

103. Kurt Heyns und Gerd Graefe: Oxydative Umwandlungen an Kohlenhydraten, VII. Mittel.*): Synthese von *d*-Glucuronsäure über Carboxyl-Stärke

[Aus dem Chemischen Institut der Universität Hamburg und der Wissenschaftlichen Abteilung der Deutsche Maizena Werke GmbH., Hamburg]

(Eingegangen am 25. Februar 1953)

Maisquellstärke wird mit stickstoffdioxid- oder nitrithaltiger Salpetersäure bei 0–5° zu einem Polyuronid mit einem Uronsäureanhydridgehalt von 50–55% oxydiert. Das Polyuronid („6-Carboxyl-Stärke“) wird mit $n/2$ Salzsäure bei 155° unter Druck hydrolysiert. Aus dem Hydrolysat wird in 26-proz. Ausbeute kristallisiertes *d*-Glucuronsäure-lacton isoliert. Das Verfahren läßt sich auch auf native Stärken sowie auf andere Polysaccharide, beispielsweise Cellulose, anwenden, deren glykosidische OH-Gruppen durch Acetal-Bildung von Natur aus geschützt sind.

An geeigneten Methoden zur präparativen Herstellung von Glucuronsäure mangelte es bisher. Die chemischen Verfahren zur Darstellung von Glucuronsäure gehen ausnahmslos von Derivaten der *d*-Glucose aus. L. Zervas und P. Sessler¹⁾ oxydierten 1.2-Isopropyliden-3.5-benzyliden-glucose mit alkalischer Permanganat-Lösung. Nach Abspaltung der Isopropyliden- und der Benzyliden-Gruppe durch Säurehydrolyse gelangten sie zum *d*-Glucuronsäure-lacton. Eine weitere Vorschrift²⁾ beschreibt die Oxydation von 1.2.3.4-Tetraacetyl-glucose mit Kaliumpermanganat in Eisessig. Die Acetyl-Gruppen werden dann mit Bariumhydroxyd verseift und das Bariumsalz der Glucuronsäure isoliert. Die Tetraacetyl-glucose muß jedoch erst über die entsprechende 6-Trityl-Verbindung dargestellt werden. Beide Wege sind umständlich und kostspielig.

In einer Reihe von Arbeiten ist die Oxydation von Glykosiden und Polysacchariden zu den entsprechenden Uroniden mit Distickstoffdioxid beschrieben worden³⁾. E. H. Hardegger und D. Spitz⁴⁾ gelang es auf diesem Wege, sowohl das α -Methyl-*d*-glucuropyranosid als auch die entsprechende β -Verbindung über das Bariumsalz herzustellen. Schwierigkeiten machte jedoch die Hydrolyse dieser Glykoside zur freien Säure bzw. ihrem Lacton, die mit 90-proz. Ameisensäure nur in geringer Ausbeute gelang.

Die von K. Heyns und Mitarbb.⁵⁾ beschriebene katalytische Oxydation von Kohlenhydraten unter Verwendung von geeigneten Edelmetall-Katalysatoren mit Luft oder Sauerstoff, die unter geeigneten Bedingungen hinsichtlich Konzentration, Temperatur, anwesender Begleitstoffe und p_H -Wert eine bemerkenswerte Spezifität aufweist und die Gewinnung von Carbonsäuren durch vorzugsweise Oxydation bestimmter Aldehyd- oder primärer Alkohol-Gruppen in guter Ausbeute gestattet, wurde von C. L. Mehlretter, B. H. Alexander, R. Z. Mellies und C. E. Rist⁶⁾ zur Darstellung der 1.2-Isopropyliden-*d*-glucuronsäure über das Calciumsalz aus der entsprechenden Isopropyliden-Verbindung der *d*-Glucose verwendet, aus dem die Glucuronsäure als Lacton nach Hydrolyse mit Oxalsäure erhältlich ist. Auch α -Methyl-*d*-glucosid, α -Äthyl-*d*-glucosid, α -Methylgalaktosid und α -Methylmannosid lassen sich auf katalytischem Wege mit Luft oder Sauerstoff zu den entsprechenden Uronsäure-Derivaten oxydieren⁷⁾.

*) VI. Mittel.: K. Heyns u. W. Koch, Chem. Ber. 86, 110 [1953].

1) Ber. dtsh. chem. Ges. 66, 1326 [1933].

2) M. Stacey, J. chem. Soc. [London] 1939, 1529.

3) K. Maurer u. G. Drefahl, Ber. dtsh. chem. Ges. 75, 1489 [1942] u. Chem. Ber. 80, 94 [1947]; E. C. Yackel u. W. O. Kenyon, J. Amer. chem. Soc. 64, 121 [1942]; C. C. Unruh u. W. O. Kenyon, daselbst 64, 127 [1942]; R. W. Kerr, daselbst 72, 816 [1950]. 4) Helv. chim. Acta 32, 2165 [1949] u. 33, 337 [1950].

5) K. Heyns, Liebigs Ann. Chem. 558, 177 [1947]; K. Heyns u. O. Stöckel, daselbst 558, 192 [1947]. 6) J. Amer. chem. Soc. 73, 2424 [1951]. 7) Bisher unveröffentlicht.

Wir fanden einen einfachen Weg zur Herstellung von Glucuronsäurelacton in der Oxydation von polymeren Kohlenhydraten, deren glykosidische OH-Gruppen durch Acetal-Bildung zwischen benachbarten *d*-Glucose-Molekülen von Natur aus geschützt sind, zu Polyuroniden, aus deren Hydrolysat *d*-Glucuron (*d*-Glucuronsäure-lacton) in kristallisierter Form erhalten wird⁸). Während die bisher bekannten von der *d*-Glucose ausgehenden Verfahren zur Herstellung von Glucuronsäure mindestens 4 Stufen benötigen (Stärke → *d*-Glucose → *d*-Glucosid → *d*-Glucuronid → *d*-Glucuron), erfordert unser Verfahren lediglich 2 Stufen. Als besonders geeignetes Ausgangsmaterial erwiesen sich Quellstärken, die durch gleichzeitige Verkleisterung von Stärke mit Wasser und Trocknung auf einem Walzentrockner hergestellt wurden, sowie auch handelsübliche native Stärken. Da in der Stärke (als Amylose-Amylopektin-Gemisch) auf etwa 20 normale 1.4-(Maltose-)Bindungen eine 1.6-(Isomaltose-) Bindung angenommen wird, sind theoretisch mindestens 5% der Glucopyranosebausteine am Kohlenstoffatom 6 nicht oxydierbar.

Für die Oxydation der Stärke verwendeten wir Salpetersäure.

Schon C. Neuberg⁹) erhielt bei der Behandlung von *d*-Glucose mit 25-proz. Salpetersäure ein Gemisch von *d*-Zuckersäure mit etwa 10% *d*-Glucuronsäure. Über das Bleisalz konnte er diese in Form des Bariumsalzes isolieren, allerdings nicht in reiner Form. Vor einigen Jahren haben amerikanische Forscher¹⁰) die Oxydation einer besonders mit Phosphorsäure aktivierten Cellulose mit nitritthaltiger Salpetersäure zu einem Polyuronid und von *d*-Galaktose zu Schleimsäure beschrieben.

Als Ausgangsmaterial verwendeten wir zunächst handelsübliche Maisquellstärke, die bereits in kaltem Wasser quellbar ist und in der die Stärke-Moleküle in aufgelockerter, reaktionsfähiger Form vorliegen, ohne dabei gleichzeitig einen stärkeren Abbau erlitten zu haben.

In systematischen Versuchen gelang es schließlich, bei einer Temperatur von 0–5⁰ Maisquellstärke bis zu einem Gehalt von 50–55% Uronsäureanhydrid zu oxydieren. Die optimale Einwirkungszeit betrug 150–170 Stdn. Die Abtrennung und Reinigung der Oxydationsprodukte von der Salpetersäure erfolgte durch Ausfällen und Auswaschen mit Methanol. Der Verlauf der Oxydation wurde durch die Überführung der Oxydationsprodukte in Furfurol nach B. Tollens verfolgt. Diese Reaktion verläuft zwar nicht quantitativ, jedoch entspricht nach A. C. Sloep¹¹) ein Teil Furfurolphloroglucid im Mittel 2.97 Teilen freier Uronsäure oder 3.27 Teilen Uronsäureanhydrid. Während der Reaktion wurde gleichzeitig eine Zunahme an reduzierenden Zuckern von 0 auf 12–13 Gewichts-% festgestellt, die auf eine allmähliche Aufspaltung des Stärke-Moleküls zurückzuführen ist (Abbild. s. S. 648).

Auch handelsübliche native Mais-, Reis- und Kartoffelstärke ließen sich in gleicher Weise oxydieren. Durchschnittlich wurde gegenüber den Versuchen mit Maisquellstärke aber nur ein etwas geringerer Oxydationsgrad von 45 bis 50% Uronsäureanhydrid erreicht.

⁸) Vergl. auch Dtsch. Bundespatent 849692 v. 21. 6. 1951. ⁹) Biochem. Z. 28, 356 [1910].

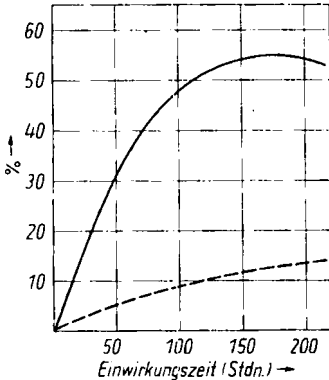
¹⁰) W. W. Pigman, B. L. Browning, W. H. McPherson, C. R. Calkins u. R. L. Leaf jr., J. Amer. chem. Soc. 71, 2220 [1949].

¹¹) Onderzoekingen over Pektinstoffen en hare enzymatische Outleding, Dissertat. Delft, 1928.

Die oxydierten Stärkeprodukte, für die wir die Bezeichnung „6-Carboxyl-Stärken“ vorschlagen, stellen nach dem Trocknen und Mahlen nicht hygroskopische, in kaltem Wasser begrenzt quellbare, in siedendem Wasser lösliche Produkte dar. Aus wäßr. Lösung werden sie durch verdünnte Säuren, Äthanol, Methanol und Aceton ausgefällt. Sie haben deutlich sauren Geschmack. Die

Carboxyl-Gruppen lassen sich in wäßriger Lösung vollständig gegen Phenolphthalein als Indicator titrieren. In organischen Lösungsmitteln haben sie Austauscher-Eigenschaften.

Der Grad der Oxydation kann durch Nitrit-Zusatz¹⁰⁾ nicht weiter gesteigert werden, wenn man eine gelblich bis rötlich gefärbte, stickstoffdioxidhaltige Salpetersäure verwendet. Eine farblose Salpetersäure, die frei von Stickstoffdioxid ist, eignet sich dagegen ohne gleichzeitige Verwendung von Nitrit nicht für die Oxydation. Offensichtlich bewirkt also unter den angewendeten Versuchsbedingungen nicht die Salpetersäure, sondern das Stickstoffdioxid die Oxydation der primären Alkohol-Gruppen zu Carboxyl-Gruppen, das dann nach der Einleitung der Reaktion laufend aus Salpetersäure nachgebildet wird.



Abbild. Oxydation von handelsüblicher Maisquellstärke mit stickstoffdioxidhaltiger Salpetersäure (d 1.42) bei 0° bis +5°. Bildung von Uronsäureanhydrid ——— und von reduzierenden Zuckern (ber. als Glucose) ----- in Gew.-%

Um die Hydrolyse der Carboxyl-Stärke so schonend wie möglich vorzunehmen, wurden zunächst enzymatische Spaltungsversuche durchgeführt.

Mit handelsüblichen Amylase-Präparaten (Biolase C 12 von Kalle & Co., Wiesbaden, und Diastase puriss. von E. Merck, Darmstadt) gelang keine vollständige Hydrolyse. Auch mit einem hochkonzentrierten Pektinase-Präparat (Pectinol K dopp. konz. von Röhm & Haas, Darmstadt), mit dem F. A. Henglein und M. Hann¹²⁾ erfolgreich Pektin gespalten haben, um daraus *d*-Galakturonsäure zu gewinnen, gelang erst im Verlauf von 14 Tagen eine Teilhydrolyse.

Erfolgreicher verliefen die Versuche, die Hydrolyse der Carboxyl-Stärke mit Säure zu erreichen, obwohl die zur Stärkehydrolyse üblichen Bedingungen nicht ausreichten.

Auch das bereits von E. Fischer¹³⁾ zur Spaltung des α -Methyl-*d*-glucosids angewendete Erhitzen mit der 10fachen Menge 5-proz. Schwefelsäure im siedenden Wasserbad führte nicht zum Ziel, obwohl es auf diese Weise gelingt, α -Methylgalakturonsäure zu spalten¹⁴⁾. Ohne Ergebnis verliefen auch Versuche mit methanolischer Salzsäure¹⁵⁾. Ebenso führten die Bedingungen der technischen Stärkehydrolyse (Erhitzen auf 135 bis

¹²⁾ Makromolekulare Chem. **2**, 289 [1948].

¹³⁾ Ber. dtsh. chem. Ges. **26**, 2407 [1893].

¹⁴⁾ F. Ehrlich u. R. Guttman, Ber. dtsh. chem. Ges. **66**, 226 [1933].

¹⁵⁾ W. N. Haworth, E. L. Hirst u. F. A. Isherwood, J. chem. Soc. [London] **1937**, 794 [1937].

140° mit 0.5% Säure, auf Stärke berechnet) nicht zum Ziel. Es muß deshalb angenommen werden, daß die Carboxyl-Gruppen am Kohlenstoffatom 6 die oxydierte Stärke gegen eine hydrolytische Spaltung besonders widerstandsfähig machen. Auch bei Pektolsäure haben F. Ehrlich und R. Guttman¹⁶⁾ die Erfahrung gemacht, daß sich Pektinstoffe wesentlich schwerer hydrolysieren lassen als Stärke. Sie verwendeten bei ihren Versuchen zur Gewinnung von kristallisierter *d*-Galakturonsäure die etwa 17fache Menge 1-proz. Schwefelsäure bei einer Badtemperatur von 145–150°.

In systematischen Versuchen haben wir die günstigsten Bedingungen für die Säurehydrolyse der oxydierten Stärke untersucht. Wir verfolgten den Verlauf an Hand der Abnahme der spezifischen Drehung, der Zunahme des Reduktionswertes (ber. als *d*-Glucose) und der Zunahme des Gehaltes an freier Glucuronsäure¹⁷⁾. Durch längeres Erhitzen unter Rückfluß konnte auch bei Erhöhung der Säurekonzentration kein befriedigendes Ergebnis erzielt werden, weil dann der größte Teil der abgespaltenen Glucuronsäure bereits zerstört wurde. Günstiger verliefen die Versuche unter Überdruck. Es zeigte sich hierbei eindeutig, daß die vorteilhaftesten Bedingungen zur Gewinnung von kristallisiertem Glucuron aus oxydierter Stärke auf eine möglichst kurze, aber intensive Behandlung hinauslaufen. Die besten Ergebnisse wurden mit $n_{7/}$ - bis $n_{1/}$ -Salzsäure bei Temperaturen von 150–155° erhalten. Aus 5 g Carboxyl-Stärke mit 50.6% Uronsäureanhydrid wurden jeweils etwa 3 g Reaktionsprodukt der in der Tafel angegebenen Zusammensetzung gewonnen.

Tafel. Hydrolyse oxydierter Stärke

Bedingungen der Hydrolyse	Zusammensetzung des Hydrolysats		
	% red. Zucker (ber. als <i>d</i> -Glucose)	$[\alpha]_D^{20}$	% <i>d</i> -Glucuronsäure ¹⁷⁾
$n_{7/}$ HCl, 30 Min. bei 150°	50.1	69.0	49.6
$n_{7/}$ HCl, 45 " " 150°	59.5	59.0	52.5
$n_{7/}$ HCl, 60 " " 150°	65.8	59.5	49.8
$n_{5/}$ HCl, 30 " " 150°	58.5	51.4	58.8
$n_{5/}$ HCl, 60 " " 150°	70.1	46.0	44.2
$n_{2/}$ HCl, 30 " " 140°	61.7	52.6	48.1
$n_{2/}$ HCl, 60 " " 140°	69.3	38.2	45.4
$n_{2/}$ HCl, 15 " " 150°	65.6	39.2	44.3
$n_{2/}$ HCl, 30 " " 150°	57.7	23.4	52.5
$n_{2/}$ HCl, 15 " " 155°	62.3	38.1	54.8
$n_{1/}$ HCl, 30 " " 140°	59.0	27.5	27.8
$n_{1/}$ HCl, 15 " " 150°	31.1	11.1	24.0

Nach Behandlung von Carboxyl-Stärke mit einem Gehalt an Uronsäureanhydrid von 53.0% mit $n_{2/}$ Salzsäure bei 155° im Autoklaven, Reinigung des Hydrolysats mit *n*-Butanol und Carboraffin gelang es, aus Eisessig nach dem Animpfen reines kristallisiertes *d*-Glucuronsäure-lacton zu isolieren. Die Ausbeute betrug 26 Gewichts-% (bez. auf die eingesetzte Stärkemenge). Es ist bemerkenswert, daß bereits etwa 50% *d*-Glucuron zerstört werden, wenn man die reine kristallisierte Verbindung den gleichen Bedingungen unterwirft, wie sie bei der Hydrolyse vorliegen.

¹⁶⁾ Biochem. Z. 259, 100 [1933].

¹⁷⁾ Quantitative colorimetrische Bestimmung mit Hilfe der Tollensschen Naphthoresorcin-Reaktion.

Nach dem gleichen Verfahren ließ sich auch eine mit Phosphorsäure vorbehandelte Cellulose¹⁰⁾ mit stickstoffdioxidhaltiger Salpetersäure zu einem Polyuronid oxydieren und die Hydrolyse der oxydierten Cellulose durchführen. Die bei Stärke erhaltene Ausbeute an kristallisiertem Glucuron konnte zwar nicht ganz erreicht werden, die Ausfällung und Reinigung der in Wasser nicht löslichen oxydierten Cellulose war jedoch mit Wasser möglich, während bei der oxydierten Stärke Methanol eingesetzt werden mußte.

Beschreibung der Versuche

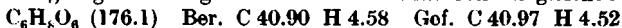
Oxydation von Stärke mit Salpetersäure

1.) 100 g Maisquellstärke mit einem Wassergehalt von 9.4% wurden unter Rühren in 200 ccm einer auf -10° gekühlten Salpetersäure ($d=1.42$) eingetragen. Die Säure wurde vorher durch Verdünnen einer konz., stickstoffdioxidhaltigen Salpetersäure ($d=1.52$) auf die vorgeschriebene Konzentration gebracht. Das Reaktionsgemisch wurde bei einer Temperatur zwischen 0 und $+5^{\circ}$ 168 Stdn. sich selbst überlassen. Daraufhin wurde die dicke, schwach gelblich-grün gefärbte Gallerte unter Kühlung mit Wasser in etwa 800 ccm Methanol eingerührt, wobei sich die oxydierte Stärke in körniger, gut filtrierbarer Form abschied. Sie wurde durch Filtration abgetrennt, mit reichlich Methanol gewaschen und bei 50° i. Vak. getrocknet. Auf diese Weise wurden durchschnittlich 105 g trockenes Oxydationsprodukt mit einem Gehalt¹¹⁾ an Uronsäureanhydrid von 50 bis 55% erhalten; Stickstoff-Gehalt nach Dumas 0.3%.

2.) 100 g handelsübliche Kartoffelstärke mit einem Wassergehalt von 16.1% wurden unter Rühren in eine auf -10° gekühlte Lösung von 20 g Natriumnitrit in 200 ccm Salpetersäure ($d 1.42$) eingetragen. Das Reaktionsgemisch wurde bei einer Temperatur zwischen 0 und $+5^{\circ}$ sich selbst überlassen; nach 168 Stdn. wurde wie unter 1.) aufgearbeitet; Es wurden 102 g Oxydationsprodukt mit einem Uronsäureanhydrid-Gehalt von 49.2% erhalten.

Säurehydrolyse von oxydierter Stärke und Gewinnung von kristallisiertem *d*-Glucuron

1.) 20 g oxydierte Stärke mit einem Uronsäureanhydrid-Gehalt von 53.0% wurden in 200 ccm $n/2$ HCl suspendiert und die Suspension im Autoklaven auf 155° erhitzt (10 Min. steigend, 15 Min. bei 155° , 15 Min. fallend). Das dunkelbraun gefärbte, verkohlte Substanz enthaltende Hydrolysat wurde noch heiß unter Nachwaschen mit Wasser filtriert, zur Reinigung nacheinander einmal mit 75 ccm und zweimal mit je 50 ccm *n*-Butanol ausgeschüttelt, anschließend 15 Min. im siedenden Wasserbad mit Carboraffin erwärmt, erneut filtriert und bei 50° i. Vak. zu einem dünnflüssigen Sirup eingedampft. Der nur noch blaß gelbe Sirup wurde mit der doppelten Menge Eisessig versetzt und weiter i. Vak. bei 50° bis zur beginnenden Trübung eingengt. Nach dem Animpfen mit reinem *d*-Glucuron wurden nach dem Stehen über Nacht bei $+5^{\circ}$ und Auswaschen der Kristalle mit Methanol und Äther 3.9 g reines krist. *d*-Glucuron erhalten (26 Gewichts-%, bez. auf Stärke). Die Impfmenge wird vorteilhaft reichlich bemessen, um gut ausgebildete Kristalle zu erzielen, da diese sich besser abtrennen lassen. Das auf diese Weise erhaltene Glucuron wies bereits eine hohe Reinheit auf. Schmp. (korr.) $173-175^{\circ}$, Misch-Schmp. mit reinem Glucuron 175° ; $[\alpha]_D^{20}$: $+18.0^{\circ}$ (2 dm; $c 1.0$ in Wasser). Naphthoresorcin-Probe¹²⁾: Eine 1-proz. Lösung zeigte im Vergleich zu reinem *d*-Glucuron die gleiche Farbintensität.



2.) 20 g oxydierte Stärke mit einem Uronsäureanhydrid-Gehalt von 51.3% wurden in 200 ccm $n/2$ HCl suspendiert und unter Druck auf 150° im Autoklaven erhitzt (10 Min. steigend, 40 Min. bei 150° , 15 Min. fallend). Nach der wie unter 1.) erfolgten Aufarbeitung wurden aus Eisessig nach dem Animpfen 3.0 g reines, krist. *d*-Glucuron erhalten, entsprechend einer Ausbeute von 20 Gewichts-%, bez. auf Stärke.