

364. Felix Ehrlich und Kurt Rehorst: Zur Kenntnis der *d*-Glykuronsäure.

[Aus d. Institut für Biochemie und Landwirtschaftl. Technologie d. Universität Breslau.]
(Eingegangen am 8. August 1925.)

Die zumeist aus gepaarten Glykuronsäuren abgespaltene *d*-Glykuronsäure, $C_6H_{10}O_7$, ist bisher nur als saurer, nicht krystallisierender Sirup erhalten worden, aus dem sich beim Stehen allmählich Krystalle des Anhydrids (Lactons), des sog. *d*-Glykurons, $C_6H_8O_6$, abscheiden¹⁾. Trotz verschiedener Darstellungsverfahren, auch auf synthetischem Wege, ist bis heute die Reindarstellung der Säure nicht gelungen, weshalb man zu ihrer Isolierung und Identifizierung das Lacton, Hydrazinderivate oder Alkaloidsalze bevorzugt hat.

Auf Grund der Erfahrungen, die der eine²⁾ von uns bei der Darstellung von *d*-Galakturonsäure aus Pektinstoffen gemacht hat, und bei Arbeiten über die Kohlenhydratsäure-Komponente der Saponine, über die später berichtet werden wird, ist es uns geglückt, zum ersten Male die freie *d*-Glykuronsäure in krystallisierter Form zu isolieren. Man erhält diese, wenn man unter geringer Abänderung der üblichen Darstellungsmethode³⁾ die gepaarte Glykuronsäure-Verbindung, z. B. Menthol-glykuronsäure, nicht unter Druck, sondern bei Wasserbad-Wärme mit verd. Schwefelsäure spaltet und die Schwefelsäure mit überschüssigem Barytwasser oder Bariumcarbonat entfernt, wobei gleichzeitig die *d*-Glykuronsäure vollständig in das Bariumsalz übergeführt wird. Wenn man dann das durch Alkohol gefällte Bariumsalz in wäßriger Lösung bei mäßiger Wärme mit Schwefelsäure zerlegt, erhält man nach vorsichtigem Verdampfen der Flüssigkeit und Extraktion des verbleibenden Sirups mit Alkohol beim Einengen der alkohol. Lösung ein meist sofort krystallisierendes Produkt, in dem nur freie *d*-Glykuronsäure und kein *d*-Glykuron vorliegt. Aus der Menthol-glykuronsäure ließen sich auf diese Weise 50—70% der Theorie an fast reiner, krystallisierter *d*-Glykuronsäure gewinnen.

Die in nadelförmigen Krystallen isolierte Verbindung, die sich gegenüber dem Lacton durch leichtere Krystallisierbarkeit auszeichnet, ließ sich durch Analyse und direkte Titrierbarkeit mit Alkali als die bisher nicht beschriebene freie *d*-Glykuronsäure nachweisen. Die reine Säure (Schmp. 154°) verhält sich in verschiedener Hinsicht anders als das Lacton (Schmp. 175—178°). Während das *d*-Glykuron deutlich süß schmeckt, zeigt die *d*-Glykuronsäure, entsprechend ihrer Wasserstoff-ionen-Konzentration von $p_{H} = 2.5 - 2.8$, einen der Essigsäure vergleichbaren, ausgesprochen sauren Geschmack. Sie reduziert Fehlingsche Lösung erst beim Kochen⁴⁾ und zeigt ein höheres

¹⁾ Literatur vergl. C. Neuberg, Der Harn, Handbuch, Berlin 1911, S. 429—460; sowie in Oppenheimers Handbuch der Biochemie, 2. Aufl., Bd. I [1924], S. 533—538.

²⁾ F. Ehrlich, Ch. Z. **41**, 197 [1917]; Dtsch. Zuckerind. **49**, 1046 [1924] (C. **1924**, II 2797).

³⁾ C. Neuberg, B. **33**, 3315 [1900].

⁴⁾ Nach unseren Beobachtungen reduziert das reine, durch gelinde Säure-Spaltung gewonnene *d*-Glykuron Fehlingsche Lösung nicht sofort in der Kälte, sondern erst nach längerem Stehen. Frühere Angaben, wonach die Reduktion unmittelbar nach dem Vermischen der Lösungen eintritt, erklären sich scheinbar daher, daß dem Lacton noch Bestandteile des Muttersirups anhafteten, der, durch Druckspaltung gewonnen,

Drehungsvermögen. Im Gegensatz zum *d*-Glykuron, dessen spez. Drehung $[\alpha]_D^{20} = +19.2^\circ$ konstant bleibt, zeigt die *d*-Glykuronsäure in wäßriger Lösung eine von $+12^\circ$ bis $+36.3^\circ$ ansteigende positive Mutarotation, was darauf hindeutet, daß die freie Säure, entsprechend ihrem Monosaccharid-Charakter, in einer α - und β -Modifikation vorkommt. Die *d*-Glykuronsäure verhält sich also in dieser Hinsicht analog wie die *d*-Galakturonsäure⁶⁾.

Erhitzt man die *d*-Glykuronsäure längere Zeit in wäßriger Lösung, so erfolgt Drehungsabnahme, und das durch Abdampfen erhaltene Produkt erweist sich je nach den Versuchsbedingungen als ein wechselndes Gemenge von Säure und Lacton, worauf schon frühere Autoren⁶⁾ hingewiesen haben. Die von Schüller⁷⁾ beobachtete Drehungssteigerung von *d*-Glykuron bei längerer Einwirkung von Mineralsäuren in der Kälte läßt sich durch unsere Befunde eindeutig in dem Sinne erklären, daß unter diesen Bedingungen offenbar das Lacton teilweise zur freien Säure aufgespalten wird.

Die leichte Krystallisierbarkeit der freien *d*-Glykuronsäure läßt das nachstehend beschriebene Verfahren zur Isolierung dieser Substanz aus Naturprodukten besonders geeignet erscheinen. Mit seiner Hilfe konnte *d*-Glykuronsäure als Bestandteil des Rüben-Saponins sichergestellt werden, auf deren Vorkommen in der Rübe bis dahin nur durch den keineswegs eindeutigen⁸⁾ positiven Ausfall der Naphthoresorcin-Reaktion geschlossen war⁹⁾.

Beschreibung der Versuche.

Krystallisierte *d*-Glykuronsäure aus Menthol-glykuronsäure.

Menthol-glykuronsaures Ammonium war in der üblichen Weise¹⁰⁾ durch Verfüttern von Menthol an Kaninchen aus dem Harn gewonnen worden¹¹⁾. 21.25 g Ammoniumsulfat werden in 250 ccm Alkohol kochend gelöst und mit einer Lösung von 10 g konz. Schwefelsäure in 200 ccm Alkohol versetzt. Das ausgefallene Ammoniumsulfat wird abfiltriert, das Filtrat mit 1 l Wasser verdünnt und der Alkohol durch Einengen im Vakuum auf etwa 300 ccm vertrieben. Man gibt dazu 750 ccm 2-proz. Schwefelsäure und stellt das Ganze in einem Porzellanbecher unter öfterem Umrühren 9 Stdn. bedeckt ins Wasserbad. Die Hauptmenge des als Harz ausgeschiedenen Menthols wird abfiltriert, das Filtrat mehrmals mit Äther ausgeschüttelt, mit 60 g Bariumcarbonat auf dem Wasserbade versetzt und nach Entfernen des Bariumsulfats im Vakuum bei etwa $40-50^\circ$ auf ein kleines Volumen eingengt. Durch Zusatz von überschüssigem Alkohol wird das Bariumsalz der *d*-Glykuronsäure gefällt. Es wird abfiltriert, in wenig heißem Wasser gelöst und die Lösung mit Kohle entfärbt. Nunmehr wird mit etwas weniger als

stets Zersetzungsprodukte aufweist, die Fehlingsche Lösung unmittelbar in der Kälte reduzieren. Auch die *d*-Galakturonsäure gibt analog bei Druckspaltung schon in der Kälte stark reduzierende Substanzen. F. Ehrlich.

⁶⁾ F. Ehrlich, a. a. O. ⁹⁾ A. Spiegel, B. 15, 1964 [1882].

⁷⁾ J. Schüller, Ztschr. Biol. 56, 274 (C. 1911, II 1050).

⁸⁾ J. A. Mandel und C. Neuberg, Bio. Z. 13, 148 [1908].

⁹⁾ Smolenski, H. 71, 266 [1911]. — Kobert, Saponin-substanzen, Stuttgart 1916, S. 138.

¹⁰⁾ C. Neuberg und S. Lachmann, Bio. Z. 24, 416 [1910]. — Ivar Bang, Bio Z. 32, 443 [1911].

¹¹⁾ Für das zur Verfügung gestellte Präparat sind wir Hrn. Geheimrat Pohl, Breslau, zu Dank verpflichtet.

der berechneten Menge Schwefelsäure (43 ccm $n_{1/1}$ -H₂SO₄) unter Erwärmen auf dem Wasserbade bei etwa 60° die größte Menge der Säure aus ihrem Bariumsalz freigemacht. Die vom Bariumsulfat getrennte Lösung wird im Vakuum auf 50 ccm eingengt. Durch Zufügen von überschüssigem Alkohol fällt noch eine geringe Menge von glykuronsaurem Barium aus. Das alkoholische Filtrat liefert beim Einengen die *d*-Glykuronsäure als kristallisierte, noch etwas gelblich gefärbte Substanz (8.5 g), die sich aus Alkohol oder Essigester in warzenförmig zusammenliegenden Nadelchen rein weiß ausscheidet. Die Krystalle schmelzen, im Vakuum, über Schwefelsäure getrocknet, bei 154° unter Gasentwicklung und Verfärbung.

0.2095, 1207 g Sbst.: 0.2855, 0.1644 g CO₂, 0.1004, 0.0591 g H₂O.

C₈H₁₀O₇. Ber. C 37.11, H 5.20. Gef. C 37.17, 37.15, H 5.36, 5.48.

0.2609 g Sbst. verbrauchen zur Neutralisation gegen Phenol-phthalein 13.40 ccm n_{10} -NaOH.

Ber. 13.50 ccm n_{10} -NaOH.

Bestimmung der spez. Drehung in wäßriger Lösung:

l = 1, c = 5.626; Anfangsdrehung: $\alpha_D^{24} = +0.66^\circ$, $[\alpha]_D^{24} = +11.73^\circ$.

Enddrehung nach 1½—2 Stdn: $\alpha_D^{24} = +2.04^\circ$, $[\alpha]_D^{24} = +36.26^\circ$.

Die durch Fällen der alkohol. Lösung mit Äther gewonnene *d*-Glykuronsäure zeigt sofort nach dem Auflösen in Wasser die richtige Enddrehung: l = 2, c = 4.587, $\alpha_D^{21} = +3.33^\circ$, $[\alpha]_D^{21} = +36.30^\circ$.

Eine wäßrige Lösung von *d*-Glykuronsäure gibt mit Bleiacetat keine Fällung; mit Bleiessig fällt das basische Bleisalz aus.

Mit überschüssigem Barytwasser fällt beim Erwärmen das basische Bariumsalz.

Das Cinchoninsalz¹²⁾ wird durch Auflösen von festem Cinchonin in einer heißen wäßrigen *d*-Glykuronsäure-Lösung hergestellt. Nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Wasser nadelförmige Krystalle. Schmp. 199 bis 200° (statt 204°). In Wasser l = 0.5, c = 1.23, $\alpha_D^{24} = +0.83^\circ$, $[\alpha]_D^{24} = +135.0^\circ$ (statt +138.6°).

Um die Überführung der *d*-Glykuronsäure in das Lacton durch Erhitzen in wäßriger Lösung nachzuweisen, wurden folgende Versuche angestellt:

1. 0.5172 g reine, kristallisierte *d*-Glykuronsäure werden in 20 ccm Wasser gelöst. Die Auflösung zeigt in der Kälte nach 5 Min. im 1-dm-Rohr $\alpha_D^{20} = +0.59^\circ$. Nach 10 Min. langem Erhitzen am Steigrohr auf dem Wasserbade steigt die Drehung auf +0.97°, was der Enddrehung der *d*-Glykuronsäure von $[\alpha]_D^{20} = +37.5^\circ$ entspricht. Nach weiterem Erhitzen sinkt die Drehung in 1 Stde. auf +0.76°, nach weiteren 1½ Stdn. auf +0.74°, nach weiteren 2 Stdn. auf +0.73°. Nach etwa 5-stdg. Erhitzen ist also eine Konstanz der Drehung erreicht, aus der sich ein ungefähres Gleichgewicht von 60% *d*-Glykuronsäure und 40% *d*-Glykuron berechnen läßt. Die Lösung bleibt während des Kochens farblos; anderweitige Zersetzungen sind anscheinend nicht eingetreten.

2. Eine Lösung von 0.5162 g reiner kristallisierter *d*-Glykuronsäure in etwa 50 ccm destilliertem Wasser wird in einer Platinschale offen auf dem Wasserbad auf ein kleines Volumen eingedampft. Das verdampfende Wasser wird ersetzt, von neuem verdampft und dieser Verdampfungsprozeß im

¹²⁾ C. Neuberg, B. 33, 3315 [1900].

ganzen 5-mal durchgeführt. Schließlich wird zum Sirup eingengt und dieser längere Zeit im Vakuum über Schwefelsäure bis annähernd zur Gewichtskonstanz getrocknet. Der gelbbraunliche, lackartige Rückstand zeigt, in 20 ccm Wasser gelöst, sofort die konstante Drehung $\alpha_D^{21} = +1.28^\circ$ ($l = 2$), d. h. $[\alpha]_D^{21} = +24.80^\circ$ (auf das ursprüngliche Gewicht der angewandten Säure berechnet). Diese Drehung entspricht einem Gemisch von etwa 40% *d*-Glykuronsäure und 60% *d*-Glykuron. 10 ccm der Lösung brauchen zur Neutralisation gegen Phenolphthalein sofort 7.8 ccm $n/_{10}$ -NaOH. Bei Zugabe von überschüssigem Alkali und Zurücktiterieren werden noch 5.3 ccm $n/_{10}$ -NaOH verbraucht. Es entspricht das einem Verhältnis von Säure zum Lacton wie 60:40. Die Differenz in den Resultaten beider Untersuchungsmethoden erklärt sich ebenso wie die Färbung des Rückstandes aus einer neben der Lacton-Bildung verlaufenden anderweitigen Zersetzung.

365. F. Adickes:

Über die Anlagerung von Alkalialkoholat an Säure-ester.

[Aus d. Chem. Institut d. Universität Tübingen.]

(Eingegangen am 30. Juli 1925.)

Bei der Synthese der α -Keto-pimelin- und α -Keto-korksäure¹⁾ über die α -Oxalester, die aus Adipinsäure- bzw. Pimelinsäure-ester und Oxal-ester mit alkoholfreiem Natriumäthylat erhalten wurden, war mir aufgefallen, daß das in Äther suspendierte Natriumalkoholat beim Hinzufügen von Oxalester unter starker Erwärmung in Lösung geht. Wislicenus²⁾ vermutet, daß sich dabei ein ähnliches Anlagerungsprodukt $C_2H_5.OOC.C(OC_2H_5)_2ONa$ bilde, wie Claisen³⁾ es aus Natriumalkoholat und Benzoesäure-ester erhalten habe. Solche Anlagerungsverbindungen von Alkalialkoholat an Säure-ester herzustellen und zu untersuchen, schien aus verschiedenen Gründen von großem Interesse. Neff⁴⁾ formuliert den Natrium-Malonsäure-ester als Alkohol-Abspaltungsprodukt aus dem entsprechenden Natrium-Anlagerungsprodukt. Hückel⁵⁾ nimmt bei der von ihm entdeckten Umlagerung von *cis*-Hexahydro-phthalsäure-ester in *trans*-Ester durch wenig Natriumalkoholat nach der Anschauung von Aschan und von Mohr Umlagerung über die Ester-Enol-Form an, die durch Anlagerung von Natriumalkoholat und Abspaltung von Alkohol entstanden wäre. Ebenso liegt es nahe, anzunehmen, daß der von Scheibler⁶⁾ bisher nur für Natrium als Kondensationsmittel aufgeklärte Verlauf der Acetessigester-Synthese bei der Anwendung von Natriumalkoholat genau denselben Weg nimmt. Es müßte dann das Essigester-Enolat erst aus einem Natriumalkoholat-Anlagerungsprodukt unter Abspaltung von Alkohol entstehen. Auch Staudinger⁷⁾ nimmt bei der Entstehung des [diphenyl-methylen]-kohlenestersauren Kaliums, $(C_6H_5)_2C:C(OC_2H_5).OK$, aus Diphenyl-essigester und Kaliumäthylat als Zwischenstufe ein Alkoholat-Anlagerungsprodukt an. Bisher stützten sich alle solche Annahmen auf die von Claisen beschriebene Anlagerungsverbindung von Natriumalkoholat an

¹⁾ B. 58, 211 [1925]. ²⁾ A. 246, 313. ³⁾ B. 20, 651 [1887].

⁴⁾ A. 298, 318. ⁵⁾ B. 58, 448 [1925].

⁶⁾ B. 53, 388 [1920], 55, 789, 3921 [1922]. ⁷⁾ Helv. 5, 658.