

Über die chemische Synthese der markierten Aldosen Glucose-1-¹⁴C und Mannose-1-¹⁴C

VON URSULA DREHMANN und KLAUS UHLIG¹⁾

Mit 1 Abbildung

Inhaltsübersicht

Die chemischen Darstellungsverfahren für die Epimeren Mannose/Glucose mit ¹⁴C im 1-Kohlenstoffatom, die aus den inaktiven Aldosesynthesen nach der Cyanhydrin- und nach der Nitromethanmethode entwickelt worden sind, wurden nachgearbeitet und auf ihre Ausbeuten überprüft, wobei die in der Literatur angegebenen Ionenaustauscher Amberlite IR 100 und Duolite A-4 durch die Wofatite KPS 200 und SBS 400 ersetzt wurden. Nach der Cyanhydrinmethode wurden in allen Stufen die Literaturausbeuten erreicht, während bei der Anwendung der Nitromethanmethode in einigen Synthesestufen die Ausbeuten erhöht werden konnten.

Darstellung ¹⁴C-markierter Aldosen

1. Cyanhydrinmethode

Bei der Übertragung der Glucose/Mannose-Synthese nach der Cyanhydrinmethode²⁻⁴⁾ auf markiertes Material konnten in einzelnen Synthesestufen erhebliche Ausbeutesteigerungen erreicht werden. Nach ISBELL⁵⁾ kann eine Gesamtausbeute von ungefähr 50% erzielt werden. Da das markierte Ausgangsmaterial Natriumcyanid-¹⁴C nicht im Überschuß angewendet werden konnte, sind Studien über den Verlauf der Cyanhydrinbildung in Gegenwart anorganischer Salze ohne Cyanidüberschuß gemacht worden. Die Umsetzung erfolgte in Gegenwart von Calciumchlorid⁶⁾, Ammoniumchlorid⁷⁾, Natriumhydrogencarbonat⁷⁾ und Natriumkarbonat/CO₂⁷⁾. Unter diesen Bedingungen verlief die Reaktion

1) Auszug aus der Diplomarbeit von K. UHLIG.

2) H. KILIANI, Ber. dtsh. chem. Ges. **19**, 3033 (1886).

3) H. KILIANI, Ber. dtsh. chem. Ges. **20**, 282 u. 339 (1887).

4) E. FISCHER, Ber. dtsh. chem. Ges. **23**, 262 (1890).

5) H. L. FRUSH u. H. S. ISBELL, J. Res. Bur. Stand. **48**, 163 (1952).

6) C. HUDSON u. a., J. Amer. chem. Soc. **56**, 1248 (1934).

7) M. ZISSIS, J. Amer. chem. Soc. **72**, 3882 (1950).

quantitativ und außerdem konnte je nach Art des zugesetzten Salzes das Verhältnis der epimeren Cyanhydrine mehr nach der Seite der Glucose oder nach der Seite der Mannose verschoben werden.

Wir vollzogen die Kondensation in Gegenwart von Calciumchlorid.

1.1 Bariumgluconat-1-¹⁴C⁸⁾

Eine Lösung von 6 g d-Arabinose, 2 g Natriumcyanid-¹⁴C (100 μ C) und 2,9 g Calciumchlorid-Dihydrat in 250 ml Wasser ließen wir 4 Tage lang bei Raumtemperatur unter häufigem Umschütteln stehen. Da festgestellt werden konnte, daß bei der Hydrolyse der Nitrile unter vermindertem Druck bei 60° C nahezu keine Zersetzung und Verfärbung des Produkts eintritt, erhitzen wir 4 bis 5 Stunden unter diesen Bedingungen und weitere 2,5 Stunden auf dem Dampfbad, wobei das Volumen konstant gehalten wurde. Nach Entfernung der Kationen mit KPS 200 (Säule: 2,5 \times 50 cm) wurde die Lösung zu einem kristallinen Sirup eingedampft. Zur Trennung der Epimeren wurde zunächst die Gluconsäure als Bariumsalz entfernt. Die Lösung des Sirups und von 6,3 g Bariumhydroxyd in 50 ml Wasser wurde 2 Stunden auf dem Dampfbad erhitzt. Nach Einleiten von Kohlendioxyd und Filtration mit Aktivkohle dampften wir das Filtrat unter vermindertem Druck zu einem Sirup ein und nahmen dann in wenig heißem Wasser auf. Nach Methanolzusatz bis zur Trübung und Impfen mit Bariumgluconat gewannen wir nach 4 Tagen das auskristallisierte Bariumgluconat-1-¹⁴C und wuschen es mit Methanol/Wasser 1:1 und Methanol. Aus der Mutterlauge konnten weitere Mengen Bariumgluconat-1-¹⁴C gewonnen werden. Wir erhielten 7,7 g Bariumgluconat-1-¹⁴C mit 65,3 μ C.

Chemische Ausbeute: 67,3% d. Th. Isotopenausbeute: 65,3%.

1.2 Glucon- δ -Lacton-1-¹⁴C

Da das Glucon- δ -Lacton der Gluconsäure der Reduktion mit Natriumamalgam am besten zugänglich ist, mußte die Gluconsäure möglichst vollständig in ihr Lacton übergeführt werden.

1,74 g Bariumgluconat-1-¹⁴C (14,4 μ C) wurden in 20 ml Wasser gelöst und über eine Säule mit KPS 200 (2 \times 40 cm) gegeben. Den Rückstand der unter vermindertem Druck eingedampften Eluate nahmen wir in 10 ml heißem Methylcellosolve (Glykolmenomethyläther) auf. Durch Eindampfen dieser Lösung im Luftstrom in Gegenwart von δ -Lactonkeimen erhielten wir nach 6 bis 8 Stunden 0,87 g Rohlacton mit 12,9 μ C.

Chemische Ausbeute: 83% d. Th. Isotopenausbeute: 89%.

⁸⁾ Sämtliche Synthesen wurden als Modellversuche mit niedrigen Aktivitäten durchgeführt. Sie können jederzeit auf ein höheres Aktivitätsniveau übertragen werden.

1.3 d-Glucose-1-¹⁴C- β -Naphthylhydrazon

Die effektive Reduktion des Glucon- δ -Lactons-1-¹⁴C ist stark von den Versuchsbedingungen abhängig. Es zeigte sich, daß die besten Ausbeuten in schwach saurer Lösung in Gegenwart eines Oxalsäure-Oxalat-Puffers bei p_H 3 bis 3,5 und einer Temperatur unter 15° C erhalten wurden. Als Reduktionsmittel diente 5proz. Natriumamalgam. Wir reduzierten unter den angegebenen Bedingungen 0,36 g Glucon- δ -Lacton in 30 ml auf 0° C abgekühltem Puffer, der 4,7% Oxalsäure und 5,3% Natriumoxalat enthielt, mit 4,6 g 5proz. Natriumamalgam. Als Reduktionsgefäß benutzten wir ein dickwandiges Glasrohr mit einem Rührer aus V2A-Stahl (Abb. 1).

Wir rührten kräftig, bis alles Amalgam verbraucht war. Nach Zugabe von 40 ml Methanol zum Reaktionsgemisch und Filtration der ausgefallenen Salze wurde die Lösung mit $n/10$ Natronlauge neutralisiert und unter vermindertem Druck eingedampft. Wir extrahierten den Rückstand mehrmals mit Methanol, verdünnten mit Wasser und gaben über 2 Säulen (1,5 \times 12 cm) mit KPS 200 und SBS 400. Der sirupöse Rückstand der unter vermindertem Druck eingedampften Eluate wurde in 0,5 ml warmem Wasser aufgenommen und mit einer Lösung von 0,5 g β -Naphthylhydrazin in 10 ml Alkohol versetzt. Nach 5 Stunden saugten wir das ausgeschiedene Hydrazon ab, wuschen es mit Äther und erhielten 0,47 g Glucose-1¹⁴C- β -Naphthylhydrazon, d. s. 80,6% d. Th. Die Gesamtaktivität betrug 3,75 μ C, d. s. 70,3%. Die Spaltung des Hydrazons erfolgte auf dem üblichen Wege mit Benzaldehyd⁹⁾.

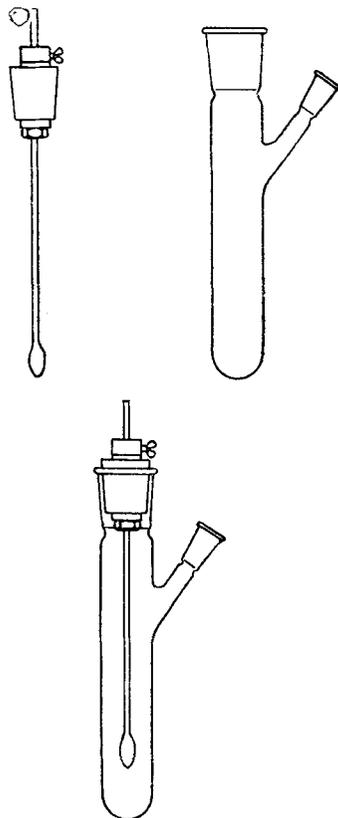


Abb. 1. Reduktionsgefäß für Glucon- δ -Lacton-1-¹⁴C

2. Nitromethanmethode

Die Nitromethanmethode besitzt gegenüber der Cyanhydrinsynthese den Vorteil größerer Schnelligkeit in der Durchführung. Das Ver-

⁹⁾ J. C. SOWDEN u. H. O. L. FISCHER, J. Amer. chem. Soc. **69**, 1963 (1947).

hältnis der gebildeten Epimeren liegt jedoch nicht so günstig auf der Seite der Glucose wie der bei Cyanhydrinsynthese. Das Verhältnis Mannose/Glucose beträgt ungefähr 2,5:1, die Gesamtausbeute etwa 35 bis 40% bezogen auf Nitromethan- ^{14}C . Die Darstellung der epimeren 1-Nitro-1-desoxy-Zuckeralkohole erfolgt durch Umsetzung von Arabinose mit Nitromethan- ^{14}C in Gegenwart von Natriummethylat. Bei Anwendung stöchiometrischer Mengen beträgt die Ausbeute an Natriumsalzen 60 bis 70%. Sie kann auf 85 bis 95% gesteigert werden, wenn nach der Umsetzung von Nitromethan- ^{14}C die gleiche Menge nicht markiertes Nitromethan nachgegeben und dadurch die restliche Arabinose zur Reaktion gebracht wird.

2.1 Natriumsalze der 1- ^{14}C -Zuckeralkohole

Zu einer Suspension von 30 g Arabinose in 50 ml abs. Alkohol wurden 12 g Nitromethan- ^{14}C (100 μC) gegeben und 3,5 g Natrium in 300 ml Methanol. Nach 3stündigem Schütteln auf der Maschine gaben wir noch 12 g nicht markiertes Nitromethan dazu und schüttelten weitere 5–6 Stunden. Nach dem Waschen der abgesaugten Natriumsalze mit Methanol (-20°C) und mit Äther erhielten wir 50 g Natriumsalze von Nitromannitol-1- ^{14}C und Nitrosorbitol-1- ^{14}C mit 81,3 μC . d. s. 85,3% Isotopenausbeute.

2.2 Freie Nitroalkohole

Wir lösten die Natriumsalze in 400 ml Eiswasser und gaben sie über eine Säule mit KPS 200 (4,5 \times 90 cm). Die Eluate dampften wir unter vermindertem Druck zum Sirup ein, der schon teilweise kristallin war. Wir vervollständigten die Kristallisation durch Zugabe von 1 bis 2 ml Alkohol. Nach Absaugen und Trocknen wurde die feste Masse zerkleinert und mit 10 ml Alkohol zerrieben. Wir erhielten 29,5 g fast reines Mannitol-1- ^{14}C , F.: 124 bis 128 $^\circ\text{C}$. Um aus diesem kristallinen Anteil nicht umgesetzte Arabisone zu entfernen, extrahierten wir im Soxleth mit Aceton. Die spezifische Aktivität betrug 1,9 $\mu\text{C}/\text{g}$. Nach einmaligem Umkristallisieren aus Alkohol erhielten wir reines 1-Nitro-1-desoxy-Mannitol-1- ^{14}C , F.: 133 bis 134 $^\circ\text{C}$. Der beim Absaugen des festen Produkts erhaltene dünne Sirup enthielt ungefähr 80% des Sorbitols-1- ^{14}C . Er wurde zur zähen Konsistenz eingedampft und in dieser Form zur Darstellung von Glucose-1- ^{14}C -Naphthylhydrazon verwendet oder direkt auf Glucose-1- ^{14}C weiter verarbeitet. Die Ausbeute an freien Zuckeralkoholen betrug 60%.

2.3 d-Mannose-1-¹⁴C-Phenylhydrazon

1-Nitro-desoxy-Sorbitol-1-¹⁴C und -Mannitol-1-¹⁴C wurden mit Hilfe der Nef-Reaktion in die Zucker übergeführt. Zur Gewinnung von Mannose-1-¹⁴C wurde die Reaktionslösung mit Soda neutralisiert und die Aldose als Phenylhydrazon mit 85% Ausbeute isoliert.

5 g Mannitol-1-¹⁴C (9,5 μ C) wurden in 15 ml 2n Natronlauge gelöst und tropfenweise zu einer Mischung von 7,5 ml Schwefelsäure und 9 ml Wasser unter Rühren bei 10 bis 15°C zugefügt. Nach 30 Minuten langem Rühren verdünnten wir mit Wasser auf 100 ml und neutralisierten mit fester Soda gegen Lackmus. Nach Zugabe einer Lösung von 3 ml Phenylhydrazin in 7 ml Essigsäure kristallisierte nach Stehen über Nacht bei 0°C das Hydrazon aus, das mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen und im Exsikkator getrocknet wurde.

Chemische Ausbeute: 5,2 g, d. s. 81% d. Th. Isotopenausbeute: 7,35 μ C, s. d. 78%.

	Gefunden	Theorie
C	53,7%	53,33%
H	6,48%	6,67%

2.4 d-Glucose-1-¹⁴C- β -Naphthylhydrazin

2 g Sorbitol-1-¹⁴C (2,8° C) wurden in 6 ml 2n Natronlauge gelöst und bei 10 bis 15°C zu einer gerührten Lösung von 3 ml Schwefelsäure in 4 ml Wasser gegeben. Nach 30 Minuten langem Rühren verdünnten wir mit Wasser auf 125 ml. Diese Lösung neutralisierten wir mit Bariumhydroxyd gegen Kongopapier und entfernten die letzten Spuren Sulfat mit Bariumacetat-Lösung. Das Filtrat gaben wir über 2 Säulen mit KPS 200 und SBS 400 (2 \times 70 cm). Die Eluate wurden unter vermindertem Druck eingedampft. Wir gewannen Glucose-1-¹⁴C entweder direkt durch Aufnehmen des entstandenen Sirups in Methanol, Animpfen mit Isopropanol und Zugabe einiger Glucosekeime nach einigen Tagen bei -5 bis -10°C oder durch Überführung in ihr β -Naphthylhydrazon, das anschließend mit Benzaldehyd nach SOWDEN⁹) gespalten wurde. Zu dem in 2 ml warmem Wasser aufgenommenen Eindampfrückstand gaben wir 1,2 g β -Naphthylhydrazin in 30 ml Alkohol, saugten nach 4 Stunden das ausgeschiedene Hydrazon ab und wuschen mit Äther. Aus den Mutterlaugen konnten weitere Mengen Hydrazon erhalten werden.

Chemische Ausbeute: 2,05 g d-Glucose-1-¹⁴C- β -Naphthylhydrazon, d. s. 71% d. Th. Isotopenausbeute: 1,85 μ C, d. s. 66%.

Das anfangs hellgelbe Produkt verfärbte sich durch Reste von nicht umgesetztem β -Naphthylhydrazin nach 2 Tagen bräunlich.

	Gefunden	Theorie
C	59,90%	60,01%
H	6,35%	6,25%

2.5 Glucose-Benzhydrazon

Im Rahmen der Nitromethanmethode wurde die Abscheidung der Glucose als Benzhydrazon nach WOLFF¹⁰⁾ versucht. Wir erhielten 45,5% Ausbeute und fanden bei mehrmaliger Darstellung F.: 180 bis 181° C und nicht wie in der Literatur angegeben 170° C¹¹⁾.

	Gefunden	Theorie
C	51,9%	52,35%
H	5,81%	6,04%

3. Meßmethodik für die ¹⁴C-markierten Verbindungen

Wir führten alle Aktivitätsmessungen mit einem 2 π -Methandurchflußzähler aus. Auf Aluminium-Schälchen (\varnothing 30 mm) wurden durch Eindampfen der aktiven Lösungen im Vakuumexsikkator Meßpräparate in gleichmäßiger, feinkörniger Schicht hergestellt. Durch Kontrollmessungen von Standardpräparaten konnten wir feststellen, daß an so hergestellten Meßproben etwa 20% der absoluten Aktivität gemessen werden. Alle erhaltenen Werte wurden mit Hilfe der von uns für den 2 π -Methandurchflußzähler angefertigten Selbstabsorptionskorrekturkurven auf die wahre Aktivität umgerechnet¹²⁾.

Für die Durchführung der Mikroelementaranalysen danken wir Herrn GÜNTHER HOTZKOW.

¹⁰⁾ B. WOLFF, Ber. dtsh. chem. Ges. **28**, 161 (1895).

¹¹⁾ A. STRUVE, J. prakt. Chem. **50**, 295 (1919).

¹²⁾ U. DREHMANN u. H. J. BORN, J. prakt. Chem. [4] **5**, 200 (1957).

Berlin-Buch und Dresden, Institut für Medizin und Biologie, Bereich angewandte Isotopenforschung, Deutsche Akademie der Wissenschaften zu Berlin und Institut für Anwendung radioaktiver Isotope der Technischen Hochschule Dresden.

Bei der Redaktion eingegangen am 30. August 1958.