

RICHARD KUHN und JOHANNES C. JOCHIMS

Über die „isomeren“ Gluconsäurenitrile

Ein Beitrag zum Wohlschen Abbau

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

(Eingegangen am 18. Dezember 1959)

Bei den „isomeren“ Gluconsäurenitrilen von P. E. PAPADAKIS und H. J. COHEN handelt es sich um ein und dieselbe Substanz. Das aus Eisessig erhaltene Nitril schmilzt höher und „mutarotiert“ nicht, weil es durch Spuren von Säure stabilisiert ist. Die anomale zeitliche Änderung der Drehung von Gluconsäurenitril in wäßriger Lösung wird durch den Ablauf zweier Reaktionen erklärt: einerseits wird das Nitril irreversibel über das Amid zu Ammoniumgluconat verseift; andererseits dissoziiert das Nitril reversibel in Arabinose und HCN.

Im Anschluß an Beobachtungen von G. ZEMPLÉN¹⁾ und A. WOHL²⁾ beschrieb P. E. PAPADAKIS^{3,4)} zwei wechselseitig ineinander umwandelbare isomere Gluconsäurenitrile. Das höherschmelzende Nitril (Schmp. 145°), welches aus dem niedriger schmelzenden (Schmp. 120.5°) durch mehrmalige Umkristallisation aus Eisessig erhalten wurde, zeigte in Wasser keine Mutarotation. Die niedriger schmelzende Form, die aus dem Nitril vom Schmp. 145° durch viermalige Umkristallisation aus absol. Äthanol darstellbar ist, zeigte eine Drehungsänderung, die ein Minimum durchlief. P. E. PAPADAKIS und H. J. COHEN^{3,4)} vermuteten, daß die höherschmelzende Form das offenkettige Nitril, die niedriger schmelzende Form dagegen ein Imin sei.

Ähnliche Drehungsänderungen wie beim Gluconsäurenitril vom Schmp. 120.5° wurden beobachtet beim *N*-Methyl-glucosaminsäurenitril⁵⁾, beim *N*-Isopropyl-glucosaminsäurenitril⁶⁾ und beim *N*-Phenyl-galaktosaminsäurenitril⁷⁾ auf Zusatz von wenig Base. Wir vermuteten danach und nach Beobachtungen über die Epimerisierung von *N*-Benzyl-glucosaminsäurenitril in heißen Alkoholen⁸⁾, daß sich das Gluconsäurenitril vom Schmp. 145° durch Umkristallisation aus absol. Äthanol in ein Gluconsäure-iminolacton vom Schmp. 120.5° umwandelt, fanden jedoch eine ganz andere Erklärung.

Das nach A. WOHL und O. WOLLENBERG²⁾ dargestellte Gluconsäurenitril lieferte nach viermaliger Umkristallisation aus Eisessig ein *Nitril I* vom Schmp. 140–141° (Zers.). Fünfmalige Umkristallisation aus absol. Äthanol ergab ein *Nitril II* vom Schmp. 120–121° (Zers.). I und II gaben auf Gluconsäurenitril stimmende Analysen. Mit Acetanhydrid und Natriumacetat erhielten wir in beiden Fällen das gleiche

1) G. ZEMPLÉN, Ber. dtsch. chem. Ges. **60**, 171 [1927].

2) A. WOHL und O. WOLLENBERG, Liebigs Ann. Chem. **500**, 285 [1932].

3) P. E. PAPADAKIS und H. J. COHEN, J. Amer. chem. Soc. **60**, 765 [1938].

4) P. E. PAPADAKIS, J. Amer. chem. Soc. **64**, 1950 [1942].

5) M. L. WOLFROM, A. THOMPSON und J. R. HOOPER, J. Amer. chem. Soc. **68**, 2343 [1946].

6) R. KUHN und W. BISTER, Liebigs Ann. Chem. **602**, 217 [1957].

7) R. KUHN, D. WEISER und H. FISCHER, Liebigs Ann. Chem. **628**, 207 [1959].

8) R. KUHN und J. C. JOCHIMS, Liebigs Ann. Chem. **628**, 172 [1959].

Pentaacetylgluconsäurenitril, auch waren die Chromatogramme der Hydrierungsprodukte⁹⁾ identisch (Hauptfleck Glucose). Wenn II ein Iminolacton wäre, so sollte man nach der Hydrierung keine Glucose, sondern Gluconsäure finden¹⁰⁾. I und II geben *identische Debye-Scherrer-Diagramme und IR-Spektren* mit einer starken Nitrilbande bei 4.45 μ . I zeigt eine ganz schwache Andeutung einer Carbonylbande bei 5.8 μ . Eine Bande, die für eine C=N-Gruppe sprechen würde, fehlt völlig. Für I und II findet man schließlich die gleiche Drehung in halbgesättigter Boraxlösung (langsamer Drehungsabfall). Diese Befunde zeigen, daß I und II nicht isomer sind und daß in beiden Fällen das gleiche offenkettige Gluconsäurenitril vorliegt.

Andererseits zeigt das Nitril II in Wasser die von P. E. PAPADAKIS und H. J. COHEN³⁾ beobachtete komplexe Mutarotation (Abbild., Kurven (1), (2) und (3)), während die Drehung von I über mindestens 48 Stdn. konstant bleibt und man danach das unveränderte Nitril zurückgewinnen kann. Erste Hinweise dafür, daß *Spuren von Säure das nicht mutarotierende Nitril stabilisieren*, erhielten wir durch die Beobachtung, daß I auch nach zehnmalem Waschen mit Aceton nach der Vorschrift von A. WOHL und O. WOLLENBERG²⁾ deutlich sauer reagiert (trägt man die Kristalle auf feuchtes Indikatorpapier auf, so findet man p_H ca. 3). Auch beginnt der Drehungsabfall von II in CO₂-haltigem destilliertem Wasser erst einige Stunden später als in CO₂-freiem Wasser.

Versetzt man die wäßrige Lösung von I mit einigen Tropfen verd. Natronlauge, so beginnt sofort die für II typische Änderung der Drehung. Säuert man umgekehrt die Lösung von II auf p_H 2–3 an, so bleibt die Drehung mindestens 24 Stdn. konstant. In Phosphatpuffern *) zeigen I und II nahezu die gleichen Drehungskurven. Gemessen wurde bei p_H 8.0, 7.0 und 6.0. Die Tabelle zeigt die p_H -Abhängigkeit der zeitlichen Drehungsänderung.

Zeiten in Stunden von der Lösung des Nitrils bis zur Erreichung des Drehungsminimums
(je 1 g Nitril in 100 ccm Pufferlösung)

p_H	8.0	7.0	6.0
Nitril I, Schmp. 140–141°	1.7	19	~220 Stdn.
Nitril II, Schmp. 120–121°	1.2	15	~200 Stdn.

Diese Versuche beweisen, daß I Spuren von mit Aceton nicht auswaschbarer Säure enthält, wodurch die Drehungsänderung in Wasser verhindert und wohl auch der höhere Zersetzungspunkt von I bedingt wird (Stabilisierung). Die von P. E. PAPADAKIS und H. J. COHEN³⁾ beschriebene „Isomerie“ hat damit ihre Erklärung gefunden.

DIE „MUTAROTATION“ VON REINEM GLUCONSÄURENITRIL IN WASSER

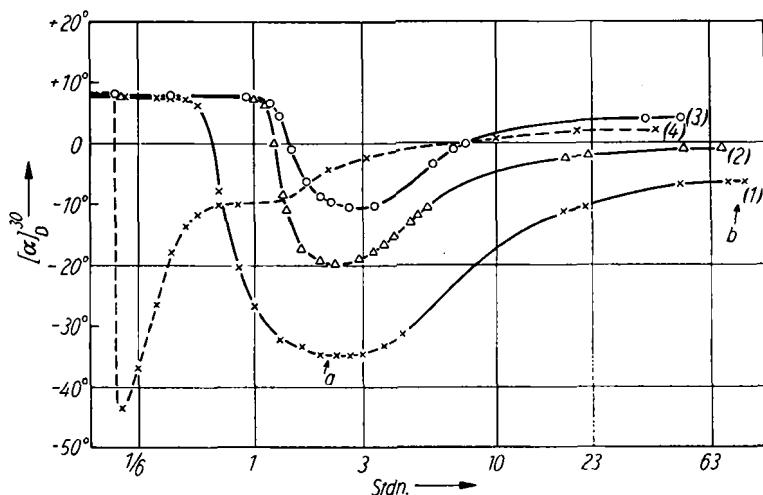
Säuert man die mutarotierende Lösung des Nitrils nach Erreichen des Minimums (Punkt a in der Abbild., Kurve (1)) schwach an, so nimmt die Drehung schlagartig noch ein wenig ab und bleibt dann über mindestens 48 Stdn. konstant. Es tritt starker HCN-Geruch auf. Papierchromatographisch findet man viel Arabinose und unver-

⁹⁾ R. KUHN und P. KLESSE, Chem. Ber. 91, 1989 [1958].

¹⁰⁾ R. KUHN und W. KIRSCHENLOHR, Liebigs Ann. Chem. 600, 126 [1956].

*) nach S. P. L. SÖRENSEN, siehe Biochemisches Taschenbuch, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, Göttingen 1956, S. 652.

ändertes Nitril, daneben schwächer Glucon- und Mannonsäureamid und die entsprechenden Ammoniumhexonate. Das IR-Spektrum des Rückstandes der unter 30° i. Vak. eingedampften Lösung zeigt, neben Carbonylverbindungen, im wesentlichen die überlagerten Spektren von Arabinose und Gluconsäurenitril.



Zeitliche Änderung der Drehung von Gluconsäurenitril in wäßrigen Lösungen.

- (1): 1 g, (2): 4 g, (3): 10 g Nitril in 100 ccm Wasser. (4): 1 g Nitril in 100 ccm Wasser, dazu nach 3 Min. einige Tropfen 12-proz. Ammoniak

Um zu prüfen, ob die beobachtete Drehung durch die gebildete linksdrehende D-Arabinose erklärt wird, bestimmten wir deren Menge einmal papierchromatographisch nach F. G. FISCHER und H. DÖRFEL¹¹⁾, zum anderen indirekt durch Titration der gebildeten Blausäure nach VOLHARD, wobei wir annehmen, daß die Menge der freien Blausäure der Menge an Arabinose äquivalent ist. Durch Titration mit ammoniakalischer Silbernitratlösung mit KJ als Indikator läßt sich ferner nach G. ZEMPLÉN¹⁾ nahezu exakt die Summe des Cyanidgehalts von noch vorhandenem Gluconsäurenitril und freier Blausäure bestimmen. Aus den Ergebnissen dieser beiden Titrations¹²⁾ lassen sich dann die Mengen an Arabinose und Gluconsäurenitril einigermaßen genau bestimmen. Die Ergebnisse der quantitativen Papierchromatographie und der Titration geben befriedigend übereinstimmende Werte für Arabinose.

In einem typischen Versuch beobachteten wir ein Drehungsminimum von α : -0.67° . Die durch Titration und Papierchromatographie bestimmten Mengen von Gluconsäurenitril und Arabinose würden eine Drehung von α : -0.65° hervorrufen. Ähnlich gute Übereinstimmungen wurden stets beobachtet, jedoch hängt die Menge der gebildeten Arabinose und damit die Gestalt der Drehungskurve von der Konzentration der untersuchten Lösung ab (Abbild.). Bei konzentrierteren Lösungen liegt weniger Arabinose im Drehungsminimum vor als bei verdünnten.

¹¹⁾ Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **297**, 164 [1954].

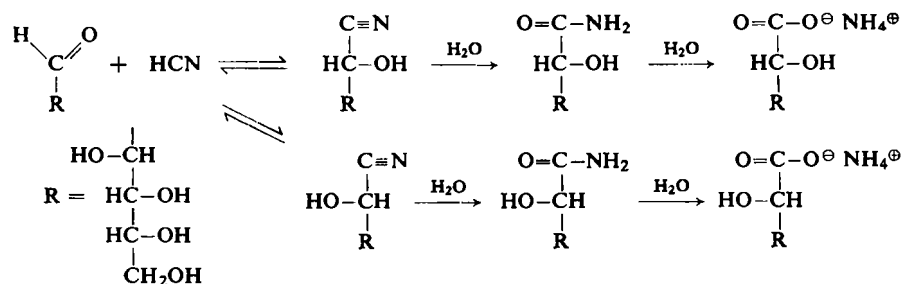
¹²⁾ Z. B. C. LI und T. D. STEWART, J. Amer. chem. Soc. **59**, 2596 [1937].

Qualitativ konnte die Arabinose als Diphenylhydrazon¹³⁾ isoliert werden, jedoch wird unter den Bildungsbedingungen des Hydrazons auch das Gluconsäurenitril abgebaut, und man findet relativ zuviel Arabinose.

Läßt man die Drehungsänderung von Gluconsäurenitril in Wasser bis zu Ende ablaufen (Punkt b, Abbild., Kurve (1)), so findet man papierchromatographisch vor allem Ammonium-gluconat und Ammonium-mannonat und die entsprechenden Hexonamide. Die Arabinose ist fast ganz verschwunden. Gluconsäurenitril liegt nicht mehr vor. Das IR-Spektrum des Rückstandes der vorsichtig eingedampften Lösung stimmt mit diesen Befunden überein.

In dem oben genannten Versuch beobachteten wir eine Enddrehung α : -0.13° . Die quantitative Papierchromatographie und Titration ergaben eine von noch vorhandener Arabinose hervorgerufene Drehung von α : -0.09° . Als Diphenylhydrazon ließ sich praktisch keine Arabinose mehr abscheiden.

Die vorliegenden Befunde ergeben, daß die Bildung von Mannonsäurenitril nicht durch direkte Epimerisierung, sondern durch Zerfall des Gluconsäurenitrils in Arabinose + HCN und anschließende Resynthese zustandekommt:



Die reversible Spaltung von Gluconsäurenitril in Arabinose und Blausäure tritt in Konkurrenz zur irreversiblen Verseifung der beiden Hexonsäurenitrile. Hohe Konzentrationen an Gluconsäurenitril begünstigen den irreversiblen Weg, niedrige Konzentrationen den reversiblen Weg.

Die Spaltung von Cyanhydrinen in HCN und Aldehyd ist vielfach untersucht worden^{14, 15)}. Die Gleichgewichtseinstellung wird durch Amine katalysiert. Setzt man der wäßrigen Lösung von Gluconsäurenitril einige Tropfen *Ammoniak* oder *Benzylamin* zu, so erhält man schlagartig eine stark negative Drehung (Abbild., Kurve (4)), und es liegen 45–50% des Nitrils als Arabinose vor. Der darauf folgende Drehungsanstieg zeigt, daß nicht nur die Cyanhydrindissoziation, sondern auch die Verseifung des Nitrils durch Amine beschleunigt wird.

Bei Katalyse durch Benzylamin (1.5 Moll. auf 1 Mol. Nitril) kristallisiert aus der Reaktionslösung im Laufe einiger Stunden ein Gemisch von Glucon- und Mannonsäurebenzylamid in etwa 40-proz. Ausbeute. Reines Ammoniumgluconat reagiert nicht mit Benzylamin, reines Gluconsäureamid gibt mit Benzylamin im Laufe von

¹³⁾ C. NEUBERG und J. WOHLGEMUTH, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 35, 31 [1902].

¹⁴⁾ T. D. STEWART und B. J. FONTANA, J. Amer. chem. Soc. 62, 3281 [1940].

¹⁵⁾ J. W. BAKER und M. L. HEMMING, J. chem. Soc. [London] 1942, 191.

2 Stdn. in guter Ausbeute das Benzylamid. Gluconsäure- γ - und - δ -lacton bilden innerhalb von 2 Min. Gluconsäurebenzylamid. Wir vermuten, daß bei der Verseifung des Gluconsäurenitrils vor der Stufe des Gluconats lactonartige Zwischenprodukte auftreten, die mit Benzylamin zum schwerlöslichen Benzylamid reagieren.

Die Papierchromatogramme der Gluconsäurenitril-Lösungen zeigen stets noch zwei schwache, schnellwandernde Flecke. Es handelt sich um hydroxylhaltige, nicht-reduzierende Substanzen, die weder mit den Hexonsäurenitrilen, den Hexonamiden, den Ammoniumhexonaten, den Gluconsäurelactonen oder den 2-Desoxy-2-amino-hexonsäurenitrilen identisch sind.

Die „Mutarotation“ von *N*-Methyl-glucosaminsäurenitril⁵⁾ oder *N*-Isopropyl-glucosaminsäurenitril⁶⁾ kann wahrscheinlich nicht wie beim Gluconsäurenitril erklärt werden, da α -Aminonitrile nicht dazu neigen, reversibel in HCN und Imin zu dissoziieren.

Herrn Dr. W. OTTING danken wir für Aufnahme und Interpretation der Infrarotspektren.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Monoskop (H. BOCK, Frankfurt a. M.) bestimmt. Sie sind unkorrigiert. $[\alpha]_D$ -Bestimmungen in 2-dm-Rohren.

D-Gluconsäurenitril: Darstellung nach A. WOHL und O. WOLLENBERG²⁾. Nach viermaliger Umkristallisation aus siedendem *Eisessig* Schmp. 140–141° (Zers.). Der Schmp. sank im Laufe von 3 Wochen auf 130–133° ab. $[\alpha]_D^{20}$: +9.5° (*c* = 2, Wasser), $[\alpha]_D^{20}$: +21.7° (*c* = 1, halbgesättigte Boraxlösung; abwärts mutarotierend).

$C_6H_{11}NO_5$ (177.2) Ber. C 40.68 H 6.26 N 7.91 Gef. C 40.69 H 6.06 N 8.06

Nach fünfmaliger Umkristallisation aus siedendem *absol. Äthanol* Schmp. 120–121° (Zers.). Der Schmp. stieg im Laufe von 3 Wochen auf 125–128°. $[\alpha]_D^{20}$: +8.0° (*c* = 2, Wasser; abwärts mutarotierend). $[\alpha]_D^{20}$: +21.0° (*c* = 1, halbgesättigte Boraxlösung; abwärts mutarotierend).

Gef. C 40.99 H 6.09 N 8.20

Pentaacetyl-D-gluconsäurenitril: Darstellung nach G. ZEMPLÉN und D. KISS¹⁶⁾.

a) Aus Gluconsäurenitril vom Schmp. 140–141°; Ausb. 66% d. Th., Schmp. 84–86°. $[\alpha]_D^{20}$: +47.3° (*c* = 1.1, $CHCl_3$).

$C_{16}H_{21}NO_{10}$ (387.3) Ber. C 49.61 H 5.47 N 3.62 Gef. C 49.42 H 5.27 N 3.82

b) Aus Gluconsäurenitril vom Schmp. 120–121°; Ausb. 76% d. Th., Schmp. 82–84°. $[\alpha]_D^{20}$: +46.4° (*c* = 1.0, $CHCl_3$).

Gef. C 49.90 H 5.20 N 3.78

Die IR-Spektren von a) und b) sind identisch.

Beispiel für den Abbau von Gluconsäurenitril: 0.401 g *D*-Gluconsäurenitril (Schmp. 120 bis 121°) werden in 40.0 ccm dest. Wasser (CO_2 -frei) von 30° gelöst. Die Änderung der optischen Drehung wird im 2-dm-Rohr bei 30° verfolgt⁸⁾. Nach 100 Min. ist α : -0.67°.

a) Ein aliquoter Teil dieser Lösung wird zu einer bekannten Menge $n/100$ $AgNO_3$ gegeben, die mit 0.25 *n* HNO_3 angesäuert ist. Das ausgefallene $AgCN$ wird abfiltriert und das Filtrat

¹⁶⁾ Ber. dtsh. chem. Ges. 60, 165 [1927].

mit n_{100} KSCN mit $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$ als Indikator zurücktitriert. Der Versuch wird wiederholt. Es ergab sich, daß in den 40 ccm Lösung 0.0221 g CN^\ominus , entspr. etwa 0.13 g Arabinose, vorliegen.

b) Ein anderer bemessener Teil der Lösung wird mit 10-proz. Ammoniak und KJ als Indikator versetzt und mit n_{100} AgNO_3 bis zur Trübung titriert. Der Versuch wird wiederholt. Gef. 0.0454 g CN^\ominus in den 40 ccm Lösung. Nach Abzug der unter a) bestimmten freien Blausäure bleiben 0.0233 g CN^\ominus , entspr. etwa 0.16 g Gluconsäurenitril.

c) Ein dritter aliquoter Teil der Lösung wird mit einer bekannten Menge $2n$ HCl angesäuert und der Arabinosegehalt quantitativ papierchromatographisch¹¹⁾ bestimmt. Der Mittelwert von drei Messungen ergab, umgerechnet auf 40 ccm Lösung, 0.14 g Arabinose, 0.135 g Arabinose (Mittelwert von a) und c)) ($[\alpha]_D: -105^\circ$ in Wasser) + 0.16 g Gluconsäurenitril ($[\alpha]_D: +8^\circ$ in Wasser) würden in 40 ccm Lösung eine Drehung von etwa $\alpha: -0.65^\circ$ (2-dm-Rohr) verursachen.

d) Der Rest der Lösung wird nach Konstantwerden der Drehung (85 Stdn.) untersucht, wie unter a), b) und c) beschrieben. Die Titrationsen ergeben 0.014 g Gluconsäurenitril (+ Mannonsäurenitril), jedoch keine freie Blausäure mehr. Papierchromatographisch lassen sich 0.017 g Arabinose nachweisen. Diese Mengen Nitril und Arabinose würden eine Drehung von $\alpha: -0.08^\circ$ verursachen. Beobachtet wurde $\alpha: -0.13^\circ$.

Bei den qualitativen papierchromatographischen Untersuchungen wurde mit Pyridin/Essigester/Wasser/Eisessig = 5:5:3:1 entwickelt¹⁷⁾. Angesprüht wurde mit Benzidin/Perjodat oder mit Anilinphthalat. Als Vergleichssubstanzen liefen mit: reines Ammoniumgluconat, dargestellt aus Gluconsäurelacton und heißem Ammoniakwasser, Gluconamid¹⁸⁾, Gluconsäure- γ -lacton¹⁹⁾ und Gluconsäure- δ -lacton¹⁹⁾, 2-Desoxy-2-amino-L-gluconsäurenitril²⁰⁾ und ein Gemisch von Ammoniumgluconat, Ammoniummannonat, den epimeren Hexonsäureamiden und -nitrilen²⁰⁾ sowie Arabinose. Die epimeren Hexonsäureamide und Ammoniumhexonate lassen sich gut mit Pyridin/n-Butanol/Wasser = 4:1:1 trennen.

N-Benzyl-*D*-gluconsäureamid²¹⁾: Zu 2 g *D*-Gluconsäure- γ - oder - δ -lacton in 25 ccm Wasser gibt man 1.85 ccm (ca. 1.5 Mol) Benzylamin. Nach 4 Stdn. werden 1.62 g (48% d. Th.) *N*-Benzyl-*D*-gluconsäureamid abfiltriert. Schmp. 175–177°. $[\alpha]_D^{20}: +30.2^\circ$ ($c = 0.2$, H_2O), $[\alpha]_D^{20}: +15^\circ$ ($c = 0.9$, Pyridin).

$\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{NO}_6$ (285.3) Ber. C 54.70 H 6.72 N 4.91 Gef. C 54.77 H 6.41 N 5.01

Behandelt man *D*-Gluconsäureamid in gleicher Weise, so lassen sich nach 4 Stdn. 1.51 g (45% d. Th.) *N*-Benzyl-*D*-gluconsäureamid abfiltrieren.

Aus entsprechend behandeltem *D*-Gluconsäurenitril erhält man nach 3 Tagen 1.43 g (42% d. Th.) eines Gemisches von *N*-Benzyl-*D*-gluconsäureamid und *N*-Benzyl-*D*-mannonsäureamid. Schmp. 149–155°. $[\alpha]_D^{20}: -8^\circ$ ($c = 0.9$, Pyridin).

Gef. C 54.88 H 6.85 N 4.65

17) F. G. FISCHER und H. J. NEBEL, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 302, 10 [1955].

18) J. W. E. GLATTFELD und D. MACMILLAN, J. Amer. chem. Soc. 56, 2481 [1934].

19) H. S. ISBELL und H. L. FRUSH, Bur. Standards J. Res. 11, 649 [1933].

20) R. KUHN und W. KIRSCHENLOHR, Liebigs Ann. Chem. 600, 115 [1956].

21) W. E. VAN WIJK, Recueil Trav. chim. Pays-Bas 40, 240 [1921].