

BURCKHARDT HELFERICH, HANS GÜNTHER GERMSCHIED,
WINFRID PIEL¹⁾ und WALTER OST²⁾

Ein Kondensationsprodukt (Tetrasaccharid?) der Glucose

Aus dem Chemischen Institut der Universität Bonn

(Eingegangen am 13. November 1961)

1-[2.4.6-Trimethyl-benzoyl]- β -D-glucose ergibt in Dioxan mit katalytischen Mengen von Methansulfonsäure unter Abspaltung von Mesitylen-carbonsäure-(2) ein amorphes Kondensationsprodukt, das wahrscheinlich in der Hauptsache ein, allerdings weder sterisch noch konstitutionell einheitliches, Tetrasaccharid aus Glucosebausteinen darstellt.

Bei der Verwendung von 1-[2.4.6-Trimethyl-benzoyl]- β -D-glucose zur Synthese von Glucosiden³⁾ war verschiedentlich beobachtet worden, daß nebenher ein nur aus Glucosebausteinen bestehendes schwach reduzierendes Oligosaccharid entsteht. Ohne Zusatz von Alkoholen oder Phenolen in einem OH-freien Lösungsmittel entsteht diese Substanz in recht guter Ausbeute. Die ersten Untersuchungen der Verbindung wurden von H. G. GERMSCHIED und W. PIEL¹⁾ durchgeführt, die genaue experimentelle Untersuchung von W. OST²⁾.

Aus einer klaren Lösung von 1-[2.4.6-Trimethyl-benzoyl]- β -D-glucose in absol. Dioxan fällt nach Zusatz von wenig Methansulfonsäure (als Katalysator) bei 50° im Verlauf einiger Tage ein nicht kristallines Produkt aus. Dabei wird die Mesitylen-carbonsäure-(2) quantitativ abgespalten, wie sich durch Titration sicher nachweisen läßt. Das Kondensationsprodukt reduziert Fehlingsche Lösung in der Hitze nur noch schwach. Die quantitative Bestimmung nach WILLSTÄTTER-SCHUDEL ergab nur 0.77% Aldehydanteil. Das Molekulargewicht der getrockneten Substanz, kryoskopisch in Wasser bestimmt, ist 662. Dies, ebenso wie die C,H-Bestimmung paßt am besten auf eine Verbindung der Zusammensetzung $C_{24}H_{40}O_{20}$, d. h. auf ein Tetrasaccharid-anhydrid. Dafür spricht auch die *vollständige* Abspaltung der Mesitylencarbonsäure im wasserfreien Lösungsmittel: $\frac{3}{4}$ der Mesitylencarbonsäure werden durch Beteiligung von freien OH-Gruppen der Glucose abgespalten, für das letzte Viertel ist aber Wasser notwendig, das bei Verwendung wasserfreien Dioxans nur — unter Anhydridbildung — aus der Glucose stammen kann. Die weitere Untersuchung stimmt ebenfalls am besten auf die oben angegebene Zusammensetzung.

Die Salzsäure-Hydrolyse der Substanz ergibt, chromatographisch und durch Bildung des Osazons nachgewiesen, nur D-Glucose. Chromatographie des Kondensationsproduktes selbst liefert nur Streifen ohne erkennbare isolierte Flecken. Durch Trityllierung wurde die Anwesenheit von OH-Gruppen in 6-Stellung nachgewiesen¹⁾.

1) Aus der Dissertat. W. PIEL, Univ. Bonn 1959.

2) Aus der Diplomarbeit W. OST, Univ. Bonn 1960.

3) B. HELFERICH und D. V. KASHELIKAR, Chem. Ber. 90, 2094 [1957].

Acetylierung mit Pyridin/Acetanhydrid ergibt eine Acetylverbindung, deren Zusammensetzung, Molekulargewicht und Acetylgehalt für ein Dodeca-acetyl-tetrasaccharid-anhydrid passen, soweit man das für eine amorphe Substanz verlangen kann. Auch die Methylierung in Dimethylformamid mit Ag_2O und Methyljodid⁴⁾ ergibt ein Produkt, dessen Zusammensetzung, Molekulargewicht und Methoxylgehalt⁵⁾ mit einem Dodeca-*O*-methyl-tetrasaccharid-anhydrid verträglich sind. Freie OH-Gruppen lassen sich in dem voll-methylierten Produkt weder nach ZEREWITINOFF noch im IR-Spektrum nachweisen.

Die Hydrolyse des methylierten Kondensationsproduktes kann vollständig nur mit Ameisensäure⁶⁾ und dann Salzsäure unter ziemlich energischen Bedingungen durchgeführt werden. Dabei entstehen reduzierende, teilweise *O*-methylierte Glucosen. Papierchromatographisch lassen sich einwandfrei 4 verschiedene Substanzen nachweisen, deren R_F -Werte vielleicht einer *O*-Dimethyl-glucose (Zucker I), zwei *O*-Trimethyl-glucosen (Zucker II und III) und — einwandfrei — der 2.3.4.6-*O*-Tetramethyl-glucose entsprechen. Durch Anwendung der „Linear gradient elution“⁷⁾ lassen sich alle 4 Zucker voneinander trennen. Die R_F -Werte der getrennten Zucker stimmen mit denen der im Gemisch gefundenen überein. Die 2.3.4.6-*O*-Tetramethyl-*D*-glucose (Zucker IV) konnte zwar nicht selbst kristallin erhalten werden, wurde aber durch ihr kristallines Anilid und ihr kristallines *p*-Tosylhydrazon sicher identifiziert.

Auch die gaschromatographische Trennung des hydrolysierten *O*-methylierten Kondensationsproduktes ergab — im analytischen Maßstab durchgeführt — 4 Zucker verschiedener Flüchtigkeit.

Zusammenfassend läßt sich bisher folgendes über das Kondensationsprodukt sagen: In der Hauptsache sprechen die Resultate der Untersuchung für ein Tetrasaccharid-anhydrid aus *D*-Glucose der Zusammensetzung $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_{20}$, das aber sicher nicht einheitlich ist. Die verhältnismäßig hohe Drehung spricht dafür, daß neben β -glucosidischen Bindungen auch α -Bindungen am Aufbau beteiligt sind. Die wenn auch schwache reduzierende Wirkung (Fehlingsche Lösung und Titration nach WILLSTÄTTER-SCHUDEL) beweist die Anwesenheit endständiger Glucose-bausteine und freiem Lactolhydroxyl. Nicht ausgeschlossen ist auch ein Gehalt des Gemisches an einem ringförmigen Tetrasaccharid. Fraktionierungsversuche des Kondensationsproduktes waren bisher nicht erfolgreich. Eine Konstitutionsformel aufzustellen, ist unter diesen Umständen verfrüht.

Trotzdem ist diese „Selbstkondensation“ eines 1-Acylzuckers unter milden Bedingungen zu einem Oligosaccharid (wenn auch einem Gemisch) interessant. Sie läßt sich auch auf andere 1-Acyl-aldosen ausdehnen.

4) R. KUHN, H. TRISCHMANN und I. LÖW, Angew. Chem. 67, 32 [1955].

5) F. VIEBÖCK und A. SCHWAPPACH, Ber. dtsh. chem. Ges. 63, 2818 und 3207 [1930].

6) D. I. MCGILVRAY, J. chem. Soc. [London] 1953, 2580.

7) R. S. ALM, R. J. P. WILLIAMS und A. TISELIUS, Acta chem. scand. 6, 826 [1952]; B. LINDBERG und B. WICKBERG, ebenda 8, 569 [1954]; I. CROON und B. LINDBERG, ebenda 11, 192 [1957].

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Kondensationsprodukt aus 1-[2.4.6-Trimethyl-benzoyl]- β -D-glucose

9.8 g (0.03 Mol) 1-[2.4.6-Trimethyl-benzoyl]- β -D-glucose⁸⁾, gelöst in 35 ccm absol. Dioxan⁹⁾, wurden — wenn nötig — filtriert und nach Zusatz von 0.4 ccm Methansulfonsäure¹⁰⁾ in gut verschlossenem Gefäß etwa 4 Tage bei 50° aufbewahrt. Der dann ausgefallene, amorphe, schwach gelbe Niederschlag wurde nach dem Abkühlen abgesaugt, mit Dioxan und gründlich mit Methanol gewaschen und bei 80°/0.1 Torr über P₂O₅ bis zur Konstanz getrocknet. Man erhielt so das Kondensationsprodukt als staubfeines schwach gelbes Pulver, das ab 180° sich zu verfärben beginnt, beim weiteren Erhitzen sehr dunkel wird und bei 290° noch nicht vollständig geschmolzen ist. Ausb. 4.27 g, d. i. 43.5% d. eingesetzten [2.4.6-Trimethyl-benzoyl]-glucose. Unter der Annahme, daß ein Tetrasaccharid-anhydrid (C₂₄H₄₀O₂₀) entstanden ist, sind dies 88% d. Th. Die Substanz ist leicht löslich in Wasser und Pyridin, so gut wie unlöslich in den gebräuchlichen organischen Lösungsmitteln.

Das Dioxan-Filtrat des Kondensationsproduktes (s. o.) ergab beim Versetzen mit konz. Salzsäure 4.1 g Mesitylen-carbonsäure-(2) (83% d. Th.).

C₂₄H₄₀O₂₀ (648.6) Ber. C 44.44 H 6.22 CHO 4.46

Gef. C 43.42 H 6.42 CHO 0.77 *) Mol.-Gew. 662 (kryoskop. in Wasser)

*) Titration nach WILLSTÄTTER-SCHUDEL¹¹⁾

Die Substanz enthält noch ganz geringe, kaum nachweisbare Mengen an Schwefel (Methansulfonsäure?). Die nur an der Luft getrocknete Verbindung enthält noch 10.7% Wasser (Mittel aus 3 Bestimmungen).

Fehlingsche Lösung wird beim Kochen schwach reduziert. 4¹/₂stdg. Hydrolyse mit 2*n* HCl bei 95° ergab eine Lösung, die nach Befreiung von HCl mit dem Ionenaustauscher Amberlite IR 45, papierchromatographisch nachweisbar nur Glucose enthielt und mit Phenylhydrazin nur Phenylglucosazon gab.

Acetylierung des Kondensationsproduktes: Eine Lösung von 4 g der Subst. in 40 ccm absol. Pyridin wurde nach Zusatz von 20 ccm Acetanhydrid 92 Stdn. bei 25° aufbewahrt. Nach Zusatz von 40 g Eis wurde anschließend mit Chloroform verdünnt, die Lösung mit Wasser, dreimal mit *n* H₂SO₄, dann mit gesätt. NaHCO₃-Lösung basenfrei und säurefrei gewaschen und i. Vak. zur Trockne verdampft. Der Rückstand wurde mit 10 ccm Äthanol vermischt. Nach dem erneuten Eindampfen i. Vak. und Trocknen im Exsikkator hinterblieben 5.75 g einer farblosen Masse.

C₂₄H₂₈O₂₀(CH₃·CO)₁₂ (1153.0) Ber. C 50.00 H 5.60 O 44.40 CH₃CO 44.80

Gef. C 50.45 H 5.65 O 44.23 CH₃CO 45.44

Mol.-Gew. 1338 (in Campher)

In Benzol, ebullioskopisch und kryoskopisch, wurden höhere Werte gefunden. Die Acetylbestimmung wurde nach K. FREUDENBERG¹²⁾ durchgeführt.

Fehlingsche Lösung wurde auch bei längerem Kochen nicht reduziert.

$[\alpha]_D^{25}$: +91.5° (in Chloroform, *c* = 1.1).

⁸⁾ F. MICHEEL und G. BAUM, Chem. Ber. 88, 2020 [1955].

⁹⁾ W. STUMPF, Chemie und Anwendungen des 1,4-Dioxans, S. 31 ff., Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1956.

¹⁰⁾ I. G. Farbenindustrie AG. (Erf.: K. SMEYKAL und E. BÖCK), Dtsch. Reichs-Pat. Nr. 742927 (1941); C. 1944 I, 829.

¹¹⁾ R. WILLSTÄTTER und G. SCHUDEL, Ber. dtsch. chem. Ges. 51, 780 [1918].

¹²⁾ Liebigs Ann. Chem. 433, 230 [1923]; H. BREDERECK, Angew. Chem. 45, 241 [1932].

Methylierung des Kondensationsproduktes: Zu einer Lösung von 2.0 g des Kondensationsproduktes in 24 ccm frisch destilliertem Dimethylformamid wurden 25 g Methyljodid, dann, ohne Rücksicht auf einen entstandenen Niederschlag, unter kräftigem Rühren im Lauf von 20 Min. 9 g Ag_2O ¹³⁾ zugegeben. Die Mischung wurde 40 Stdn. bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Gemisch der Silberverbindungen wurde abgesaugt und mit 20 ccm Dimethylformamid und dann mit 20 ccm Chloroform gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden in eine Lösung von 2 g KCN in 200 ccm Wasser eingeführt, die Chloroformlösung wurde abgelassen, die wäßrige Lösung noch 5mal mit je 40 ccm Chloroform extrahiert, und die vereinigten Chloroformauszüge wurden nach viermaligem Waschen mit je 40 ccm Wasser und Trocknen mit Na_2SO_4 i. Vak. zur Trockne verdampft: 1.8 g eines sehr viskosen gelblichen Sirups. Da die Methoxylbestimmung einen zu niedrigen Wert ergab, wurde die Methylierung auf die gleiche Weise wiederholt: 1.7 g des einmal methylierten Sirups, 20 ccm Dimethylformamid, 25 g Methyljodid, 9 g Ag_2O . Der schließlich erhaltene Rückstand wurde bei 80° und 0.01 Torr bis zur Konstanz getrocknet: 1.58 g eines hellgelben spröden Glases, das sich leicht zu einem elfenbeinfarbenen Pulver zerreiben ließ.

$\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_8(\text{CH}_3\text{O})_{12}$ (816.9) Ber. C 52.93 H 7.90 O 39.17 CH_3O 45.59

Gef. C 53.09 H 7.88 O 38.40 CH_3O 44.95 Mol.-Gew. 793^{*)}

^{*)} In Campher, Mittel aus zwei Versuchen.

Eine dritte Methylierung einer Probe nach der gleichen Methode ergab keine Erhöhung des Methoxylgehaltes mehr. Eine Bestimmung des „aktiven“ Wasserstoffs in Pyridin mit Anisol ergab nur 0.077%, ein Wert, der innerhalb der Fehlergrenze liegt. Im IR-Spektrum der Lösung in Tetrachlorkohlenstoff konnte keine OH-Bande festgestellt werden. Die Substanz ließ sich auch bei 10^{-3} Torr nicht destillieren. $[\alpha]_D^{25}$: +102.4° (in Chloroform, $c = 1$).

Das zweimal methylierte Kondensationsprodukt ist leicht löslich in Methanol, Äthanol, Aceton, Chloroform und Benzol, unlöslich in Petroläther, nicht vollständig löslich in Wasser. Fehlingsche Lösung wird in der Hitze schwach reduziert.

Hydrolyse des methylierten Kondensationsproduktes⁶⁾: 5.0 g des methylierten Kondensationsproduktes wurden 19 Stdn. in 250 ccm 90-proz. Ameisensäure rückgekocht. Nach Abdestillieren der Säure i. Vak. wurde der Rückstand mehrmals mit je 30 ccm Wasser aufgenommen und i. Vak. zur Trockne verdampft. Der zuletzt zurückbleibende, ameisensäurefreie recht dunkle Rückstand wurde zur Entfernung von Formylresten in 210 ccm 1.3 *n* HCl 15 Stdn. rückgekocht, die Lösung, aus der sich schwarze unlösliche Bestandteile abgeschieden hatten, mit Kohle geklärt, mit BaCO_3 neutralisiert und i. Vak. zur Trockne verdampft. Der gepulverte Rückstand wurde im Soxhlet mit 180 ccm Chloroform 42 Stdn. extrahiert. Nach dem Eindampfen i. Vak. blieben 3.8 g eines zähen braunen Sirups zurück.

$\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2(\text{OCH}_3)_3 \cdot \text{CHO}$ (222.2) Ber. CHO 13.09 OCH_3 41.90 Gef. CHO 12.40 OCH_3 36.62

Zur Chromatographie des Hydrolysengemisches wurde als Fließmittel die obere Phase einer Mischung von *n*-Butanol/Äthanol/Wasser (5:1:4) auf Schleicher & Schüll-Papier Nr. 2043 b benützt. Nach dem Trocknen bei 105° wurde mit einer Lösung von Anilinhydrogenphthalat in wassergesättigtem *n*-Butanol besprüht und erneut 30 Min. bei 105° getrocknet. Es waren deutlich 4 Flecken zu erkennen, R_F -Werte 0.548, 0.732, 0.785, 0.887. Eine Reihe von anderen Fließmittelgemischen ergab weniger gute Resultate.

Bei der Chromatographie unvollständig hydrolysierter Mischungen, z. B. Einwirkung der Ameisensäure nur 6 Stdn., dann 2*n* HCl 20 Stdn., erschienen die gleichen Flecken.

¹³⁾ B. HELFERICH und W. KLEIN, Liebigs Ann. Chem. 450, 225 [1926].

Trennung des Hydrolysats vom methylierten Kondensationsprodukt nach der „Linear gradient elution“⁽⁷⁾: Als Adsorbens wurde ein Gemisch gleicher Teile von Aktivkohle (Riedel-Haen, p. a.) und Celit Nr. 535 (Fa. Johns-Manville, bezogen bei Serva, Heidelberg) benützt. Das Gemisch wurde mit konz. Salzsäure ausgekocht, mit Wasser, Äthanol und wieder mit Wasser völlig säurefrei gewaschen und als dünner Brei in Wasser in die Röhre — 62 cm × 31 mm — eingefüllt. Um den für eine genügende Durchlaufgeschwindigkeit nötigen Druck zu erzielen, wurden die zwei Flaschen mit Durchlaufflüssigkeiten ca. 4 m über der Säule stehend angebracht. Die erste, das Mischgefäß, in der mit einem Magnetrührer gerührt wurde, enthielt zu Anfang Wasser (2 l), die zweite, in der nachgefüllt wurde, zu Anfang 8-proz. Äthanol.

Nach Füllung des Rohres wurde auf die Kohle-Celit-Säule — 48 cm — eine Lösung von 1.43 g eines Hydrolysates des methylierten Kondensationsproduktes (unvollständig hydrolysiert, 57% Trimethyl-aldose) in 15 ccm Wasser gegeben. Im Lauf von 19½ Tagen wurden insgesamt 12.9 l Lösungsmittel durchgegeben und in 453 Fraktionen aufgefangen:

Frakt. 1—140, Äthanol 0—8-proz.: 4000 ccm, Durchlaufzeit 93 Stdn.

Frakt. 141—272, Äthanol 8—23-proz.: 3700 ccm, Durchlaufzeit 124 Stdn.

Frakt. 273—419, Äthanol 23—45-proz.: 4200 ccm, Durchlaufzeit 202 Stdn.

Frakt. 420—453, Äthanol 99-proz.: 1000 ccm, Durchlaufzeit 51 Stdn.

Jeweils 5—10 Fraktionen wurden gemeinsam i. Vak. eingedampft. Mit einer Spur des Rückstandes wurde auf Chromatographie-Papier mit Anilinhydrogenphthalat auf reduzierenden Zucker geprüft. Bei positivem Ausfall der Probe wurde ein Chromatogramm (mit n-Butanol/Äthanol/Wasser, s. o.) angefertigt. Fraktionen mit gleichartigem Zuckergehalt wurden zusammengegeben, i. Vak. eingedampft, der Rückstand wurde mit Chloroform aufgenommen, die Lösung nach Filtrieren i. Vak. eingedampft und der Rückstand bei 50° über P₂O₅ bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Die Fraktionen 1—120, 337—356 und 428—453 enthielten keinen Zucker. Die Fraktionen 121—200 enthielten einen Zucker (I) mit R_F 0.55, Frakt. 201—216 ein Gemisch der Zucker I (R_F 0.55) und II (R_F 0.74), Frakt. 217—250 Zucker II (R_F 0.74), Frakt. 251—280 Zucker II (R_F 0.74) und Zucker III (R_F 0.79), Frakt. 281—336 Zucker III (R_F 0.79) und Frakt. 357—427 Zucker IV (R_F 0.89).

Die isolierten Zucker waren viskose Sirupe, die nicht zur Kristallisation gebracht werden konnten. Zucker I: 136 mg. $[\alpha]_D^{20}$: +71.5° in Wasser, $c = 0.6$. Methoxylgehalt 33.13%. Ber. für eine Dimethylglucose 29.81%.

Zucker I + II: 12 mg

Zucker II: 140 mg. $[\alpha]_D^{20}$: +94.5°, in Wasser, $c = 2$. Methoxylgehalt 37.81%. Ber. für Trimethylglucose 41.90%, für Dimethylglucoseanhydrid 32.64%.

Zucker II + III: 110 mg. $[\alpha]_D^{20}$: +84.8°, in Wasser, $c = 2.5$. Methoxylgehalt 38.51%. Zucker III: 144 mg. $[\alpha]_D^{20}$: +73.8°. Methoxylgehalt 39.11%. Ber. für Trimethylglucose 41.90%.

Zucker IV: 316 mg. $[\alpha]_D^{20}$: +88.2°, in Wasser, $c = 6.5$. Methoxylgehalt 49.95%. Ber. für Tetramethylglucose 52.54%.

Gesamtausbeute an reduzierenden Zuckern 858 mg, d. i. 60% der eingesetzten Menge Hydrolysats, das 57% Aldose (als Trimethyl-aldose berechnet) enthielt.

p-Tosylhydrazon von Zucker IV: Eine Lösung von 76 mg des Zuckers IV in 4 ccm absol. Äthanol wurde mit 45 mg *p*-Tosylhydrazin 3.5 Stdn. rückgekocht. Die Anfangsdrehung α_D : +1.62° ging dabei auf +1.05° zurück. Der nach Abdampfen des Äthanols zurückbleibende gelbliche Sirup wurde mit 3 ccm Wasser kurz ausgekocht. Aus der dekantierten Lösung schie-

den sich beim Abkühlen 24 mg des *p*-Tosylhydrazons in farblosen Kristallen ab. Schmp. 72–76°. $[\alpha]_D^{18}$: -41.4° , in Äthanol, $c = 0.5$.



Ein aus 2.3.4.6-Tetramethyl-glucose mit *p*-Tosylhydrazin hergestelltes Vergleichsprodukt schmolz bei 75–77°, $[\alpha]_D^{18}$: -44.0° , $c = 2.2$.

Gaschromatographische Untersuchung des methylierten Kondensationsproduktes: Gerät: Gasofract, Fa. Virus K. G., Bonn. 0.013 ccm Hydrolysat (mit 57% Aldose, als Trimethylglucose berechnet). Temp.: 198°. Trägergas 33 ccm H₂/Min. Brückenstrom: 150 mA; Säule: Analytische Wendelsäule, 180 cm lang, 0.4 cm Ø. Füllmasse: Silikon 550 auf Sterchamol. Die Kurve begann nach 30 Min. anzusteigen. Vier Maxima nach 37, 42, 47 und 53 Min. Die beiden mittleren waren klar erkennbar, die beiden anderen verdeckt.