

59. Richard Kuhn und Werner Kirschenlohr: Synthese von 6- β -*N*-Acetylglucosaminido-*d*-glucose und -*d*-galaktose

[Aus dem Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung Heidelberg,
Institut für Chemie]

(Eingegangen am 11. Januar 1954)

Nach dem Quecksilber(II)-cyanid-Verfahren wurden 1.2.3.4-Tetraacetyl-*d*-glucose und 1.2.3.4-Tetraacetyl-*d*-galaktose mit der Acetobrom-Verbindung des *N*-Acetyl-*d*-glucosamins umgesetzt. Man erhielt so die schön kristallisierenden Heptaacetyl-Derivate der 6- β -*N*-Acetylglucosaminido-*d*-glucose und der 6- β -*N*-Acetylglucosaminido-*d*-galaktose, aus denen mit methanolischem Ammoniak die an Sauerstoff gebundenen Acetylgruppen unter Freisetzung der stickstoffhaltigen Disaccharide abgespalten wurden.

Die 1.2.3.4-Tetraacetyl-Verbindungen der *d*-Glucose und der *d*-Galaktose lassen sich — ähnlich wie Methyl-, Äthyl-, Propyl-, *n*-Butyl- und Benzylalkohol¹⁾ — mit 2-Desoxy-2-acetamino-acetobromglucose in Gegenwart von Quecksilber(II)-cyanid umsetzen. Die peracetylierten Disaccharide, die farblose Nadeln darstellen, wurden in Ausbeuten von 15–20% d.Th. erhalten:

Heptaacetyl-6- β -*N*-acetylglucosaminido-*d*-glucose

Schmp. 218–219°, $[\alpha]_D^{20}$: -9.5° (Chloroform)

Heptaacetyl-6- β -*N*-acetylglucosaminido-*d*-galaktose

Schmp. 197–198°, $[\alpha]_D^{20}$: $+6.3^\circ$ (Chloroform)

Die daraus durch Ammonolyse gewonnenen Disaccharide haben wir an Austauschere-Säulen sowie mit Hilfe von Kohle-Celite-Säulen gereinigt, aber noch nicht zur Kristallisation bringen können. Sie werden durch ihr Drehungsvermögen (keine Mutarotation) sowie durch ihre Wanderungsgeschwindigkeit in Papierchromatogrammen, wobei sie einheitlich erscheinen, gekennzeichnet.

6- β -*N*-Acetylglucosaminido-*d*-glucose

$R_{\text{Glucose}} = 0.49$, $[\alpha]_D^{20}$: $+3.7^\circ$ (Wasser)

6- β -*N*-Acetylglucosaminido-*d*-galaktose

$R_{\text{Glucose}} = 0.46$, $[\alpha]_D^{20}$: $+9.2^\circ$ (Wasser)

Daß die Verknüpfung in 1.6-Stellung erfolgt ist, ergibt sich aus dem Abbau mit Perjodsäure²⁾. Dabei werden von beiden Disacchariden rasch 4 Moll. Perjodsäure verbraucht³⁾ (offenbar durch die 3 Glykolgruppierungen 1.2, 2.3 und 3.4 des Glucose- bzw. Galaktose-Restes und 3.4 des Acetylglucosamin-Restes; vergl. Formel I). An Formaldehyd-dimedon-Verbindung wurden beim Perjodsäureabbau nur 0.4–0.6 Moll. erhalten, was den mit anderen 1.6-Di-

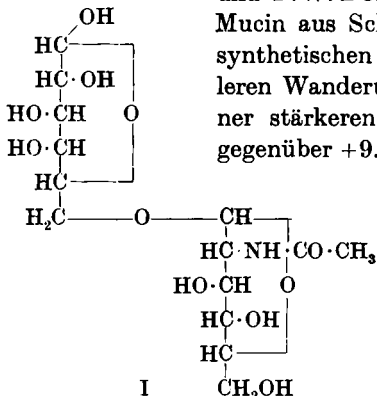
¹⁾ R. Kuhn u. W. Kirschenlohr, Chem. Ber. 86, 1331 [1953].

²⁾ Hrn. Dr. H. H. Baer sind wir für die Durchführung dieser Versuche verbunden.

³⁾ R. Kuhn, A. Gauhe u. H. H. Baer, Chem. Ber. 87, 289 [1954].

sacchariden erhaltenen Ergebnissen entspricht⁴⁾. Dem aus *d*-Galaktose und *N*-Acetylglucosamin aufgebauten Disaccharid kommt also Formel I zu.

Ein kristallisiertes stickstoffhaltiges Disaccharid, das als *N*-Acetyl-*d*-glucosaminido-*d*-galaktose angesprochen wird, haben R. M. Tomarelli, E. Linden und F. W. Bernhart⁵⁾ durch partielle Säurehydrolyse von Mucin aus Schweinemagen erhalten. Es ist von unserer synthetischen 1.6-Verbindung auf Grund seiner viel schnelleren Wanderung ($R_{\text{Glucose}} = 0.71$ gegenüber 0.46) und seiner stärkeren Rechtsdrehung (Enddrehung $[\alpha]_{\text{D}}^{20} : +28.5^{\circ}$ gegenüber $+9.2^{\circ}$ in Wasser) verschieden. Auch gibt die aus Schweinemagen-Mucin isolierte Verbindung nach 5 Min. langem Erhitzen mit 0.05 *n* Na₂CO₃ im Wasserbad keine Farb-reaktion mit salzsaurem *p*-Dimethylaminobenzaldehyd, während man mit dem synthetischen Disaccharid unter denselben Bedingungen starke Rotviolett- färbung erhält.



Für 2 aus Galaktose und *N*-Acetylglucosamin aufgebaute Disaccharide, die aus Lacto-*N*-tetraose erhalten wurden³⁾, nämlich für Lacto-*N*-biose I und Lacto-*N*-biose II, kommt eine Identität mit der von uns synthetisierten 1.6-Biose(I) auf Grund der Verschiedenheit der R_{GI} -Werte auch nicht in Frage.

Hrn. Dr. F. W. Bernhart, Wyeth Laboratories, Mason/Michigan (USA), danken wir aufrichtig für die Überlassung einer Probe der aus Mucin isolierten *N*-Biose.

Beschreibung der Versuche

β-d-Glucose-1.2.3.4-tetraacetat: Nach der in Org. Syntheses⁶⁾ modifizierten Methode von B. Helferich und W. Klein⁷⁾ haben wir, von 30 g Glucose und 48 g Tritylchlorid ausgehend, 38,5 g kristallisiertes 6-Trityl-β-d-glucose-1.2.3.4-tetraacetat erhalten. Die in Eiswasser ausgefallene Tritylverbindung war klebrig, konnte aber abgesaugt werden. Wir lösten das Rohprodukt sofort in 300 ccm heißem Methanol und gossen die noch warme Lösung in dünnem Strahl unter kräftigem Rühren in 3 l Eiswasser, dem 5 % Eisessig zugesetzt waren. Die Substanz fiel nun rein weiß aus. Nach Trocknung bis zur Gewichtskonstanz über Silicagel lagen 91 g Rohprodukt vor. Die Kristallisation der Tritylverbindung und die weitere Verarbeitung zum β-d-Glucose-1.2.3.4-tetraacetat erfolgte nach Vorschrift. Aus 18 g 6-Trityl-β-d-glucose-1.2.3.4-tetraacetat erhielten wir 7.1 g der enttritylierten Verbindung in feinen Nadeln.

Heptaacetyl-6-β-N-acetylglucosaminido-d-glucose: Die aus 10 g Pentaacetylglucosamin gewonnene Acetobromverbindung⁸⁾ wurde mit 5 g Hg(CN)₂, 40 ccm Benzol und 4.5 g β-d-Glucose-1.2.3.4-tetraacetat 2 Stdn. geschüttelt und anschließend die Reaktionsmischung mit 100 ccm Chloroform in einen Scheidetrichter übergeführt. Die Chloroform/Benzol-Lösung wurde solange mit kleinen Anteilen Wasser gewaschen, bis in der wäbr. Phase keine Trübung mit Silbernitrat mehr auftrat. Die mit Natriumsulfat getrocknete Chloroform-Lösung blieb 24 Stdn. stehen, wobei nicht umgesetzte Bromverbindung in feinen Nadeln auskristallisierte. Das Filtrat dieser Nadeln wurde

⁴⁾ Vergl. z.B. R. Kuhn u. I. Löw, Chem. Ber. 86, 1027 [1953].

⁵⁾ Fed. Proc. 12, 431 [1953].

⁶⁾ Vol. 22, 56 [1942].

⁷⁾ Liebigs Ann. Chem. 450, 219 [1926].

⁸⁾ R. C. G. Moggridge u. A. Neuberger, J. chem. Soc. [London] 1938, 745.

i. Vak. eingedampft und der zurückbleibende Kristallbrei mit Äther verrührt und filtriert. Wir erhielten so 2.9 g Rohprodukt und nach zweimaligem Umkristallisieren aus Methanol und 48stdg. Trocknen über Diphosphorpentoxyd bei 80° 1.4 g feine Nadeln. Ausb. 16%, d. Th.; Schmp. 218–219°.

$$[\alpha]_D^{20}: -9.5^\circ \text{ (Chloroform, } c = 2.52\%)$$

$C_{28}H_{39}O_{18}N$ (677.6) Ber. C 49.63 H 5.80 N 2.06 Gef. C 49.38 H 5.86 N 1.99

6- β -*N*-Acetylglucosaminido-*d*-glucose: Es wurden 0.95 g der Oktaacetylverbindung in 30 ccm trockenem Methanol gelöst, auf 0° gekühlt und mit 30 ccm Methanol, das bei 0° mit NH_3 gesättigt war, versetzt. Nach 6 Stdn. Stehenlassen bei 20° unter Feuchtigkeitsabschluß haben wir i. Vak. eingedampft. Der Rückstand war amorph und hygroskopisch, in Methanol gut und in Äthanol schwer löslich.

Papierchromatographisch konnte festgestellt werden, daß das Produkt frei von Glucose und *N*-Acetylglucosamin war, daß es jedoch eine sehr langsam wandernde Substanz als Verunreinigung enthielt, die sowohl mit Anilinphtalat als auch mit Ninhydrin eine Färbung gab. Die Trennung beider Substanzen wurde an einer Kationenaustauscher-Säule Amberlite IR 120 (H) versucht. Säulengröße 15 × 1.5 cm. Die papierchromatographische Untersuchung des eingedampften Eluats zeigte, daß die ninhydrinpositive Substanz nicht völlig am Austauschere festgehalten wurde. Dagegen führte die Chromatographie an einer Kohle-Celite-Säule zum Ziel.

Das Ammonolysat lösten wir in 5 ccm Wasser und gossen es auf eine kleine Kohle-Celite-Säule (8 g Kohle: 8 g Celite). Die Wasser-Eluate wurden mit *m*-Dinitrobenzol + Alkali auf Zucker geprüft und beim Auftreten der ersten Färbung in kleinen Anteilen von 10 bis 20 ccm aufgefangen. Nach 200 ccm Wasser folgten 300 ccm 2-proz., darauf 150 ccm 5-proz., 200 ccm 10-proz. und 50 ccm 95-proz. Äthanol. Die Fraktionen wurden einzeln i. Vak. eingedampft und auf Papier (Schleicher & Schüll 2043 b) chromatographiert. Lösungsmittel⁹⁾ war Essigester/Pyridin/Wasser 50:35:15. Das Eluat, das wir mit 2-proz. Alkohol gewannen, enthielt die Hauptmenge des neuen Disaccharids. In den Fraktionen mit 5- und 10-proz. Alkohol trat noch ein schwacher Fleck mit Anilinphtalat auf, der oberhalb des Disaccharids lag. Der 95-proz. Alkohol enthielt die ninhydrinpositive, langsam wandernde Substanz.

Die Fraktionen mit 2-proz. Alkohol, die das reine Disaccharid enthielten, wurden in wenig Methanol gelöst und vereinigt. Nach dem Abdampfen i. Vak. erhielten wir 140 mg eines amorphen Pulvers. Die bei 80° über Diphosphorpentoxyd 48 Stdn. getrocknete Substanz ergab folgende Analysenwerte:

$$\alpha_D^{20}: +3.7^\circ, (c = 1.3\%)$$

$C_{14}H_{25}O_{11}N$ (383.3) Ber. C 43.87 H 6.57 N 3.65 Gef. C 43.65 H 6.64 N 3.58

6-Triptyl-*d*-galaktose-1.2.3.4-tetraacetat: 60 g *d*-Galaktose und 96 g Triptylchlorid wurden in 250 ccm Pyridin in der Hitze unter Feuchtigkeitsabschluß gelöst und zu der heißen Lösung in einem Guß 180 ccm Acetanhydrid zugegeben. Nach 20stdg. Stehenlassen bei etwa 20° ließen wir die Reaktionsmischung langsam in 5 l Eiswasser, das 500 ccm Eisessig enthielt, einlaufen. Während des Eingießens mußte kräftig gerührt werden. Die bröcklige, noch etwas klebrige Substanz wurde nach dem Absaugen mit 2 l Eiswasser gewaschen und zur weiteren Reinigung in 500 ccm Benzol gelöst. Diese Lösung schüttelten wir dreimal mit je 200 ccm Wasser und trockneten sie anschließend mit Natriumsulfat. Das Filtrat haben wir zweimal mit Carboraffin entfärbt und eingedampft. Der zurückbleibende schwach gelbe Sirup wurde nun in 600 ccm Methanol, dem 10 ccm Eisessig zugesetzt waren, gelöst und diese Lösung langsam in 4 l Eiswasser eingerührt. Die Triptylverbindung fiel rein weiß aus. Die Trocknung erfolgte zu Anfang auf Tontellern und wurde bis zur Gewichtskonstanz über Silicagel fortgeführt. Ausb. 127 g (61% d. Th.). Es konnte keine Kristallisation erreicht werden.

Analyse der getrockneten Substanz vor Benzolbehandlung:

$C_{33}H_{34}O_{10}$ (590.5) Ber. C 67.12 H 5.80 Gef. C 67.94 H 5.86

⁹⁾ G. Malyoth u. H. Stein, Biochem. Z. 322, 165 [1951].

Die Analyse des mit Benzol behandelten Produktes (nach 48stdg. Trocknen bei 80° über Diphosphorpentoxyd stimmte auf einen Gehalt von 1 Mol. Benzol.

$[\alpha]_D^{20}$: -19.6° (Pyridin, $c = 2.9\%$)

$C_{38}H_{34}O_{10} + C_6H_6$ (668.7) Ber. C 70.05 H 6.03 Gef. C 70.47 H 5.86

d-Galaktose-1.2.3.4-tetraacetat: 25 g Tritylverbindung lösten wir in 100 ccm Eisessig und kühlten die Lösung auf 10° ab. Dazu wurden schnell 10 ccm 36.7-proz. Bromwasserstoff/Eisessig gegeben, etwa 1 Min. kräftig geschüttelt und sofort das entstandene Tritylbromid abgesaugt. Das Filtrat gossen wir sogleich in 1 l Eiswasser und filtrierten vom Unlöslichen ab. Der unlösliche Teil bestand zur Hauptsache aus Triphenylcarbinol. Die klare Lösung wurde 3mal mit 100 ccm Chloroform ausgeschüttelt und die Chloroformphase mehrmals mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen mit Natriumsulfat engten wir i. V. zum Sirup ein und entwässerten völlig durch mehrmaliges Abdampfen mit Benzol. Gewicht des schwach gelb gefärbten Sirups 8 g.

Heptaacetyl-6- β -*N*-acetylglucosaminido-*d*-galaktose: Die aus 10 g Pentaacetyl-glucosamin erhaltene Acetobromverbindung⁹⁾ wurde mit 5 g Quecksilber(II)-cyanid und dem in 40 ccm Benzol gelösten Sirup der enttritylierten Verbindung 3 Stdn. geschüttelt. Es wurde dann weiter wie bei der bereits beschriebenen Disaccharidsynthese verfahren. Die eingeengte Chloroform/Benzol-Lösung ergab einen Sirup, der beim Verreiben mit 20 ccm trockenem Äther kristallisierte (4 g Rohprodukt). Nach dreimaligem Umkristallisieren aus je 20 ccm absol. Äthanol erhielten wir 1.7 g der Oktaacetylverbindung in feinen Nadelchen. Es erwies sich als zweckmäßig, bei der Umkristallisation Impfkristalle zuzugeben, da die Substanz zuweilen gelartig anfiel. Schmp. 197 bis 198°.

$[\alpha]_D^{20}$: +6.3° (Chloroform, $c = 2.1\%$)

$C_{28}H_{30}O_{14}N$ (677.6) Ber. C 49.63 H 5.80 N 2.06 Gef. C 49.69 H 5.86 N 2.08

6- β -*N*-Acetylglucosaminido-*d*-galaktose: 800 mg der Oktaacetylverbindung wurden wie bereits beschrieben mit methanol. Ammoniak verseift und eingedampft. Den amorphen Rückstand verrieben wir mit heißem Essigester und filtrierten das Rohprodukt (500 mg) ab.

Papierchromatographisch stellten wir wieder eine langsam wandernde Komponente als Verunreinigung fest.

Reinigung an Kohle-Celite: Das Ammonolysat wurde in 10 ccm Wasser gelöst und an einer Kohle-Celite-Säule (12 g Kohle; 12 g Celite) chromatographiert. Eluiert haben wir mit 750 ccm Wasser, 1000 ccm 2-proz., 800 ccm 5-proz. und 200 ccm 10-proz. Alkohol. Die Eluate fingen wir in 60-ccm-Fractionen auf, dampften sie i. Vak. ein und fanden papierchromatographisch, daß die Hauptmenge an Disaccharid in der Fraktion mit 2-proz. Alkohol vorlag. Die Fraktionen mit 5- und 10-proz. Alkohol enthielten eine schnellere und die langsamere wandernde Komponente, die auf dem Papierchromatogramm nach dem Besprühen mit Anilinphthalat im UV deutlich sichtbar wurden. Die das reine Disaccharid enthaltenden Fraktionen lösten wir in 7 ccm Wasser und ließen diese Lösung durch eine Kationen- und Anionenaustauscher-Säule laufen. Dadurch konnte das aus der Kohlesäule stammende Celite, das in allen Eluatn noch vorhanden war, im wesentlichen entfernt werden. Der verwendete Kationenaustauscher war Amberlite IR 120 (H). Säulengröße 12 \times 1.5 cm. Beginn und Ende der das Disaccharid enthaltenden Fraktion erkannten wir mit dem *m*-Dinitrobenzolreagens. Das aus der Kationenaustauschersäule erhaltene Eluat von 20 ccm neutralisierten wir sofort an einer gleichgroßen Säule von Amberlite IR 45 und dampften die daraus erhaltene Lösung (50 ccm) i. Vak. ein. Der Rückstand wurde 4mal mit 30 ccm absol. Methanol zur Trockne gedampft. Die amorphe pulvrige Substanz konnte noch nicht zur Kristallisation gebracht werden. Ausb. 170 mg.

$[\alpha]_D^{20}$: +9.2° (Wasser, $c = 0.65\%$)

$C_{14}H_{25}O_{11}N$ (383.3) Ber. C 43.87 H 6.57 N 3.65 Gef. C 43.93 H 6.85 N 3.84

$R_{Glucose}$ -Werte der Disaccharide. Es wurden die $R_{Glucose}$ -Werte der beiden synthetischen Disaccharide und der Lactose in 2 verschiedenen Lösungsmittelgemischen bestimmt.

Lösungsmittelgemisch I¹⁰⁾: Essigester/Pyridin/Wasser 2:1:2 (obere Phase)

Lösungsmittelgemisch II⁹⁾: Essigester/Pyridin/Wasser 50:35:15

R_{Glucose} -Werte	I	II
6- β - <i>N</i> -Acetylglucosaminido- <i>d</i> -glucose	0.49	0.56
6- β - <i>N</i> -Acetylglucosaminido- <i>d</i> -galaktose	0.46	0.49
Lactose	0.51	0.55

60. Otto Th. Schmidt und Werner Staab*): Synthese der 3.5-Diphenoyl-glucose

[Aus dem Chemischen Institut der Universität Heidelberg]

(Eingegangen am 15. Januar 1954)

Als Vorarbeit zu Synthesen in der Reihe der Ellagengerbstoffe war die Synthese einer 3.6-Diphenoyl-glucose beabsichtigt. Diaceton-glucose wurde auf zwei Wegen in den sauren Diphensäure-ester der 1.2:5.6-Diaceton-glucose (IV) überführt. Abspaltung der Aceton-gruppe aus der 5.6-Stellung führte zum entsprechenden sauren Diphensäure-ester der 1.2-Aceton-glucosfuranose (VIII). Der Ringschluß gelang durch intramolekulare Veresterung unter der Mitwirkung von Trifluoressigsäure-anhydrid. Er führte nicht zu der erwarteten 3.6-Diphenoyl-Verbindung, sondern zu 1.2-Aceton-3.5-diphenoyl-glucosfuranose (IX), die zur 3.5-Diphenoyl-glucosfuranose (X) entacetoniert wurde.

Abgesehen von den Zucker-Carbonaten sind bis vor kurzem nur solche Ester von Dicarbonsäuren mit Zuckern bekannt geworden, bei welchen die Dicarbonsäure mit zwei Zucker-Molekeln verknüpft ist. So haben K. Freudenberg und A. Wolf¹⁾ aus zwei Moll. Diaceton-mannose und Oxalylchlorid den neutralen Oxalsäureester der Diaceton-mannose dargestellt. Ein Bisester des Crocetins mit zwei Moll. Gentiobiose liegt bekanntlich²⁾ im Safran-Farbstoff Crocin vor. Die „beidarmige“ Verknüpfung einer Dicarbonsäure mit einer Mol. Zucker wurde erstmals in den beiden natürlichen Gerbstoffen Chebulagsäure und Corilagin³⁾ aufgefunden, in welchen 2.3.4.2'.3'.4'-Hexaoxy-diphenyl-dicarbonsäure-(6.6') mit den Oxygruppen 3 und 6⁴⁾ der Glucose verestert ist. Kurze Zeit darauf haben B. Helferich und E. v. Gross⁵⁾ aus Triacetyl-glucal und Phenanthrenchinon ein Phenanthren-hydrochinon-triacetyl-*d*-glucosid-anhydrid dargestellt, dieses ozonisiert, dann entacetyliert und unter den Reaktionsprodukten Diphensäure erhalten, „so daß als – nicht rein isoliertes – Zwischenprodukt eine *d*-Glucose angenommen werden kann, in der die Oxygruppen an C¹ und C² mit Diphensäure. . . . verestert sind“.

Als Vorstudie für die Synthese von Ellagengerbstoffen setzten wir 2 Moll. Diaceton-glucose-natrium (I) mit dem Dichlorid der Diphenyl-dicarbonsäure-(2.2') (II) um und erhielten den Diphensäure-bis-[diaceton-glucose]-ester (III),

¹⁰⁾ M. A. Jermyn u. F. A. Isherwood, Biochem. J. 44, 402 [1949].

*) Dissertat. Heidelberg, 1954.

¹⁾ Ber. dtsh. chem. Ges. 60, 232 [1927].

²⁾ P. Karrer u. H. Salomon, Helv. chim. Acta 11, 315 [1928]; P. Karrer u. K. Miki, ebenda 12, 985 [1929].

³⁾ O. Th. Schmidt u. F. Blinn, Naturwissenschaften 38, 72 [1951]; O. Th. Schmidt, F. Blinn u. R. Lademann, Liebigs Ann. Chem. 576, 75 [1952].

⁴⁾ Dissertat. Dietrich M. Schmidt, Heidelberg, 1953.

⁵⁾ Chem. Ber. 85, 531 [1952].