

Zusammenfassung.

Es wird ein einfacher, präparativ ergiebiger und allgemein anwendbarer Weg zur Synthese von 11-Keto-Steroiden beschrieben. Dieser ist auch auf solche Steroide anwendbar, die im Ring C keine Sauerstofffunktion vorgebildet enthalten. So ist es zum Beispiel gelungen, ausgehend von $\Delta^{7;22}$ - 3β -Acetoxy-ergostadien („ α'' -Dihydro-ergosterin-acetat, VII) mit Hilfe einfacher und übersichtlicher Reaktionen (VII \rightarrow VIII \rightarrow IX \rightarrow XIII \rightarrow XIV bzw. XV) das Δ^{22} - 3β -Acetoxy-7,11-diketo-ergosten (XVI) zu bereiten. In diesem liess sich die reaktionsfähige Carbonyl-Gruppe in der Stellung 7 mühelos selektiv entfernen. Als Endprodukte der Versuche in der Ergosterin-Reihe werden das Δ^{22} - 3β -Acetoxy-11-keto-ergosten (XVII) und das gesättigte 3β -Acetoxy-11-keto-ergostan (XIX) beschrieben.

Aus Cholsäure wurde die $\Delta^{7;9}$ - 3α -Oxy-choladiensäure (XXIV) bereitet. Diese liess sich auf dem gleichen Wege wie das entsprechende Dien VIII der Ergosterin-Reihe in das 11-Keto-Derivat, die bekannte 3α -Oxy-11-keto-cholansäure umwandeln.

Organisch-chemisches Laboratorium
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

257. Über die Reduktion der 3,5-Dinitrosalicylsäure durch Zucker

von F. Hostettler, E. Borel und H. Deuel.

(8. VIII. 51.)

*Sumner & Graham*¹⁾ verwendeten als erste die 3,5-Dinitrosalicylsäure zur Bestimmung von reduzierenden Zuckern. Die 3,5-Dinitrosalicylsäure wird beim Erhitzen mit Zuckern in alkalischer Lösung zu einem gelborangen Farbstoff reduziert. Dieser kann bei $530 \text{ m}\mu$ kolorimetriert werden. *Sumner*²⁾ schaltete den störenden Einfluss des Luftsauerstoffs durch Zugabe von *Seignette*-Salz weitgehend aus. Neuerdings wurde die Reaktion auch zur Endgruppenbestimmung bei Polysacchariden angewendet³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾). *Meyer* und Mitarbeiter⁶⁾ benutzten die 3,5-Dinitrosalicylsäure zur quantitativen Bestimmung von D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-glucosamin. Die *Sumner'sche* Reaktion eignet sich auch zum qualitativen Nachweis von Zuckern⁸⁾⁽⁹⁾. *Sumner & Graham*¹⁾ und *Meyer* und

¹⁾ J. B. Sumner & V. A. Graham, J. Biol. Chem. **47**, 5 (1921).

²⁾ J. B. Sumner, J. Biol. Chem. **62**, 287 (1924).

³⁾ K. H. Meyer, G. Noëltling & P. Bernfeld, Helv. **31**, 103 (1948).

⁴⁾ P. Bernfeld & P. Gürler, Helv. **31**, 106 (1948).

⁵⁾ G. Noëltling & P. Bernfeld, Helv. **31**, 286 (1948).

⁶⁾ S. Lansky, M. Kooi & T. J. Schoch, Am. Soc. **71**, 4066 (1949).

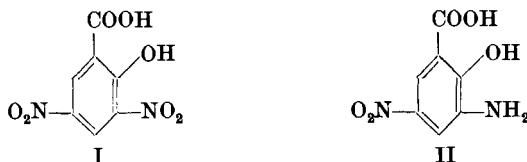
⁷⁾ K. H. Meyer, J. Fellig & Ed. H. Fischer, Helv. **34**, 939 (1951).

⁸⁾ A. Jeanes, C. S. Wise & R. J. Dimler, Anal. Chem. **23**, 415 (1951).

⁹⁾ H. Rüggeberg, Mikroch. **36/37**, 916 (1951).

Mitarbeiter¹⁾ vermuteten, dass bei der Reduktion eine Nitroaminosalicylsäure gebildet wird. Bei der analogen Reduktion der Pikrinsäure durch Zucker entsteht Pikraminsäure²⁾.

In der vorliegenden Arbeit wird die *Sumner'sche* Reaktion an verschiedenen Mono- und Disacchariden studiert.



Der bei der Reduktion von 3,5-Dinitrosalicylsäure (I) durch D-Glucose gebildete Farbstoff wurde isoliert. Er war mit der in der Literatur bereits beschriebenen³⁾ und von uns synthetisierten 3-Amino-5-nitrosalicylsäure (II) identisch. Beide Substanzen schmelzen bei 230–231° und zeigen keine Depression bei der Durchführung eines Mischschmelzpunktes. Ihre Spektren in wässriger-alkalischer Lösung waren identisch und wiesen bei 458 m μ ein Maximum auf (II in Fig. 1).

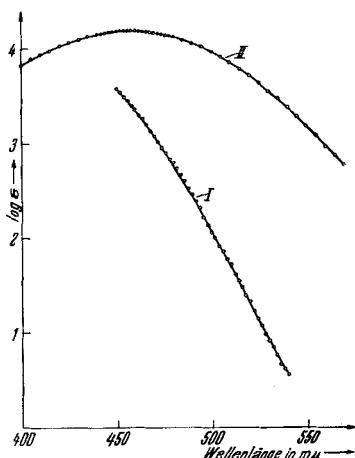


Fig. 1.

Absorptionsspektrum der 3,5-Dinitrosalicylsäure (I) und der 3-Amino-5-nitrosalicylsäure (II). — 1,28 g NaOH und 2,40 g Seignette-Salz pro Liter Lösung; 50 bis 800 mg 3,5-Dinitrosalicylsäure bzw. 20 mg 3-Amino-5-nitrosalicylsäure pro Liter Lösung.

Wie Figur 2 zeigt, gilt für die reine 3-Amino-5-nitrosalicylsäure das *Beer'sche* Gesetz.

Die Extinktion einer Dinitrosalicylsäure-Lösung und einer mit 0,5 mg D-Glucose behandelten Dinitrosalicylsäure-Lösung (Farbstoff-

¹⁾ K. H. Meyer, G. Noelting & P. Bernfeld, Helv. 31, 103 (1948).

²⁾ J. J. Willaman & R. F. Davison, J. Agr. Res. 28, 479 (1926).

³⁾ R. Meldola, H. S. Voster & R. Brightman, Soc. 111, 533 (1917).

lösung) wurden bei $530 \text{ m}\mu$ nach verschiedenen Zeiten gemessen (Tab. 1; Gehalt der Lösungen an NaOH, Seignette-Salz usw., s. experimenteller Teil). Der gebildete Farbstoff ist mindestens 16 Stunden stabil.

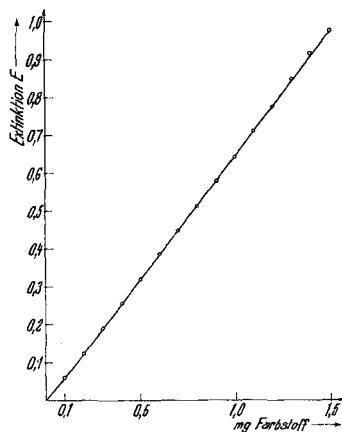


Fig. 2.

Konzentrations-Extinktionskurve der 3-Amino-5-nitro-salicylsäure bei $530 \text{ m}\mu$. — 1,28 g NaOH und 2,40 g Seignette-Salz pro Liter Lösung.

Tabelle 1.

Stabilität von Dinitrosalicylsäure- und Farbstoff-Lösung.
Null-Lösung: 0,1-n. Kaliumchromat.

Zeit in Std.	Extinktion der Dinitrosalicylsäure-Lösung	Extinktion der Farbstofflösung
0,2	0,030	0,234
1	0,030	0,233
4	0,031	0,236
8	0,030	0,238
12	0,029	0,232
16	0,030	0,230
20	0,030	0,225
24	0,029	0,212

Von der reinen 3,5-Dinitrosalicylsäure wurde in wässriger Natronlauge das Absorptionsspektrum aufgenommen (I in Fig. 1). Mit zunehmender Wellenlänge nimmt die Absorption dieser Säure ab, um bei $520 \text{ m}\mu$ auf sehr kleine Werte abzusinken. Die 3,5-Dinitrosalicylsäure gibt bei verschieden langen Erhitzungszeiten in alkalischer Lösung bei Wellenlängen von $470\text{--}520 \text{ m}\mu$ stark schwankende Extinktionen, die selbst bei gleich langer Kochzeit nicht konstant sind.

(Tab. 2). Wahrscheinlich wird bei dieser Reaktion nicht immer der selbe Anteil an Aciform der Dinitrosalicylsäure gebildet.

Tabelle 2.

Extinktion der 3,5-Dinitrosalicylsäure bei verschiedenen Kochzeiten und Wellenlängen.

Wellenlänge in $m\mu$	Extinktion		
	Kochzeiten in Minuten		
	4	5	6
470	0,067	0,150	0,081
480	0,065	0,154	0,085
490	0,040	0,095	0,052
500	0,017	0,040	0,022
515	0	0	0
530	0	0	0

Die *Sumner*'sche Reaktion wurde nun mit verschiedenen Zuckern durchgeführt und die Extinktion des gebildeten Farbstoffes mit einer gleich lang erhitzten, zuckerfreien alkalischen 3,5-Dinitrosalicylsäure-Lösung bei Wellenlängen von 470–600 $m\mu$ verglichen. Das Absorptionsmaximum lag für verschiedene Zucker bei 480–486 $m\mu$ (Fig. 3).

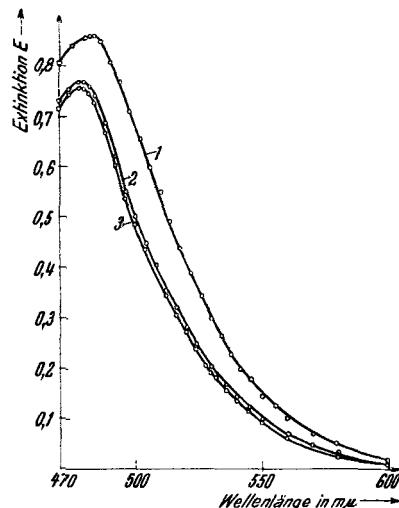


Fig. 3.

Extinktionen mit verschiedenen Zuckern. — Je 0,75 mg Zucker; 1:D-Xylose; 2:D-Glucose; 3:D-Galactose.

Die Absorptionsspektren waren bei Wellenlängen von 470–520 $m\mu$ schlecht reproduzierbar. Bei 530 $m\mu$ erhielt man in allen Parallel-

versuchen konstante Extinktionen: hier stört die 3,5-Dinitrosalicylsäure nicht mehr.

Für verschiedene Mono- und Disaccharide gilt das *Beer'sche* Gesetz bei $530 \text{ m}\mu$ in einem Konzentrationsbereich von 0,2—2 mg Zucker annähernd (Fig. 4).

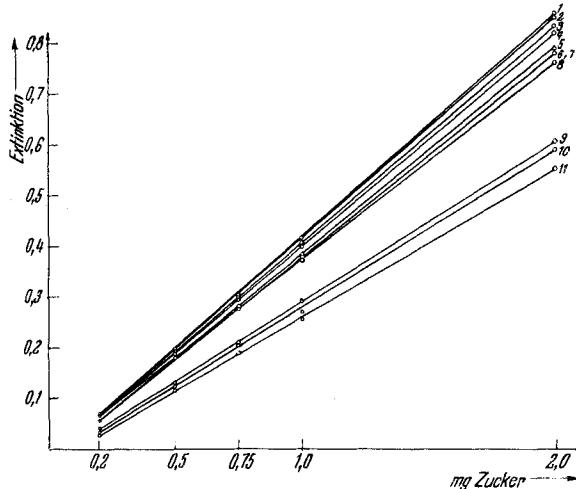


Fig. 4.

Konzentrations-Extinktionskurven mit verschiedenen Zuckern bei $530 \text{ m}\mu$ (Mittelwerte);
 1: D-Glucuron; 2: L-Rhamnose, H_2O ; 3: L-Arabinose; 4: D-Xylose; 5: D-Mannose; 6:
 D-Glucose; 7: D-Fructose; 8: D-Galaktose; 9: D-Galakturonsäure, H_2O ; 10: Lactose, H_2O ;
 11: Maltose, H_2O .

Tabelle 3.

Bildung von 3-Amino-5-nitrosalicylsäure bei der *Sumner'schen* Reaktion.
 Je 0,75 mg Zucker

Zucker	Molgewicht	mg Farbstoff pro mg Zucker	Mol Farbstoff pro Mol Zucker
D-Xylose	150,13	0,60	0,417
L-Arabinose	150,13	0,60	0,417
D-Glucose	180,16	0,56	0,467
D-Galaktose	180,16	0,55	0,458
D-Mannose	180,16	0,56	0,467
D-Fructose	180,16	0,56	0,467
L-Rhamnose, H_2O	182,17	0,63	0,758
D-Glucuron	176,13	0,62	0,413
D-Galakturonsäure, H_2O .	212,50	0,43	0,421
Maltose, H_2O	360,31	0,38	0,634
Lactose, H_2O	360,31	0,41	0,683

Die Konzentrations-Extinktionskurve der reinen 3-Amino-5-nitrosalicylsäure bei $530 \text{ m}\mu$ kann zur Ermittlung des Umfanges der Zuckeroxydationen benutzt werden. Tabelle 3 gibt die Menge der gebildeten 3-Amino-5-nitrosalicylsäure für verschiedene Mono- bzw. Disaccharide an. (Berechnungen aus Ergebnissen der Fig. 2 und 4.)

Diskussion.

Die reine 3-Amino-5-nitrosalicylsäure hat ein Absorptionsmaximum bei $458 \text{ m}\mu$. In den für die kolorimetrische Zuckerbestimmung dienenden Lösungen verschiebt sich das Absorptionsmaximum wegen der anwesenden 3,5-Dinitrosalicylsäure nach längeren Wellenlängen ($480\text{--}486 \text{ m}\mu$). In diesem Bereich erhält man daher bei Aufnahme der Konzentrations-Extinktionskurve von Zuckern keine Geraden, obwohl die gebildete 3-Amino-5-nitrosalicylsäure dem *Beer'schen* Gesetz folgt. Zur Erzielung reproduzierbarer Werte ist man gezwungen, im stark abfallenden Gebiet des Absorptionsspektrums (Fig. 1; oberhalb $520 \text{ m}\mu$) zu messen.

Bei der Reduktion eines Mols 3,5-Dinitrosalicylsäure zu 3-Amino-5-nitrosalicylsäure werden 6 Äquivalente Reduktionsmittel benötigt. Es werden im Mittel pro Mol Zucker ca. 0,5 Mol Farbstoff gebildet. Ein Mol Zucker verbraucht also durchschnittlich 3 Äquivalente Oxydationsmittel. Daher geht die Oxydation über eine Umwandlung der Aldehyd- in Carboxylgruppen hinaus. Auffallend ist die starke Oxydation der L-Rhamnose. Die D-Fructose reagiert mit der 3,5-Dinitrosalicylsäure schon in der Kälte¹⁾. Wahrscheinlich wird die Ketogruppe der D-Fructose in alkalischer Lösung enolisiert; die entstehende Doppelbindung erleichtert die Oxydation der Fructose.

Experimenteller Teil.

Darstellung der 3,5-Dinitrosalicylsäure: Zur Herstellung der 3,5-Dinitrosalicylsäure wurden nach *Sumner & Graham*²⁾ unter stetem Rühren 75 g Salicylsäure in kleinen Portionen in ein Gemisch von 375 g konz. Schwefelsäure und 750 g rauchende Salpetersäure eingetragen. Durch Eiskühlung wurde die Temperatur während der Reaktion unter $+10^\circ$ gehalten. Nach Beendigung der Nitrierung wurde die Lösung in 4 Liter Eiswasser gegossen und nach mehrstündigem Stehen bei 0° im Vakuum abfiltriert. Der fast trockene Rückstand wurde in heißer 1-n. Natriumcarbonat-Lösung gelöst und die Lösung filtriert. Nun wurde überschüssiges, festes Natriumcarbonat zugesetzt und die Mischung einige Stunden bei 0° belassen. Der entstandene Niederschlag von Natrium-3,5-dinitrosalicylat wurde abfiltriert, in wenig heißem Wasser gelöst, und ungelöste Rückstände wurden entfernt. Durch Ansäuern mit einem beträchtlichen Überschuss von konz. Salzsäure wurde die 3,5-Dinitrosalicylsäure ausgefällt. Zur Reinigung wurde die Substanz aus siedendem Wasser umkristallisiert. Die gereinigte, mehrmals umkristallisierte Verbindung hatte einen Schmelzpunkt von 172° . Die Ausbeute betrug 42,5 g entsprechend 32,5%

¹⁾ *T. H. Whitehead & W. C. Bradbury*, Anal. Chem. **22**, 651 (1950).

²⁾ Loc. cit.

bezogen auf Salicylsäure. Eine kleine Probe der Substanz wurde 24 Stunden im Hochvakuum getrocknet.

4,591 mg Subst. gaben	6,195 mg CO ₂	und 0,761 mg H ₂ O
3,193 mg Subst. gaben	0,352 cm ³	N ₂ (17°; 733 mm)
C ₇ H ₄ O ₇ N ₂	Ber. C	36,85 H 1,77 N 12,28%
	Gef. , ,	36,82 1,85 , , 12,51%

Herstellung der Reagenslösung nach *Sumner*¹⁾: 10 g 3,5-Dinitrosalicylsäure, 300 g *Seignette*-Salz und 16 g Natriumhydroxyd wurden mit Wasser auf 1 Liter aufgefüllt. Die Lösung wurde 2 Tage stehengelassen, filtriert und im Dunkeln aufbewahrt. Die so hergestellte Reagenslösung ist mehrere Monate beständig.

Ausführung der kolorimetrischen Bestimmungen: In ein kalibriertes Reagensglas wurden 1 cm³ Zuckerslösung und 2 cm³ der *Sumner*'schen Reagenslösung pipettiert, gut durchgemischt, 5 Minuten im siedenden Wasserbad gekocht und anschliessend 3 Minuten mit fliessendem, kaltem Wasser gekühlt. Die so behandelte Lösung wurde nun auf 25 cm³ verdünnt und im *Beckman*-Spektrophotometer Modell DU bei 530 mμ mit einer gleich behandelten Null-Lösung verglichen (1 cm³ Wasser an Stelle der Zuckerslösung). Die Null-Lösung enthielt die gleichen Mengen an NaOH, *Seignette*-Salz und Dinitrosalicylsäure wie die Versuchslösungen (Fig. 3 und 4). Als Null-Lösung diente bei den Messungen der Tabelle 1 eine 0,1-n. Kaliumchromatlösung. — Für die Absorptionsmessungen der Figuren 1 und 2 und der Tabelle 2 wurden dieselben Bedingungen in bezug auf Gehalt an NaOH und *Seignette*-Salz, auf Erhitzungsdauer usw. eingehalten wie bei den Zuckeroxydationen.

Isolierung des Farbstoffes, der bei Reduktion von 3,5-Dinitrosalicylsäure durch D-Glucose entsteht: 10 g D-Glucose wurden in 600 cm³ Wasser (sauerstofffrei) gelöst und zu einer Mischung von 5 g 3,5-Dinitrosalicylsäure und 8 g Natriumhydroxyd in 900 cm³ Wasser zugegossen. Die Mischung wurde ½ Stunde im Wasserbad gekocht. Dann wurde mit konz. Salzsäure auf pH 2 angesäuert, abgekühlt, filtriert und die Lösung 4 mal mit je 500 cm³ Äther ausgeschüttet. Die Ätherauszüge wurden im Vakuum zur Trockene eingedampft. Der trockene Rückstand wurde mit heißer Salzsäure 1:1 behandelt, unlösliche Anteile wurden abfiltriert und zum Filtrat so lange konz. Ammoniak zugetropft, bis sich ein voluminöser, brauner Niederschlag bildete (pH ca. 6). Nach 12-stündigem Stehen bei 0° wurde abfiltriert und der Niederschlag mit wenig konz. Salzsäure versetzt, um das Amin in das Hydrochlorid zu verwandeln. Letzteres wurde dreimal aus Salzsäure 1:1 umkristallisiert. Die wässrige Lösung des Hydrochlorids wurde darauf mit verd. Ammoniak auf pH 6 gebracht und das entstandene Amin abfiltriert. Es wurde dreimal mit siedendem Wasser umkristallisiert. Die Substanz hatte einen Smp. von 230—231°. Zur Analyse wurde 24 Stunden im Hochvakuum getrocknet. Die berechneten Zahlen gelten für das 3-Amino-5-nitrosalicylsäure-monohydrat.

4,687 mg Subst. gaben	6,697 mg CO ₂	und 1,509 mg H ₂ O
3,233 mg Subst. gaben	0,374 cm ³	N ₂ (18°; 732 mm)
C ₇ H ₆ O ₅ N ₂ H ₂ O	Ber. C	38,89 H 3,73 N 12,96%
	Gef. , ,	38,99 3,60 , , 13,07%

Darstellung von 3-Amino-5-nitrosalicylsäure-monohydrat²⁾: 20 g 3,5-Dinitrosalicylsäure wurden in 60 cm³ Wasser und 40 cm³ konz. Ammoniak gelöst und nach Zugabe von 80 cm³ konz. Ammoniumsulfid auf dem Wasserbad unter gelegentlichem Röhren 20 Minuten zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde mit einem genügenden Überschuss von konz. Salzsäure angesäuert. Dann wurde die Lösung aufgekocht und filtriert, mit konz. Ammoniak auf pH 6 gebracht und 12 Stunden bei 0° stehengelassen. Der entstandene braune Niederschlag wurde abfiltriert, mit heißer Salzsäure 1:1 gelöst, es wurde

¹⁾ Loc. cit.

²⁾ R. Meldola, H. S. Foster & R. Brightman, Soc. 111, 533 (1917).

filtriert und wiederum mit konz. Ammoniak bei pH 6 ausgefällt. Das Amin wurde mit wenig konz. Salzsäure in das Hydrochlorid übergeführt und letzteres zweimal aus Salzsäure 1:1 umkristallisiert. Das so gereinigte Hydrochlorid wurde mit verdünntem Ammoniak auf pH 6 gebracht und das entstandene Amin abfiltriert. Das Produkt wurde fünfmal aus heißem Wasser umkristallisiert. Ausbeute 2,3 g. Die Substanz wurde 24 Stunden bei Zimmertemperatur im Hochvakuum getrocknet. Smp. 231°.

5,027 mg Substanz gaben 7,165 mg CO₂ und 1,621 mg H₂O.

3,572 mg Substanz gaben 0,413 cm³ N₂ (16°; 722 mm)

C₇H₆O₅N₂H₂O Ber. C 38,89 H 3,73 N 12,96%

Gef. , 38,90 , 3,61 , 12,97%

Wir danken Herrn *A. Denzler* für die Mitarbeit bei diesen Untersuchungen und Herrn dipl. ing. agr. *M. Clausen* für die Hilfe bei den Messungen zu Figur 4. Die Mikroanalysen wurden von Herrn *A. Peisker*, Mikroanalytisches Laboratorium, Brugg, ausgeführt.

Die vorliegende Untersuchung wurde durch Mittel aus den *Arbeitsbeschaffungskrediten des Bundes* ermöglicht. Für diese Unterstützung danken wir bestens.

Zusammenfassung.

Bei der Reduktion von 3,5-Dinitrosalicylsäure durch Zucker nach *Sumner* entsteht 3-Amino-5-nitrosalicylsäure. Die unter Standardbedingungen gebildeten Mengen dieses Farbstoffes wurden für einige Mono- und Disaccharide ermittelt. Für kolorimetrische Messungen eignet sich die Absorption bei 530 mμ; bei kleineren Wellenlängen stört die beträchtliche, nicht konstante Absorption der 3,5-Dinitrosalicylsäure. Die *Sumner*'sche Reaktion ist zur quantitativen Bestimmung von 0,4 bis 2,5 mg Zucker brauchbar.

Agrikulturchemisches Institut
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.
