugabe von Tierkohle einige Zeit gekocht, vom Ungelösten abfiltriert und eingedampft. Hierbei schieden sich aus der hellgefärbten Lösung Kristalle aus, die nach einigem Stehen abgesaugt und mit Alkohol gewaschen wurden. Die leicht grau gefärbte Verbindung wurde zur Reinigung in sehr viel Wasser gelöst und mit Knochenkohle gekocht; versetzte man die eingeeengte Lösung mit etwas Alkohol, so begann nach kurzer Zeit die Kristallisation des reinen Kalksalzes.

Es bildet farblose weiße Kügelchen oder Plättchen; seine Lösung in Salzsäure ist nicht drehend.

0,1242 g Substanz verloren bei 80° im Vacuum 0,0252 g H₂O

0,1902 „ „ ergaben 0,1674 g CO₂ und 0,0858 g H₂O

0,1363 „ „ 0,0222 „ CaO (0,0159 g Ca)

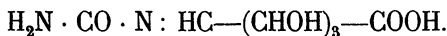
C₇H₁₀O₉Ca

Berechnet: C = 24,00; H = 5,14; Ca = 11,43; H₂O = 20,57%

Gefunden: C = 23,99; H = 5,03; Ca = 11,67; H₂O = 20,31%

Demnach ist die Kalkverbindung ein Salz der durch intramolekularen Ausgleich optisch inaktiven α-Pentaoxypimelinsäure, welche Kiliani durch Oxydation der α-Glukoheptonsäure und Fischer aus α-Glukoheptose selbst durch Salpetersäure erhalten haben. Das nach der Theorie zu erwartende Isomere, die β-Pentaoxypimelinsäure, haben wir, wie bereits vorher erwähnt, nicht auffinden können.

Einwirkung von Harnstoff auf Glukuronsäure.



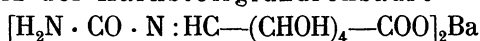
Ureidoglukuronsäure.

Löst man 7,5 g Glukuronsäureanhydrid und 2,5 g Harnstoff zusammen in 40 ccm Schwefelsäure von 5% und stellt das Gemisch in den Brutschrank bei 40°, so sinkt die anfängliche Rechtsdrehung der Lösung um ein beträchtliches, ohne jedoch ganz zu verschwinden.

Erst nach zweieinhalbmonatlichem Stehen ändert sich die Drehung nicht mehr, so daß man annehmen kann, die Reaktion sei zum Stillstand gekommen. Die Darstellung der Harnstoffderivate der eigentlichen Zucker gelingt nach ihrem Entdecker leicht nur in denjenigen Fällen, wo man aus dem Gemisch der Reaktionsprodukte den unveränderten Zucker durch Vergärung entfernen kann. Da aber die Glukuronsäure bekanntlich gegen die Enzyme der Hefe unempfindlich ist, war dieser Weg zur Darstellung der Harnstoffglukuronsäure von vornherein ausgeschlossen, und die Entfernung aus der resultierenden Lösung bot die größten Schwierigkeiten. Derselben wurden wir nach vielen Fehlversuchen auf folgende Weise Herr:

Die schwefelsaure Lösung wird in der Kälte mit gesättigtem Barytwasser bis zur stark alkalischen Reaktion versetzt und schnell aufgekocht. Dadurch wird neben Baryumsulfat die Hauptmenge der nicht in Reaktion getretenen Glukuronsäure als basisches Baryumsalz gefällt. Die durch Einstellen in Eis rasch gekühlte Lösung wird durch Filtration von den abgetrennten Baryumsalzen und dann durch Einleiten von Kohlensäure vom überschüssigen Baryt befreit; sodann wird die resultierende farblose Flüssigkeit im Vacuum bis auf ein kleines Volumen eingedampft. Enthält die Lösung, was fast immer der Fall ist, eine stark reduzierende Substanz, d. h. unveränderte oder aus der Harnstoffverbindung wieder abgespaltene Glukuronsäure, so wird sie nochmals mit Barytwasser aufgekocht, rasch filtriert und durch Kohlensäure der überschüssige Baryt gefällt. Die bei richtig geleiteter Operation nunmehr wasserhelle, höchstens schwach gelbe Flüssigkeit wird dann in das vierzigfache Volumen absoluten Alkohols unter Rühren eingetropft. Die entstehende farblose Fällung bildet nach dem Abfiltrieren einen weißen, durchaus beständigen Niederschlag, der zur Reinigung nochmals in Wasser gelöst und mit absolutem Alkohol wieder ausgefällt wird.

Die Analyse der Substanz zeigt, daß hier das neutrale Baryumsalz der Harnstoffglukuronsäure



vorliegt.

0,1808 g Substanz: 0,0702 g BaSO₄.
 0,2007 „ „ : 0,2022 „ CO₂ und 0,0704 g H₂O
 0,2100 „ „ : 20,0 ccm N (19°, 746 mm)
 $C_{14}H_{22}O_{14}N_4Ba$

Berechnet: Ba = 22,57; C = 27,68; H = 3,62; N = 9,23%

Gefunden: Ba = 22,28; C = 27,52; H = 3,90; N = 9,31%

Die Verbindung zeigt einige überraschende Eigenschaften. Das Reduktionsvermögen, welches der Glukuronsäure und ihren Salzen eigen ist, fehlt der Verbindung. Kocht man sie aber einige Zeit, etwa 3—4 Minuten, mit Fehlingscher Lösung, so erfolgt schußweise die Ausscheidung von gelbrotem Kupferoxydul. Diese Eigenschaft erinnert an das Verhalten einiger gepaarter Glukuronsäuren. Mit diesen zeigt die vorliegende Substanz eine weitere Analogie, die in der optischen Linksdrehung, dem Charakteristikum aller gepaarten Glukuronsäuren, besteht. Diese Linksdrehung beträgt in wässriger Lösung

$$[\alpha]_{D17} = -15,83^\circ$$

$$(l = 1; c = 8,84; \alpha = 1^\circ 24').$$

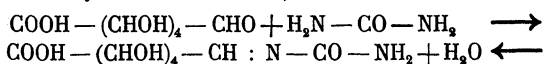
Durch Enzyme, wie Kefirlaktase, Emulsin oder Hefenmaltase, ist die Harnstoffglukuronsäure im Gegensatz zu den eigentlichen gepaarten Glukuronsäuren nicht spaltbar, was bei ihrer abweichenden Konstitution auch nicht zu erwarten ist. (Siehe die folgende Mitteilung.)

Ausgehend von dem reinen Baryumsalze haben wir nun versucht, die freie Harnstoffglukuronsäure darzustellen. Bei genauer Ausfällung des Baryums mit Schwefelsäure enthält die Flüssigkeit zunächst freie Harnstoffglukuronsäure, der man eine gewisse Beständigkeit in wässriger Lösung nicht absprechen kann. Die zunehmende Linksdrehung zeigt nämlich an, daß eine Substanz von höherem spezifischen Drehungsvermögen entstanden ist, und zwar beträgt $\alpha_{[D]} = \text{ca.} -21^\circ$. Versucht man aber, die Harnstoffglukuronsäure durch Konzentration der Flüssigkeit zu isolieren, so erlangt sie nach kurzer Zeit starkes Reduktionsvermögen und Rechtsdrehung infolge völligen Zerfalls in freie Glukuronsäure und Harnstoff. Auch die Darstellung irgend welcher kristallisierter Salze aus der in Kälte bereiteten Lösung der freien Säure sowie durch Fällung des Baryumsalzes

oder doppelte Umsetzung desselben mit Sulfaten führte nicht zum Ziele, so daß wir uns darauf beschränken mußten, die Eigenschaften der interessanten Harnstoffglukuronsäure an ihrem Baryumsalze zu studieren.

Dieses löst sich spielend leicht in Wasser und ist durch Alkohol fällbar. In diesem Solvens sowie in allen übrigen organischen Lösungsmitteln ist es vollständig unlöslich.

Die 5%ige Lösung des Baryumsalzes wird durch kein Schwermetallsalz gefällt, nur Bleiessig und Ammoniak erzeugen eine massige Fällung. Hierdurch sowie durch ihr Verhalten zu Barytwasser ist die Harnstoffglukuronsäure charakteristisch von der freien Glukuronsäure unterschieden, die bekanntlich durch Ätzbaryt sowie bereits durch Bleiessig aus ihren Lösungen niedergeschlagen wird. Beim Kochen mit Alkalien erfolgt, wie schon das Verhalten zu Fehlingscher Lösung lehrt, Spaltung der Harnstoffglukuronsäure in die Komponenten. Fast noch schneller findet diese Zerlegung durch Kochen mit verdünnten Mineralsäuren statt. Da die Verbindung unter dem kondensierenden Einflusse verdünnter Schwefelsäure aus den Komponenten synthetisiert wird, so ist die Reaktion



umkehrbar, und die höchst erreichbare Ausbeute von 30% Baryumsalz (berechnet auf die angewandte Menge Glukuronsäure), sowie die Bestimmung des in der alkoholischen Mutterlauge bleibenden Harnstoffs geben ein Maß für den Gleichgewichtszustand ab.

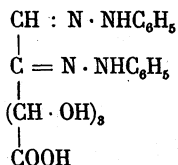
Der Harnstoff ist in der Harnstoffglukuronsäure wie in ihrem Baryumsalze als solcher nicht nachweisbar; weder mit Oxalsäure noch mit Salpetersäure erfolgt in der Kälte eine Kristallisation der entsprechenden Verbindung. Dagegen wird durch alkalische Bromlösung sowie durch salpetrige Säure fast augenblicklich Stickstoff freigemacht.

Die Eigenschaften der Harnstoffglukuronsäure machen es nun außerordentlich wahrscheinlich, daß diese Verbindung auch in der Natur, im Harne, vorkommt. Da, wie beschrieben, die Substanz den Harnstoff nicht in ohne weiteres nachweisbarer

Form enthält, so wird man durch exakte Harnstoffanalysen diese Frage entscheiden können. Versuche hierüber sind im Gange.

Einwirkung von Phenylhydrazin auf Glukuronsäure.

a) *Glukuronsäureosazon*



Wie erwähnt, ist es unmöglich, bei der üblichen Art der Osazondarstellung aus Glukuronsäure und essigsauerm Phenylhydrazin eine einheitliche Verbindung zu erhalten, indem stets ein Gemisch der zahlreich möglichen Verbindungen entsteht. Zu einer einheitlichen Substanz gelangt man nun durch Verwendung eines Verfahrens, welches Wohl und Neuberg¹⁾ früher zur Darstellung sehr empfindlicher Hydrazinverbindungen, z. B. der Akrosazone, vorgeschlagen haben, und das in der Einwirkung der Komponenten aufeinander bei einer 40° nicht überschreiten- den Temperatur besteht. Versetzt man eine Lösung von 3,5 g Glukuronsäurelaktone in 100 ccm Wasser mit 6,6 g Phenylhydrazin, gelöst in der berechneten Menge Essigsäure von 30%, und stellt das Gemisch in den Brutschrank, so färbt es sich alsbald gelb; nach einigen Stunden beginnt die Abscheidung hellgelber Kristalle, und nach drei Tagen ist die Flüssigkeit von einem dichten Kristallbrei erfüllt. Dieser wird abgesaugt, mit kaltem Wasser gewaschen und aus Alkohol von 50% umkristallisiert. Hieraus scheidet sich die Verbindung in langgestreckten verfilzten Nadelchen ab, welche ganz den Habitus des Glukosazons zeigen. Auch die Löslichkeitsverhältnisse beider Verbindungen sind außerordentlich ähnlich.

Die Substanz, deren Schmelzpunkt bei 200—202° liegt, löst sich wenig in Wasser, leicht in Aceton, spielend in Pyridin und wenig in siedendem Benzol; in Äther ist sie praktisch unlöslich.

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXIII, S. 3108 (1900).

Die Analysen

0,1889 g Substanz: 0,4032 g CO₂ und 0,0935 g H₂O
 0,2028 „ „ : 26,7 ccm N (16°, 756 mm)

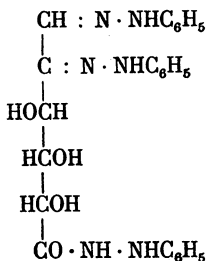


Berechnet: C = 58,07; H = 5,37; N = 15,05%

Gefunden: C = 58,19; H = 5,48; N = 15,28%

zeigen, daß die Verbindung die Zusammensetzung des Glukuronsäureosazons besitzt. Daß die vorliegende Substanz tatsächlich noch die Karboxylgruppe enthält, ergibt sich aus ihren sauren Eigenschaften, z. B. gibt sie mit Barythydrat und Bleiessig Fällungen der entsprechenden Salze. Bei der großen Ähnlichkeit des Körpers mit dem Glukosazon, die sich beispielsweise auch in der typischen Fällbarkeit durch Wasser aus der Pyridinlösung zu erkennen gibt, muß die von verschiedenen Autoren aufgestellte Behauptung, daß man Glukuronsäure und Glukose durch den Habitus ihrer Osazone unterscheiden könne, entschieden bestritten werden. Übrigens ist die Verbindung gleich dem Glukosazon optisch aktiv und zwar linksdrehend im Pyridinalkoholgemisch.

Zu bemerken ist noch, daß man das Glukuronsäureosazon nur erhält, wenn man auf ein Mol. Glukuronsäure mindestens drei Mol. Phenylhydrazin wirken läßt. Bei einem Überschusse an letzterem entsteht die Verbindung gleichfalls, nur wird bei der bekannten Löslichkeit der Osazone¹⁾ in Phenylhydrazin die Ausbeute geschmälert. Sind andererseits weniger als drei Mol. Phenylhydrazin zugegen, so erhält man auch bei Einhaltung der beschriebenen Arbeitsweise im Brutschrank stets ein unaufteilbares Gemisch.

b) *Glukuronsäureosazonhydrazid*

¹⁾ C. Neuberg, Diese Zeitschrift, Bd. XXIX, S. 274 (1900).

Theoretisch besteht die Möglichkeit, noch einen weiteren Phenylhydrazinrest in das Molekül des Glukuronsäureosazons einzuführen; mit einem Molekül essigsäuren Phenylhydrazin (oder mehr) auf dem Wasserbade erhält man nur schmierige Zersetzungsprodukte; bei Brutschranktemperatur jedoch wirken die Verbindungen, wie bemerkt, nicht aufeinander ein.

Man erhält nun das Osazonhydrazid, wenn man das reine Osazon mit der zwanzigfachen Menge Alkohol und 1,2 Mol. Phenylhydrazin zwei Stunden im geschlossenen Rohre auf 150° erhitzt. Nach dem Erkalten des Rohres findet man dieses mit einem Brei gelber Kristalle erfüllt, welche erheblich schwerer löslich sind als das Osazon. Sie werden abgesaugt, mit etwas kaltem Alkohol gewaschen und schließlich aus pyridinhaltigem Alkohol umkristallisiert. Man erhält dann das reine Hydrazid in Form gleichfalls dem Glukosazon ähnlicher verfilzter gelber Nadelchen, die sich bei 210° verfärben und bei 212° unter lebhafter Gasentwicklung schmelzen. Die Substanz löst sich in allen Lösungsmitteln außer Pyridin schwerer als das Osazon; gleich diesem ist ihre Lösung in Pyridinalkohol linksdrehend. Die Verbindung zeigt keinerlei saueren Charakter mehr, auch werden ihre Lösungen durch Metallsalze nicht gefällt.

Die Ausbeute an Osazonhydrazid beträgt wenig mehr als die Hälfte der Theorie, berechnet auf das angewandte Osazon; die direkte Darstellung des Glukuronsäureosazonhydrazids aus Glukuronsäurelaktone und essigsäurem Phenylhydrazin in alkoholischer Lösung durch Erhitzen im Druckrohre ist nicht gelungen.

0,1620 g Substanz: 0,3701 g CO₂ und 0,0846 g H₂O

0,2221 „ „ : 34,4 ccm N (15°, 765 mm)



Berechnet: C = 62,34; H = 5,63; N = 18,18%

Gefunden: C = 62,31; H = 5,80; N = 18,29%