

281. Herstellung von Derivaten des α -Methyl-D-glucopyranosids

von E. Hardegger und D. Spitz.

(3. IX. 49.)

Zahlreiche Naturstoffe enthalten Uronsäuren in glykosidischer Bindung. Die Identifizierung dieser Hexuronsäuren erfolgte bisher nur an wenigen Beispielen in eindeutiger Weise an Hand kristallisierter Derivate. Die Schwierigkeit der Identifizierung von Uronsäuren ist in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Mineralsäuren und Alkali, sowie in der geringen Zahl analytisch geeigneter Derivate zu suchen¹⁾. Da es unter geeigneten Bedingungen gelingt, durch Methanolyse von Uroniden deren Uronsäuren bei nur geringer Zersetzung als Methyl-uronid-methylester abzuspalten, ist zu erwarten, dass die hier erstmals beschriebenen, leicht zugänglichen, kristallisierten Derivate des α -Methyl-D-glucopyranosids (II) die sichere Bestimmung von D-Glucuronsäure in Naturstoffen bedeutend erleichtern.

Zur Herstellung des α -Methyl-D-glucopyranosids (II) oxydierten wir in mehreren Ansätzen α -Methylglucosid (I), in welchem der Pyranose-Ring in stabiler Anordnung schon enthalten ist, nach K. Maurer und G. Drefahl²⁾ mit Distickstofftetroxyd. Aus den Oxydationsprodukten isolierten wir die in Alkohol unlöslichen, amorphen, sehr hygroskopischen Calcium- bzw. Bariumsalze, aus denen die freien Säuren mittels des Kationen-Austauschers Wofatit KS leicht herzustellen sind.

Die Hydrolyse dieser Säuren mit kochender 90-proz. Ameisensäure nach H. A. Spoehr³⁾ führte nur in geringer Ausbeute zu kristallisiertem Glucuron (III), bzw. nach Acetylierung und chromatographischer Aufarbeitung zu β -Triacetylglucuron (IV)⁴⁾. Zur präparativen Herstellung von III oder IV aus α -Methylglucosid ist das Verfahren in der angegebenen Ausführungsform noch nicht geeignet.

Da auf Grund von Vorversuchen eine weitere Reinigung der offensichtlich uneinheitlichen Erdalkalisalze und der daraus bereiteten Säuren mit physikalischen Methoden wenig aussichtsreich

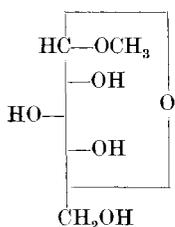
¹⁾ Vgl. z. B. E. Anderson und L. Sands, A Discussion of Methods of Value in Research on Plant Polyuronides, Advances in Carbohydrate Chemistry, Vol. I, S. 338, Academic Press, New York 1945.

²⁾ B. **80**, 94 (1947).

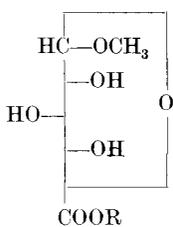
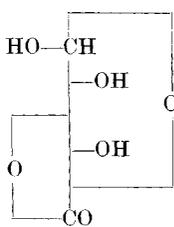
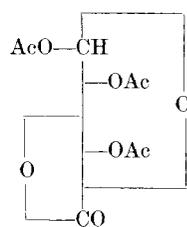
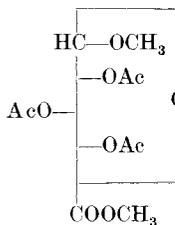
³⁾ Arch. of Biochem. **14**, 153 (1947).

⁴⁾ Vgl. W. F. Goebel und F. H. Babers, J. Biol. Chem. **100**, 743 (1933).

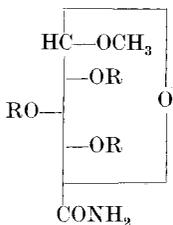
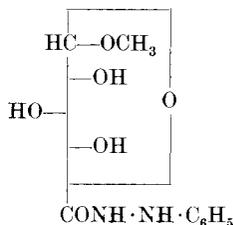
erschien, wurden die Säuren mit Diazomethan, bzw. die Bariumsalze mit methanolischer Salzsäure in Methylester umgewandelt und diese mit Pyridin-Acetanhydrid acetyliert. Durch Destillation im Hochvakuum und Chromatographie an Aluminiumoxyd gelang es leicht, aus dem Gemisch der acetylierten Ester in etwa 10-proz. Ausbeute reines α -Methyl-D-glucuro-pyranosid-methylester-triacetat (V) als farblosen Honig abzutrennen. Das bisher nicht krystallisierende Präparat V zeigte in Chloroform eine spezifische Drehung von $+178^\circ$ und verbrauchte erwartungsgemäss 4 Äquivalente 0,1-n. Natronlauge.



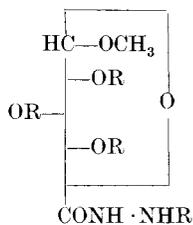
I

II R = H
IIa R = CH₃III¹⁾IV¹⁾

V

VI R = H
VIa R = Ac

VII

VIII R = H
VIIIa R = Ac

Mit Ammoniak in Methanol wird das Methylester-triacetat V unter Abspaltung der Acetyl-Gruppen quantitativ in das sehr schön krystallisierende α -Methyl-D-glucuro-pyranosid-amid (VI) umgewandelt. Das im Hochvakuum leicht sublimierbare Amid VI lieferte mit Acetanhydrid-Pyridin ein ebenfalls krystallisiertes Tri-O-acetyl-Derivat VIa, das mit Ammoniak in Methanol wieder leicht zu VI verseift wurde. Das Amid VI gibt entsprechend seiner Formulierung als Pyranosid im *Weermann*-Test kein Hydrazodicarbonamid.

¹⁾ Mit der hier willkürlich verwendeten pyranoiden Schreibweise von III und IV sollen keine Aussagen über die Gliederzahl der Halbacetal-Ringe gemacht werden. Die Verbindungen III und IV können auch als Furanoside formuliert werden; vgl. z. B. *Advances in Carbohydrate Chemistry*, Vol. 2, S. 171-174 (1946) und die dort referierte Literatur.

Beim Erwärmen des Amids VI mit Phenylhydrazin gelangten wir in guter Ausbeute zu dem bei 211° schmelzenden Phenylhydrazid VII. In analoger Weise gestaltete sich die Umsetzung von VI mit Hydrazinhydrat zum Hydrazid VIII, welche wegen ihres quantitativen Verlaufs hervorgehoben sei. Wie VI ist auch das Hydrazid VIII, allerdings erst bei 220°, im Hochvakuum ohne Zersetzung sublimierbar. Mit Acetanhydrid-Pyridin wurde VIII in das Tetraacetyl-Derivat VIIIa übergeführt.

Für analytische Zwecke scheinen uns das Amid VI, das Triacetylamid VIa und das Hydrazid VIII besonders gut geeignet.

Wir danken der *Rockefeller Foundation* in New York für die Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil¹⁾.

α -Methyl-D-glucuronid (II aus I)²⁾.

20 g trockenes α -Methyl-D-glucosid (I) vom Smp. 166° wurden mit 30 cm³ Distickstofftetroxyd übergossen und unter zeitweisem Umschütteln und Ausschluss von Feuchtigkeit 48 Stunden bei 0° gehalten. Die homogene, grünliche Lösung wurde dann im Wasserstrahlvakuum bei höchstens 40° zur Trockne eingedampft. Der in 200 cm³ Wasser gelöste, blassgelbliche, zähflüssige Rückstand wurde bis zur negativen Reaktion auf Kaliumjodid-Stärke-Papier mit Harnstoff (ca. 2 g) versetzt. Die Lösung wurde nun mit überschüssigem Calciumcarbonat (ca. 10 g) bei 60° neutralisiert³⁾ und nach dem Aufhören der Kohlendioxyd-Entwicklung und Zusatz von Norit³⁾ über Celite filtriert. Das braune, klare Filtrat gab eine positive Orcin-Reaktion⁴⁾; es wurde im Vakuum auf 50 cm³ eingeeengt und vorsichtig in 300 cm³ Alkohol eingegossen, wobei das rohe Calciumsalz des α -Methylglucuronids (II) in flockiger Form ausfiel. Der sehr hygroskopische Niederschlag wurde sofort abgenutscht, mit absolutem Alkohol und Äther gewaschen und sofort im Vakuum über Calciumchlorid getrocknet. Das getrocknete rohe Calciumsalz, ein leicht graues bis gelbliches, amorphes Pulver, wog 13 g. Das Präparat enthielt 10,5% Ca (als Oxalat bestimmt).

In analoger Weise wurden mit Bariumcarbonat an Stelle von Calciumcarbonat amorphe, ebenfalls sehr hygroskopische Bariumsalze hergestellt; aus 100 g α -Methylglucosid wurden beispielsweise 86 g trockene Bariumsalze erhalten.

Die Freilegung der Säure II aus den Calcium- bzw. Bariumsalzen erfolgte durch Filtration der etwa 5-proz. wässrigen Salzlösungen über Wofatit KS (Kationen-Austauscher). Pro Milli-Äquivalent Erdalkali wurden 1,5 cm³ Austauscher verwendet; die Filtrationsgeschwindigkeit betrug etwa 5 cm³ Lösung pro cm³ Austauscher in der Stunde.

In grösseren Ansätzen wurden zur Einsparung von Wofatit zunächst 90–95% des Erdalkalis mit verdünnter Schwefelsäure als Sulfat ausgefällt und nach Filtration die in der Lösung verbliebenen Salze mit dem Austauscher zerlegt.

Die vom Austauscher abtropfenden gelblichen Lösungen, die stets frei von Ca- bzw. Ba-ionen waren, wurden im Vakuum bei 30–40° zur Trockne eingedampft. Aus 30 g Ca-Salz erhielten wir etwa 20 g freie Säuren in Form eines braunen Honigs. Die

¹⁾ Alle Schmelzpunkte sind korrigiert.

²⁾ Vgl. *K. Maurer* und *G. Drejahl*, *B.* **80**, 94 (1947).

³⁾ Während der Neutralisation färbte sich die Lösung braun; von Norit wurde sie nur wenig entfärbt.

⁴⁾ Vgl. *Tollens-Elsner*, *Kurzes Handbuch der Kohlenhydrate*, 4. Auflage, S. 112.

Präparate konnten auch nach wiederholter Behandlung mit Norit nicht kristallisiert werden. Sie sind in Wasser und Alkohol gut, in Äther wenig löslich; bei erhöhter Temperatur (80°) tritt im Vakuum unter Dunkelfärbung offenbar Zersetzung ein.

D-Glucuron (III aus II).

5 g der aus den Calcium- oder Bariumsalzen freigelegten Säuren wurden in 50 cm³ 90-proz. Ameisensäure 12 Stunden am Rückfluss gekocht¹⁾. Die Ameisensäure wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand dreimal mit je 20 cm³ Alkohol im Vakuum zur Trockne eingedampft, in 75 cm³ Wasser gelöst und mit Norit behandelt. Die bräunliche Lösung wurde im Vakuum zum Sirup eingeengt und mit Glucuron angeimpft. Die im Verlaufe einiger Tage ausgeschiedenen Krystalle schmolzen nach dem Umkrystallisieren aus Wasser-Alkohol bei 180° und wogen 0,6 g. In der Mischprobe mit D-Glucuron wurde keine Schmelzpunkterniedrigung beobachtet. Zur Analyse wurde das Präparat 2 Tage bei 70° im Hochvakuum getrocknet.

3,760 mg Subst. gaben 5,602 mg CO₂ und 1,560 mg H₂O
 C₈H₈O₆ Ber. C 40,91 H 4,58% Gef. C 40,66 H 4,64%

$[\alpha]_D = +19^\circ$ (c = 1 in Wasser)

β -Triacetyl-D-glucuron (IV)²⁾. 4 g Mutterlaugen, die bei der Herstellung des D-Glucurons anfielen, wurden mit 10 cm³ Pyridin und 6 cm³ Acetanhydrid acetyliert und die stark dunkel gefärbten, in Chloroform gelösten Acetylierungsprodukte durch 150 g Aluminiumoxyd der Aktivität II—III filtriert. Die eingedampften Filtrate (0,7 g) wurden nochmals an 20 g Aluminiumoxyd (Aktivität I—II) adsorbiert. Die mit Benzol-Äther eluierte Fraktion schmolz nach dem Umkrystallisieren aus Chloroform-Äther bei 193°. Das Analysenpräparat (0,1 g) wurde bei 170° im Hochvakuum sublimiert.

3,618 mg Subst. gaben 6,306 mg CO₂ und 1,505 mg H₂O
 C₁₂H₁₄O₉ Ber. C 47,69 H 4,67% Gef. C 47,57 H 4,63%

α -Methyl-D-glucuronid-methylester (IIa aus II).

a)³⁾ 25 g trockene Bariumsalze aus der Oxydation von α -Methyl-glucosid wurden mit 400 cm³ 2-proz. methanolischer Salzsäure 8 Stunden am Rückfluss gekocht. Nach dem Erkalten der Mischung wurde vom unlöslichen Bariumchlorid abfiltriert, das Filtrat zum Neutralisieren der freien Salzsäure mit überschüssigem Bariumcarbonat geschüttelt, filtriert und das neue Filtrat im Vakuum zur Trockene eingedampft. Der dunkelgefärbte, viscose Rückstand wog 18 g.

b) 6 g rohe, aus den Erdalkalisalzen freigelegte Säuren II wurden in 100 cm³ Methanol gelöst und bei 0° mit 70 cm³ 2-proz. ätherischer Diazomethan-Lösung versetzt. Nach dem Eindampfen im Vakuum bleiben 6,4 g Ester als brauner, nicht kristallisierender Honig zurück.

α -Methyl-D-glucuronid-methylester-2, 3, 4-triacetat (V aus IIa).

6,4 g roher Ester IIa wurden mit 15 cm³ Pyridin und 10 cm³ Acetanhydrid in 24 Stunden bei 5° acetyliert. Die Mischung wurde im Vakuum eingedampft und nach Zugabe

¹⁾ Reines Glucuron bleibt unter den angegebenen Bedingungen praktisch unverändert, vgl. dazu auch die Herstellung von Mannuronsäure-lacton aus Alginsäure, *H. A. Spoehr*, Arch. of Biochem. **14**, 153 (1947).

²⁾ Vgl. *W. F. Goebel* und *F. H. Babers*, J. Biol. Chem. **100**, 743 (1933).

³⁾ Vgl. dazu die Veresterung von 2,3,4-Trimethyl-methylglucuronid, *J. I. Cunneen* und *F. Smith*, Soc. **1948**, 1145.

von etwas Toluol erneut zur Trockene gesaugt. Der in Chloroform aufgenommene Rückstand wurde mit Wasser gewaschen und portionenweise im Kugelrohr bei 140° im Hochvakuum destilliert. Das Destillat (2,8 g) wurde an 100 g Aluminiumoxyd I–II chromatographiert. Die fast farblosen Benzol-Eluate (0,75 g) wurden im Kugelrohr im Hochvakuum bei 120° destilliert und dabei ein geringer kristalliner Vorlauf¹⁾ abgetrennt. Die farblose Hauptfraktion (ca. 0,6 g) wurde analysiert. Das Präparat konnte bisher nicht in kristallisierter Form erhalten werden.

3,914 mg Subst. gaben 6,926 mg CO₂ und 1,998 mg H₂O
 C₁₄H₂₀O₁₀ Ber. C 48,27 H 5,79% Gef. C 48,29 H 5,72%
 $[\alpha]_D = +174^{\circ}$ (c = 0,8 in Chloroform)

55,4 mg Subst. wurden in 10 cm³ 0,1-n. NaOH 10 Minuten auf 90° erwärmt und nach dem Erkalten mit 0,1-n. HCl auf Phenolphthalein zurücktitriert. Der Verbrauch wurde zu 6,33 cm³ 0,1-n. NaOH gefunden (ber. 6,36 cm³).

α -Methyl-glucuronid-amid (VI aus V).

2 g α -Methyl-D-glucuronid-methylester-triacetat (V) wurden in 50 cm³ Methanol gelöst, bei 0° mit Ammoniak gesättigt und über Nacht bei 0° gehalten. Das Präparat kristallisierte nach dem Absaugen der flüchtigen Anteile aus einer Mischung von 2 cm³ Methanol und 10 cm³ Chloroform in sehr schönen, büschelförmig angeordneten Nadeln. Das aus Methanol-Chloroform oder Methanol-Äther umkristallisierte Amid schmolz bei 168°. Das in Wasser und Alkohol leicht, in Äther und Chloroform schwerlösliche Präparat wurde zur Analyse bei 150° im Hochvakuum sublimiert. Die Umsetzung von V zu VI verlief quantitativ.

3,770 mg Subst. gaben 5,611 mg CO₂ und 2,143 mg H₂O
 3,615 mg Subst. gaben 0,218 cm³ N₂ (19°, 738 mm)
 C₇H₁₃O₆N Ber. C 40,58 H 6,32 N 6,76%
 Gef. „ 40,62 „ 6,36 „ 6,84%
 $[\alpha]_D = +135^{\circ}$ (c = 1 in Methanol)

α -Methyl-D-glucuronid-amid-triacetat (VIa aus VI).

200 mg α -Methyl-D-glucuronid-amid (VI) wurden in 1 cm³ Pyridin mit 0,5 cm³ Acetanhydrid 16 Stunden bei 20° gehalten. Das wie üblich aufgearbeitete Präparat war ein farbloser Sirup der nach Zugabe von einigen Tropfen Alkohol kristallisierte. Das im Hochvakuum bei 125° sublimierte Analysenpräparat schmolz bei 133°.

3,744 mg Subst. gaben 6,436 mg CO₂ und 1,940 mg H₂O
 5,201 mg Subst. gaben 0,197 cm³ N₂ (20°, 734 mm)
 C₁₃H₁₉O₉N Ber. C 46,85 H 5,75 N 4,20%
 Gef. „ 46,91 „ 5,80 „ 4,26%
 $[\alpha]_D = +149^{\circ}$ (c = 0,8 in Chloroform)

Verseifung des Triacetats VIa zu VI. 30 mg Amid-triacetat VIa wurden in 5 cm³ Methanol gelöst, bei 0° mit Ammoniak gesättigt und 16 Stunden bei 0° gehalten. Der nach dem Eindampfen aus Methanol-Chloroform kristallisierte Rückstand schmolz bei 168°; er erwies sich nach Mischprobe und optischer Drehung identisch mit α -Methyl-D-glucuronid-amid VI.

α -Methyl-D-glucuronid-phenylhydrazid (VII aus VI).

200 mg α -Methyl-D-glucuronid-amid VI wurden mit 300 mg Phenylhydrazin 16 Stunden, d. h. bis zum Aufhören der Ammoniakentwicklung bei 120° gehalten. Das

¹⁾ Vermutlich Zuckersäure-dimethylester-triacetat.

überschüssige Phenylhydrazin wurde dann im Hochvakuum bei 80° entfernt. Der aus Alkohol-Äther umkrystallisierte Rückstand schmolz bei 211°. Das Analysenpräparat wurde 2 Tage bei 80° im Hochvakuum getrocknet.

3,570 mg Subst. gaben 6,827 mg CO₂ und 2,002 mg H₂O
 3,458 mg Subst. gaben 0,292 cm³ N₂ (18°, 727 mm)
 C₁₃H₁₈O₆N₂ Ber. C 52,34 H 6,08 N 9,39%
 Gef. ,, 52,19 ,, 6,28 ,, 9,48%
 [α]_D = +105° (c = 0,6 in Methanol)

α-Methyl-D-glucuronid-hydrazid (VIII aus VI).

0,7 g α-Methyl-D-glucuronid-amid (VI) und 1 g Hydrazinhydrat wurden bis zum Aufhören der Gasentwicklung, d. h. ca. ½ Stunde unter Rückfluss gekocht. Nach Zugabe von 10 cm³ Alkohol schieden sich alsbald Krystalle aus, die nach dem Umkrystallisieren aus Wasser-Alkohol bei 234° schmolzen. Das Analysenpräparat (0,6 g) wurde bei 220° im Hochvakuum sublimiert.

4,049 mg Subst. gaben 5,617 mg CO₂ und 2,297 mg H₂O
 3,954 mg Subst. gaben 0,443 cm³ N₂ (17°, 722 mm)
 C₇H₁₄O₆N₂ Ber. C 37,84 H 6,35 N 12,61%
 Gef. ,, 37,86 ,, 6,35 ,, 12,53%
 [α]_D = +151° (c = 1 in Wasser)

α-Methyl-D-glucuronid-tetraacetyl-hydrazid (VIIIa aus VIII).

200 mg α-Methyl-D-glucuronid-hydrazid (VIII) wurden in 0,5 cm³ Pyridin und 0,5 cm³ Acetanhydrid über Nacht bei 20° gehalten. Das wie üblich aufgearbeitete Acetyl-Derivat schmolz nach dem Umkrystallisieren aus Benzol bei 167°. Das Analysenpräparat wurde bei 150° im Hochvakuum sublimiert.

3,684 mg Subst. gaben 6,264 mg CO₂ und 1,810 mg H₂O
 3,722 mg Subst. gaben 0,237 cm³ N₂ (17°, 727 mm)
 C₁₅H₂₂O₁₀N₂ Ber. C 46,15 H 5,68 N 7,18%
 Gef. ,, 46,40 ,, 5,50 ,, 7,17%
 [α]_D = +81° (c = 1 in Chloroform)

Die Analysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung von Hrn. *W. Manser* ausgeführt.

Zusammenfassung.

Durch Oxydation von α-Methyl-gluco-pyranosid mit Distickstofftetroxyd gelang es uns erstmals, reine krystallisierte Derivate des α-Methyl-gluco-pyranosids herzustellen.

Organisch-chemisches Laboratorium
 der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.