

## DESOXYZUCKER

## 33. MITTEILUNG\*. PAPIERCHROMATOGRAPHISCHE DIFFERENZIERUNG DER HEXAMETHYLOSEN UND IHRER 3-O-METHYL-DERIVATE\*\*

M. T. KRAUSS, HERB. JÄGER, O. SCHINDLER UND T. REICHSTEIN

*Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel (Schweiz)*

(Eingegangen den 20. April 1959)

## I. PAPIERCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG DER HEXAMETHYLOSEN UND DEREN 3-O-METHYL-DERIVATE

Von den theoretisch möglichen acht Paaren normaler Hexamethylosen ist von jedem Paar mindestens ein Vertreter bekannt. Von den zugehörigen 3-O-Methylderivaten kennt man Repräsentanten von 6 Paaren (unbekannt sind hier noch die Allo- und die Gulo-Verbindungen). Für die Identifizierung solcher Zucker sind papierchromatographische Methoden äusserst hilfreich. Die bisher in der Literatur angegebenen Systeme sind aber für eine sichere Differenzierung\*\*\* aller Isomeren ungenügend.

HIRST UND JONES<sup>1</sup> bestimmten im System *n*-Butanol-Äthanol-Wasser (5:1:4) die  $R_F$ -Werte von Fucose, Glucomethylose, Rhamnose und Talomethylose. Die Unterschiede der Wanderungsgeschwindigkeiten sind aber für eine eindeutige Zuordnung zu gering. Das gleiche gilt von dem System Äthylacetat-Pyridin-Wasser (2:2:1), das ISHERWOOD UND JERMYN<sup>2</sup> verwendeten. In diesem System lässt sich höchstens Fucose sicher differenzieren. Die übrigen Hexamethylosen bilden zwei Gruppen, eine kürzer (Gulomethylose, Allomethylose und Rhamnose) und eine rascher wandernde (Altromethylose, Talomethylose und Idomethylose). Eine Zuordnung innerhalb der Gruppen ist kaum möglich. Im System *n*-Butanol-Pyridin-Wasser (3:2:1.5) waren die  $R_F$ -Werte von Rhamnose, Glucomethylose, Gulomethylose und Allomethylose praktisch gleich<sup>3, 4</sup>.

Versuche zur Trennung der verschiedenen 3-O-Methylhexamethylosen beschränkten sich bisher auf Thevetose, Acofriose und Digitalose im System *n*-Butanol-Pyridin-Wasser (3:2:1.5)<sup>4</sup> sowie 3-O-Methylglucomethylose und 3-O-Methylaltromethylose im System *n*-Butanol-Äthanol-Wasser (5:1:4)<sup>1</sup> und schliesslich Digitalose und Thevetose in verschiedenen Systemen durch KAISER<sup>5</sup>. Im zuerst erwähnten System sowie in den von KAISER empfohlenen Systemen lässt sich Digitalose abtrennen, während die Unterschiede zwischen den anderen untersuchten Zuckern zu gering sind.

\* 32. Mitteilung: O. RENKONEN UND O. SCHINDLER, *Helv. Chim. Acta*, 39 (1956) 1490.

\*\* Auszug aus Diss. M. T. KRAUSS, Basel, die demnächst erscheint.

\*\*\* Selbstverständlich kann ein Zucker durch papierchromatographische Methoden allein nie ganz sicher identifiziert werden. Erreichbar und nötig ist aber eine eindeutige Differenzierung aller acht Raumisomeren mit normaler Kette, soweit sie bekannt sind.

Den erwähnten Systemen ist gemeinsam, dass die Zucker darin eine relativ grosse Wanderungsgeschwindigkeit besitzen. Für die Trennung nahe verwandter Stoffe sind jedoch Systeme mit kleiner Wanderungsgeschwindigkeit und dementsprechend längerer Dauer des Chromatogramms besser geeignet<sup>6</sup>. In Anlehnung an frühere erfolgreiche Versuche bei der Trennung der 2-Desoxy-3-O-methyl-hexamethylosen<sup>7</sup> haben wir nach solchen Systemen gesucht. Die drei folgenden haben sich für die Unterscheidung der sechs 3-O-Methylhexamethylosen gut bewährt\*.

- System I: Toluol-Methyläthylketon (1 : 2)/Wasser\*.  
 Laufzeit 30-40 Std.
- System II: Toluol-*n*-Butanol (1 : 1)/Wasser.  
 Laufzeit 24-28 Std.
- System III: *n*-Butanol-Methyläthylketon (1 : 1)/Borsäure-Borax-Puffer\*.  
 Laufzeit 40-50 Std.

Tabelle I enthält die relativen Wanderungsgeschwindigkeiten der 3-O-Methyl-hexamethylosen. Es geht daraus hervor, dass die Reihenfolge der Laufstrecken in den Systemen I und II gleich ist. Die Unterschiede in den Wanderungsgeschwindigkeiten genügen auch für eine sichere Unterscheidung\*\* ausser beim Paar 3-O-Methylaltromethylose und Acovenose. Die beiden letztgenannten Zucker können aber im System III eindeutig voneinander unterschieden werden.

Bei den freien Hexamethylosen, von denen Vertreter aller acht theoretisch möglichen Isomeren-Paare bekannt sind, waren die folgenden Systeme IV und V für eine Vortrennung in Gruppen geeignet.

- System IV: *n*-Butanol/Wasser.  
 Laufzeit 40-50 Std.
- System V: Methyläthylketon/Wasser.  
 Laufzeit 16-23 Std.

In diesen beiden Systemen lassen sich jedoch Gulomethylose, Glucomethylose und Rhamnose einerseits sowie Idomethylose und Talomethylose andererseits, nicht sicher voneinander unterscheiden\*\* (vgl. Tabelle II). Die Trennung dieser Zucker gelingt aber in den Systemen VI und VII, in denen wieder wie oben bei den stationären Phasen das Wasser durch Borsäure-Borax-Pufferlösung ersetzt ist.

- System VI: *n*-Butanol-Äthanol (4 : 1)/Borsäure-Borax-Puffer\*\*\*.  
 Laufzeit 28-48 Std.\*\*\*\*
- System VII: *n*-Butanol-Methyläthylketon (1 : 1)/Borsäure-Borax-Puffer.  
 Laufzeit 48-68 Std.

Es ist aus der Tabelle II ersichtlich, dass die geringen Unterschiede, die innerhalb der zwei Gruppen Rhamnose-Glucomethylose-Gulomethylose und Idomethylose-

\* Das Papier wurde jeweils mit der ruhenden wässrigen Phase imprägniert. Genaue Ausführung vgl. Experimenteller Teil dieser Arbeit.

\*\* Wir betrachten zwei Zucker als eindeutig unterscheidbar, wenn sich ihre Laufstrecken im Papierchromatogramm um mindestens 10% unterscheiden.

\*\*\* Genaue Ausführung vgl. Experimenteller Teil dieser Arbeit.

\*\*\*\* Um die Wanderungsgeschwindigkeit zu erhöhen, wurde in diesem System Whatman No. 7 Papier an Stelle von Whatman No. 1 verwendet.

TABELLE I  
LAUFSTRECKEN DER SECHS BISHER BEKANNTEN 3-O-METHYL-HEXAMETHYLOSEN  
BEZOGEN AUF D-THEVETOSE = 1.00

Zucker	Konfiguration der verwendeten Probe	Smp.	Laufstrecken im System			Konstellation der HO- bzw. CH <sub>2</sub> O-Gruppen für die C-1 Form <sup>a</sup> der D-Reihe <sup>a</sup> an		
			I	II	III	C-2	C-3(OCH <sub>3</sub> )	C-4
Digitalose <sup>9</sup>	D-Galacto	119°	0.37	0.56	0.83	e	e	a
Acofriose <sup>10</sup>	L-Manno	111-114°	0.84	0.74	1.77	a	e	e
Thevetose <sup>11</sup>	D-GlucO	126-129°	1.00	1.00	1.00	e	e	e
3-O-Methyl- altromethylose <sup>12</sup>	D-Altro	108-113°	2.33	1.59	0.66	a	a	e
Acovenose <sup>13</sup>	L-Talo	amorph	2.49	1.69	0.83	a	e	a
3-O-Methyl- idomethylose <sup>14</sup>	D-Ido	amorph	2.86-2.97	2.33	0.60	a	a	a

\* Um die Übersicht zu erleichtern, wurde überall auf die D-Form bezogen, auch wenn nur die L-Form bekannt war. Nach der Definition von REEVES<sup>8</sup> ist das Spiegelbild der C-1 Form der D-Reihe als 1-C Form in der L-Reihe zu bezeichnen. Bei der D-Glucose ist also die C-1 Form und bei der L-Glucose die 1-C Form stabiler.

TABELLE II  
LAUFSTRECKEN DER HEXAMETHYLOSEN BEZOGEN AUF L-RHAMNOSE = 1.00

Zucker	Smp.	Relative Laufstrecken				Konstellation der HO-Gruppe für die C-1 Form der D-Reihe, bzw. 1-C Form der L-Reihe <sup>a</sup> an		
		IV	V	VI	VII*	C-2	C-3	C-4
D-Fucose	140-146°	0.67	0.68	0.48	0.46	e	e	a
D-Allomethylose <sup>15-17</sup>	146°	0.91	1.38	0.78	0.64	e	a	e
D-Glucomethylose <sup>18</sup>	139-140°	0.99	0.98	0.78	0.78	e	e	e
L-Rhamnose	122-126°	1.00	1.00	1.00	1.00	a	e	e
D-Gulomethylose <sup>19</sup>	124-125°	1.02	0.98	0.78	0.69	e	a	a
D-Altromethylose <sup>20</sup>	amorph	1.13	1.84	0.42	0.40	a	a	e
L-Idomethylose <sup>21</sup>	97-100°	1.28	2.00	0.36	0.33	a	a	a
L-Talomethylose <sup>22</sup>	116-118°	1.37	1.84	0.72	0.77	a	e	a

\* Um die Wanderungsgeschwindigkeit zu erhöhen, wurde in diesem System Whatman No. 7 Papier an Stelle von Whatman No. 1 verwendet.

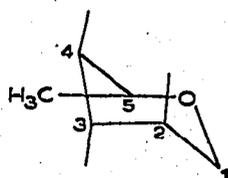
\*\* Siehe Fussnote zu Tabelle I.

Talomethylose in den Systemen IV und V bestehen, mit Borat-Puffer als stationärer Phase in den Systemen VI und VII soweit vergrößert werden, dass eine sichere Zuordnung möglich ist. Das Paar Glucomethylose und Gulomethylose liess sich jedoch bisher nur im System VII gerade noch knapp differenzieren.

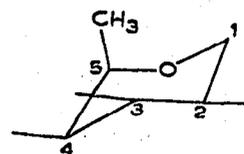
## II. VERSUCH ZUR ERKLÄRUNG DER UNTERSCHIEDE IN DEN WANDERUNGSGESCHWINDIGKEITEN

Die Reihenfolge der Wanderungsgeschwindigkeiten in den Systemen I, II, IV und V mit Wasser als stationärer Phase lässt sich ähnlich deuten, wie dies früher für die Hexosen und Pentosen geschehen ist<sup>23</sup>. Danach wird die Wanderungsgeschwindigkeit

raumisomerer Zucker in erster Linie vom Grad ihrer Hydratisierung bestimmt<sup>2,24,25</sup>. Je stärker hydratisiert das Molekül ist, umso langsamer wandert es in den genannten Systemen. Da bei hexacyclischen Stoffen äquatoriale HO-Gruppen in der Regel stärker hydratisiert sind als axiale, sollte die Wanderungsgeschwindigkeit isomerer Zucker in erster Annäherung der Anzahl axialer HO-Gruppen, die sie tragen, proportional sein. In den Tabellen I und II sind die Konstellationen der verschiedenen HO-Gruppen für die C-1 Form<sup>8</sup> der D-Reihe\* angegeben\*\*. Es ist dabei ersichtlich, dass die angegebene Regel tatsächlich in erster Annäherung stimmt. Die Zucker mit Glucose-Konfiguration (Glucomethylose und Thevetose) verhalten sich aber auch hier wieder nicht entsprechend der Regel. Obgleich bei diesen Isomeren sämtliche HO-Gruppen und die CH<sub>3</sub>O-Gruppe bei den 3-O-Methyl-derivaten äquatorial angeordnet sind, zeigen sie nicht die kürzeste Laufstrecke. Die geringste Wanderungsgeschwindigkeit kommt vielmehr auch hier wieder den Vertretern mit Galactose-Konfiguration (Fucose und Digitalose) zu\*\*\*. Gewisse Differenzen gegenüber den analogen Hexosen<sup>23</sup> zeigen jedoch die 4 letzten Vertreter der Hexamethylosen in Tabelle II. Vor allem weist die Ido-Konfiguration in den Systemen IV und V nicht unbedingt die grösste Laufstrecke auf. Dies ist aber leicht verständlich, denn die Methylgruppe am C-Atom Nr. 5 bei den D-Hexamethylosen vermag den Pyranring nicht so stark in der C-1 Form zu fixieren wie die grössere HOCH<sub>2</sub>-Gruppe der D-Hexosen\*\*\*\*. Die D-Idomethylose dürfte in Lösung daher zu einem merklichen



I  
C-1 Form



II  
1-C Form

Prozentsatz in der 1-C Form (II) vorliegen, für die D-Formen der Altro-, Gulo- und Talomethylosen könnte dies auch noch zu einem geringeren Teil zutreffen. Vermutlich ist dies ein Grund, warum sich die Altro-, Talo- und Idomethylose im Papierchromatogramm ohne Borat-Puffer relativ schlecht trennen.

### Borsäure-Komplexe

Die Komplexe, die Borsäure mit mehrwertigen Hydroxy-Verbindungen eingeht, sind eingehend untersucht<sup>28,29</sup> und in letzter Zeit besonders auch zur Zonen-Elektrophorese<sup>29</sup> benützt worden. Sie bilden sich in reversibler Reaktion. Dabei liegt in alkalifreier Borsäure-Lösung das Gleichgewicht meistens weitgehend auf der Seite

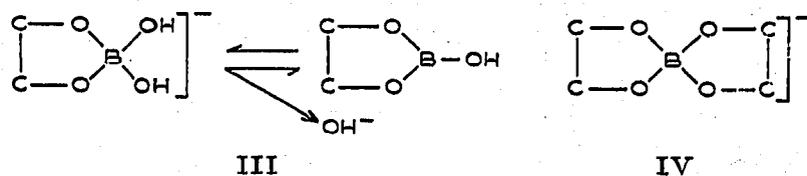
\* Siehe Fussnote zu Tabelle I.

\*\* Die HO-Gruppe am reduzierenden C-Atom wurde nicht berücksichtigt, da hier nur das Verhältnis  $\alpha$ :  $\beta$ -Form massgebend ist und dieses nicht in allen Fällen bekannt ist.

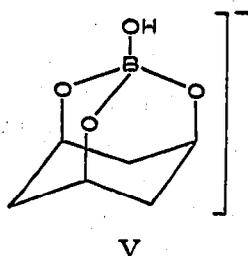
\*\*\* Ähnliche Verhältnisse herrschen auch bei den 2-Amino-2-desoxyhexosen und ihren N-Acetyl-derivaten. Vgl. hierzu KUHN *et al.*<sup>26</sup>.

\*\*\*\* Nach PITZER UND BECKETT<sup>27</sup> beträgt die Energiedifferenz zwischen (a)- und (e)-Methylcyclohexan 1.8 kcal pro Mol.

der Komponenten, und erst durch Laugezusatz entstehen die Komplexe in merklicher Konzentration<sup>30</sup>. Je nach Reaktionsbedingungen bilden sich die 1:1-Komplexe (III) oder die spiranförmigen 2:1-Komplexe (IV), von denen nur IV viel stärker sauer sind als Borsäure selbst<sup>28</sup>.



In einzelnen Fällen wurden auch dreizählige Komplexe (entsprechend Formel V) diskutiert, ihre Existenz scheint aber bisher nur bei Cycliten<sup>31,32</sup> mit *cis*-ständigen HO-Gruppen in 1,3,5 Stellung bewiesen zu sein\*. Unter den von uns benutzten Bedingungen (sehr grosser Überschuss an Borat) ist vorwiegend mit 1:1-Komplexen (III) zu rechnen. Diese Bedingungen (insbesondere pH = ca. 8.8) entsprechen weitgehend denjenigen, die FOSTER<sup>29,33</sup> für die Elektrophorese verwendete. Obgleich die



Ergebnisse der Elektrophorese vermutlich nicht quantitativ auf die Verhältnisse bei der Papierchromatographie übertragen werden dürfen\*\*, sind doch weitgehende Parallelen zu erwarten\*\*\*. Nach FOSTER scheinen unter diesen Bedingungen aliphatische 1,2 und 1,3 Dióle praktisch immer schwache Komplexe zu geben. Die Tendenz zur Komplexbildung steigt mit der Anzahl anwesender HO-Gruppen. Die Frage, ob bei Zuckern die freie Aldehydo-Form massgeblich an der Komplexbildung beteiligt ist, lässt er offen, da keine sicheren Beweise vorliegen. Es ist zwar bekannt, dass sich der Anteil an offenkettiger Form in alkalischer Lösung vergrössert<sup>34</sup>; er bleibt aber gegenüber der pyranosiden Form immer noch sehr gering. Dazu kommt, dass FOSTER bei drei raumisomeren Hexiten (Galactit, Glucit und Mannit) nur sehr wenig verschiedene Laufstrecken fand. Zur Erklärung der Laufstrecken unserer Zucker im

\* FOSTER (Ref.<sup>29</sup>, S. 101) macht darauf aufmerksam, dass die Bildung eines dreizähligen Komplexes an den HO-Gruppen von C<sub>3</sub>, C<sub>5</sub> und C<sub>6</sub> in gewissen D-Gluco-furanosiden möglich wäre.

\*\* Bei der Elektrophorese dürfte schon ein kleiner Anteil des Spirans IV wegen seiner viel stärkeren Ladung die Laufgeschwindigkeit erheblich vergrössern. Falls sich das Gleichgewicht zwischen III und IV jeweils rasch genug einstellt, sollte keine Aufspaltung in zwei Zonen erfolgen. Bei der Papierchromatographie würde sich ein kleiner Anteil an IV viel weniger auswirken.

\*\*\* In reiner Borsäure, wie sie BÖESEKEN<sup>28</sup> meistens für seine Messungen verwendet hat, herrschen stark abweichende Gesetzmässigkeiten.

TABELLE III

VERKLEINERUNG DES R<sub>F</sub>-WERTES MIT BORAT-PUFFER ALS STATIONÄRER PHASE UND MÖGLICHKEITEN DER KOMPLEXBILDUNG

Zucker (Konfiguration)	Verzögerungs-faktor	Mögliche Komplexbildung in der pyranosiden C-1 Form der D-Reihe*		Mögliche Komplexbildung in der pyranosiden r-C Form der D-Reihe*	
		e-a Komplex	a-a Komplex	e-a Komplex	a-a Komplex
		Beteiligte HO-Gruppen	Stellung zu -OCH <sub>3</sub>	Beteiligte HO-Gruppen	Stellung zu -OCH <sub>3</sub>
Digitalose (Galacto)	3.2	1α-2	trans	1α-2	trans
Acofriose (Manno)	1.42	1β-2	cis	1β-2	cis
Thevetose (Gluc)	3.80	1α-2	trans	1α-2	trans
3-O-Methyl-altromethylose (Altro)	6.15	1β-2	trans	1β-2	trans
Acovenose (Talo)	4.64	1β-2	cis	1β-2	cis
3-O-Methyl-idomethylose (Ido)	6.84	1β-2	trans	1β-2	trans

\* Um die Übersicht zu erleichtern, wurde überall auf die D-Form bezogen, auch wenn nur die L-Form bekannt war. Nach der Definition von REEVES<sup>8</sup> ist das Spiegelbild der C-1 Form der D-Reihe als r-C Form in der L-Reihe zu bezeichnen. Bei der D-Glucose ist also die C-1 Form und bei der L-Glucose die r-C Form stabiler.

TABELLE IV

VERZÖGERUNGSFAKTOREN UND MÖGLICHKEITEN ZUR KOMPLEXBILDUNG BEI HEXAMETHYLOSEN

Zucker	Relativer Verzögerungs-faktor bezogen auf Rhamnose*	Mögliche Komplexbildung in der pyranosiden C-1 Form der D-Reihe**			Mögliche Komplexbildung in der pyranosiden r-C Form der D-Reihe**		
		e-a Komplexe	a-a Komplexe	e-a Komplexe	e-a Komplexe	a-a Komplexe	a-a Komplexe
		Beteiligte HO-Gruppen	Relative Lage ev. gleichz. mögl. Kompl. zueinander	Beteiligte HO-Gruppen	Relative Lage der Komplexe zueinander	Beteiligte HO-Gruppen	Relative Lage der Komplexe zueinander
Rhamnose	1.00*	1β-2, 2-3	—	1β-2, 2-3	—	1β-3	—
Allomethylose	1.17	1α-2, 2-3, 3-4	cis	1α-3	cis	2-4	—
Gulomethylose	1.31	1α-2, 2-3	—	1α-3	—	—	—
Facose	1.40	1α-2, 3-4	trans	—	trans	1β-3	—
Glucumethylose	1.43	1α-2	—	—	—	1β-3, 2-4	trans
Talomethylose	1.78	1β-2, 2-3, 3-4	cis	2-4	cis	1β-3	—
Altromethylose	2.82	1β-2, 3-4	trans	1α-3	trans	—	—
Idomethylose	3.88	1β-2	—	1α-3, 2-4	trans	—	—

\* Die Methode der Berechnung der Faktoren bedingt, dass Rhamnose den Wert 1.00 erhält. Dies bedeutet aber nicht, dass Rhamnose mit Borat-Ionen keinen Komplex bildet, sondern nur, dass der Komplex am schwächsten ist.

\*\* Siehe Fussnote zu Tabelle III.

Papierchromatogramm wollen wir uns daher auf die pyranosiden Ringformen beschränken\*, da sie in Lösung bestimmt dominieren.

Zunächst kann aus den Papierchromatogrammen, wie erwartet, entnommen werden, dass die Komplexbildung die Wanderungsgeschwindigkeit des Zuckers verkleinert. Die Verzögerung ist umso grösser, je günstiger die Bedingungen für die Komplexbildung liegen. Nach FOSTER<sup>29</sup> sind bei Pyranosen zwei benachbarte *cis*-ständige HO-Gruppen nötig, damit ein Komplex entstehen kann\*\*. Der Abstand zwischen den O-Atomen von zwei äquatorialen *trans*-ständigen HO-Gruppen in Cyclohexan beträgt 2.83 Å<sup>30,37</sup>; dieser Abstand ist offenbar noch zu gross, um die Komplexbildung mit Borat zu ermöglichen. Bei benachbarten *cis*-ständigen Gruppen ist dieser Abstand zwar praktisch gleich gross, lässt sich aber durch eine leichte Ausflachung der Sesselform des 6-Ringes verkleinern\*\*\*. Aus den zwei Tabellen III und IV glauben wir auch schliessen zu müssen, dass zwei  $\beta$ -ständige *cis*-axiale HO-Gruppen zur Komplexbildung befähigt sind. Der Abstand ihrer O-Atome beträgt für die Sesselform des Cyclohexans 2.51 Å<sup>36,37</sup>. Die dreizähligen Komplexe gewisser Cyclite (III) müssen ja auch entsprechende Bindungen enthalten.

Um einen brauchbaren Vergleich zwischen Laufstrecke und Komplexbildung zu erhalten, haben wir die Laufstrecken der 3-O-Methyl-hexamethylosen (Tabelle I) im System III mit den Werten verglichen, die beim Ersatz des Borats durch einen Naphosphat-Puffer von gleichem pH und möglichst gleicher Molarität erhalten wurden (vgl. Tabelle III). Wir bezeichnen hier den Quotienten

$$\frac{\text{Laufstrecke im Phosphatsystem}}{\text{Laufstrecke im Boratsystem}} = \text{Verzögerungsfaktor.}$$

Diesen Verzögerungsfaktor betrachten wir als brauchbares Mass für die Komplexbildung.

Bei den Hexamethylosen haben wir auf die Bestimmung der Laufstrecken im Phosphatsystem verzichtet und direkt die Laufstrecken der Systeme IV und VI miteinander verglichen. Die so erhaltenen Verzögerungsfaktoren (vgl. Tabelle IV) sind durch den "Salzeffekt" verfälscht, aus diesem Grunde wurden in Tabelle IV keine Absolutwerte sondern nur Relativwerte angegeben\*\*\*\*.

#### *Besprechung der 3-O-Methyl-hexamethylosen*

Bei den Zuckern der Tabelle III sind e-a-Komplexe (äquatorial-axial, also solche zwischen *cis*-ständigen benachbarten HO-Gruppen) nur unter Beteiligung der Hydroxyle an den ersten zwei C-Atomen möglich. Für die C-1 Form der D-Reihe ergibt sich

\* FOSTER fand bei Aldopentosen und Aldoheptosen keine sicheren Anhaltspunkte dafür, dass die furanoside Form massgeblich an der Komplexbildung beteiligt wäre.

\*\* Bei Hexosen kann sich auch die HOCH<sub>2</sub>-Gruppe (C6) an der Komplexbildung beteiligen, die in unseren Zuckern fehlt. Hier herrschen daher andere Verhältnisse. Über sterische Beeinflussung dieser 6-Ring-Komplexbildung vgl. BARKER *et al.*<sup>35</sup>.

\*\*\* Es ist weniger Energie nötig um die Sesselform eines 6-Ringes auszuflachen als um sie noch mehr zu knicken.

\*\*\*\* Die relativen Laufstrecken der Zucker ändern sich nicht merklich, wenn man von Wasser zu Phosphat übergeht.

für die Acovenose und für die 3-O-Methyl-idomethylose ausserdem noch die Möglichkeit zur Bildung eines a-a-Komplexes (di-axial zwischen den HO-Gruppen an den C-Atomen 2 und 4). Diese zwei Zucker zeigen auch einen besonders grossen Verzögerungsfaktor\*. Es ist ferner zu beachten, dass die Ausbildung eines Komplexes durch eine benachbarte *cis*-ständige CH<sub>3</sub>O-Gruppe erschwert wird<sup>33</sup>. Eine zum Boratkomplex *trans*-ständige CH<sub>3</sub>O-Gruppe ist ohne Einfluss. Der Vergleich der Zahlen zeigt diesen Effekt deutlich. So besitzt z.B. Acofriose ein gleich günstig gelegenes Paar von HO-Gruppen wie 3-O-Methyl-altromethylose, bei der Acofriose ist aber die Komplexbildung durch die *cis*-ständige CH<sub>3</sub>O-Gruppe gehemmt. Ähnlich ist der Unterschied zwischen Acovenose und 3-O-Methyl-idomethylose erklärbar, die beide je zwei Paare von günstig gelagerten HO-Gruppen besitzen. Bei der Acovenose stört die CH<sub>3</sub>O-Gruppe die Ausbildung beider Komplexe. Der im Vergleich zu Thevetose und Digitalose sehr grosse Verzögerungsfaktor von 3-O-Methyl-altromethylose lässt sich aber mit diesem Einfluss der CH<sub>3</sub>O-Gruppe allein nicht erklären. Alle drei Zucker können nämlich nur einen e-a-Komplex (an den C-Atomen 1 und 2) bilden, der in allen drei Fällen *trans*-ständig zur CH<sub>3</sub>O-Gruppe angeordnet ist. Hingegen haben wir bisher den Einfluss des in Lösung vorhandenen Gleichgewichtes zwischen den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Formen gar nicht berücksichtigt. Bei der Thevetose und bei der Digitalose ist jeweils nur das  $\alpha$ -Isomere, dessen HO-Gruppe am ersten C-Atom in der C-1 Form der D-Reihe axial gelegen ist, zur Komplexbildung befähigt. Auf Grund der Drehung enthalten Thevetose *ca.* 35% und Digitalose *ca.* 30% der zur Komplexbildung günstigen  $\alpha$ -Form. Bei der 3-O-Methyl-altromethylose ist für die Komplexbildung nur die  $\beta$ -Form geeignet. Benützt man hier wieder den Vergleich der Drehung des Gleichgewichtsgemisches und der reinen Methyl-glykoside\*\* als Mass für den Gehalt an  $\beta$ -Form, so kommt man auf *ca.* 53%. Wir zweifeln aber, ob diese Art der Rechnung hier zulässig ist. D-Thevetose und D-Digitalose sollten in Analogie zu D-Glucose und D-Galactose nach REEVES<sup>8</sup> in Lösung praktisch ausschliesslich in der C-1 Form vorliegen. Bei 3-O-Methyl-D-altromethylose dürfte in Lösung jedoch ein Gleichgewicht zwischen C-1 und 1-C Form vorhanden sein, die stark verschiedene Drehung besitzen müssen, so dass man aus der Drehung nicht mehr so gut auf den Gehalt an  $\alpha$ - und  $\beta$ -Form zurückschliessen kann. Es ist aber aus dem räumlichen Bau leicht ersichtlich, dass für die C-1 Form das  $\beta$ -Isomere stark begünstigt sein muss. Das axiale  $\alpha$ -Isomere ist nämlich durch die ebenfalls axiale Methoxylgruppe in 3-Stellung besonders stark benachteiligt. Hier dürfte die Methoxylgruppe somit die bevorzugte Ausbildung der für die Komplexbildung günstigsten  $\beta$ -Form erzwingen.

Dieselben Verhältnisse finden wir auch bei der 3-O-Methyl-idomethylose, nur dass hier ausserdem noch die Möglichkeit zur Ausbildung eines a-a-Komplexes gegeben ist. Bei der Thevetose und bei der Digitalose liegt die CH<sub>3</sub>O-Gruppe äquatorial und sollte demnach keinen merklichen Einfluss auf das  $\alpha$ ,  $\beta$ -Gleichgewicht haben. Bei den zwei noch unbekanntenen Isomeren, der 3-O-Methyl-allomethylose sowie der

\* Bei der Altromethylose ist er noch grösser, vielleicht weil die Komplexbildung bei der Acovenose *in beiden Fällen* durch die CH<sub>3</sub>O-Gruppe gehemmt ist.

\*\* Zur Abschätzung dienten die Werte der entsprechenden Hexosen.

3-O-Methyl-gulomethylose, die beide in der C-1 Form der D-Reihe axiale CH<sub>3</sub>O-Gruppen tragen, sollte die Ausbildung der für die Komplexbildung günstigeren  $\alpha$ -Isomeren stark erschwert sein. Dabei wäre auch wieder zu berücksichtigen, dass 3-O-Methyl-gulomethylose in Lösung teilweise in 1-C Form vorliegen dürfte.

Die Papierchromatogramme mit Boratpuffer deuten darauf hin, dass die D-Formen aller 6 hier untersuchten Zucker im Boratsystem vorwiegend in der C-1 Form vorliegen, wobei sogar die sonst instabilen C-1 Formen der 3-O-Methyl-altromethylose und besonders der 3-O-Methyl-idomethylose (Formel I) durch die Komplexbildung weitgehend stabilisiert werden. Bei der Idomethylose sollte in der 1-C Form der D-Reihe (Formel II) wegen der axialen Methylgruppe an C<sub>5</sub> die für die Komplexbildung benötigte  $\beta$ -Form sehr stark behindert sein, so dass für die 1-C Form der D-Reihe nur ein sehr geringer Verzögerungsfaktor zu erwarten gewesen wäre\*.

#### *Besprechung der Hexamethylosen*

In Tabelle IV sind die Verzögerungsfaktoren sowie sämtliche Möglichkeiten der Komplexbildung für e-a- und a-a-Komplexe für die C-1 und die 1-C Formen der D-Reihe zusammengestellt.

Wenn die Komplexbildung an einem Paar von HO-Gruppen die weitere Komplexbildung an einem zweiten Paar nicht hindern oder verunmöglichen würde, sollte derjenige Zucker den grössten Verzögerungsfaktor aufweisen, der die meisten Paare geeigneter HO-Gruppen enthält. Dies ist offensichtlich nicht der Fall, und der Grund ist auch leicht ersichtlich. Wenn z.B. bei der C-1 Form der D-Allomethylose, welche total 4 geeignete Paare von HO-Gruppen enthält, an 2-3 Komplexbildung erfolgt, so kann an 1 $\alpha$ -2, 3-4 und 1 $\beta$ -3 keine weitere Komplexbildung stattfinden. Bei Fucose, die nur zwei geeignete Paare enthält, können prinzipiell beide gleichzeitig eine Komplexbildung eingehen. Komplexe mit zwei Boratmolekülen kann auch Altromethylose bilden, die insgesamt nur 3 geeignete Paare von HO-Gruppen enthält. Dies macht es verständlich, dass Fucose und Altromethylose einen grösseren Verzögerungsfaktor zeigen als Allomethylose.

Aus den Werten der Tabelle IV lässt sich weiter ableiten, dass Komplexe mit zwei Boratgruppen pro Zucker nur dann möglich sind, wenn sie sich gegenseitig nicht behindern. Dies setzt voraus, dass sie *trans*-ständig sind. Der merklich grössere Verzögerungsfaktor von Fucose, die nur zwei Paare geeigneter HO-Gruppen enthält im Vergleich zu Rhamnose (2 Paare), Allomethylose (4 Paare!) und Gulomethylose (3 Paare) wird so leicht erklärbar. Wir glauben daher auch, dass der besonders grosse Verzögerungsfaktor bei der Idomethylose durch die Bildung des Komplexes mit zwei *trans*-ständigen Boratgruppen an 1 $\alpha$ -3 und 2-4 der C-1 Form der D-Reihe (Formel I) bedingt ist und dass diese sonst un stabile Form durch diese Komplexbildung stabilisiert wird. Für die 1-C Form der D-Reihe wäre, wie aus Tabelle IV ersichtlich, nur ein 1 $\beta$ -2-Komplex und damit ein viel kleinerer Verzögerungsfaktor zu erwarten.

Die beobachteten Verzögerungsfaktoren lassen vermuten, dass auch von den

\* Die verschiedenen, von REEVES UND BLOUIN<sup>28</sup> abgeleiteten Wannens-Formen wurden vernachlässigt.

anderen drei Zuckern, deren C-1 Form der D-Reihe in Wasser teilweise mit der 1-C Form in Gleichgewicht steht (Altromethylose, Gulomethylose und Talomethylose in ungefähr abnehmender Reihenfolge), die Altromethylose und Talomethylose in Boratlösung vorwiegend auch in der C-1 Form (als Komplex stabilisiert) vorliegen. Für die Gulomethylose ist dies dagegen unsicher.

	$\begin{array}{c} \text{CHO} \\   \\ \text{---} \\   \\ \text{---OR} \\   \\ \text{---} \\   \\ \text{---} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CHO} \\   \\ \text{---} \\   \\ \text{---OR} \\   \\ \text{---} \\   \\ \text{---} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CHO} \\   \\ \text{---} \\   \\ \text{RO---} \\   \\ \text{---} \\   \\ \text{---} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$
	Allo	Altro	Gluco
Konfig.			
Freie Hexamethylose (R = H)	I. Allomethylose F. 146° [α] <sub>D</sub> = - 1.0° <sup>18</sup>	II. Altromethylose amorph [α] <sub>D</sub> = + 16° <sup>20</sup>	III. Glucomethylose F. 139-140° [α] <sub>D</sub> = + 29.7° <sup>18</sup>
3-O-Methylderivat (R = CH <sub>3</sub> )	IX. Unbekannt	X. 3-O-Methyl- altromethylose F. 108-113° [α] <sub>D</sub> = + 22.3° <sup>12</sup>	XI. Thevetose F. 110-120° [α] <sub>D</sub> = + 35.5° <sup>30</sup>

	$\begin{array}{c} \text{CHO} \\   \\ \text{---} \\   \\ \text{---OR} \\   \\ \text{---} \\   \\ \text{---} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CHO} \\   \\ \text{---} \\   \\ \text{RO---} \\   \\ \text{---} \\   \\ \text{---} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CHO} \\   \\ \text{---} \\   \\ \text{RO---} \\   \\ \text{---} \\   \\ \text{---} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$
	Gulo	Manno	Galacto
Konfig.			
Freie Hexamethylose (R = H)	IV. Gulomethylose F. 124-125° [α] <sub>D</sub> = - 35.7° <sup>10</sup>	V. Rhamnose* F. 122-126° [α] <sub>D</sub> = - 8.9°	VI. Fucose F. 140-146° [α] <sub>D</sub> = + 76.3°
3-O-Methylderivat (R = CH <sub>3</sub> )	XII. Unbekannt	XIII. Acofricose* F. 111-114° [α] <sub>D</sub> = - 39.1° <sup>10</sup>	XIV. Digitalose F. 119° [α] <sub>D</sub> = + 106° <sup>9</sup>

	$\begin{array}{c} \text{CHO} \\   \\ \text{---} \\   \\ \text{RO---} \\   \\ \text{---} \\   \\ \text{---} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CHO} \\   \\ \text{---} \\   \\ \text{---} \\   \\ \text{---} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$
	Talo	Ido
Konfig.		
Freie Hexamethylose (R = H)	VII. Talomethylose* F. 116-118° [α] <sub>D</sub> = + 18.9° <sup>23</sup>	VIII. Idomethylose* F. 95-98° [α] <sub>D</sub> = + 26° <sup>21</sup>
3-O-Methylderivat (R = CH <sub>3</sub> )	XV. Acovenose* amorph <sup>13</sup>	XVI. 3-O-Methyl- idomethylose amorph [α] <sub>D</sub> = + 22.1° <sup>14</sup>

Formeln der hier untersuchten Zucker mit Angaben der Smp. Die angegebenen optischen Drehungen geben die spez. Enddrehung in Wasser. Von den mit \* bezeichneten Zuckern ist nur die L-Form bekannt. Wir geben für die D-Form denselben Smp. und die umgekehrte Drehung.

## EXPERIMENTELLER TEIL

Die Chromatogramme wurden zwischen 23° und 25° Raumtemperatur absteigend ausgeführt.

Für das System VII (*n*-Butanol–Methyläthylketon (1:1)/Borat-Pufferlösung) wurde Whatman No. 7 Papier verwendet. Alle übrigen Chromatogramme wurden auf Papier No. 1 durchgeführt.

Zur Sättigung der mobilen Phase wurde diese während 3 Std. mit gleichem Volumen stationärer Phase geschüttelt und nach der Trennung der Schichten die mobile Phase abgetrennt.

Wenn Wasser als stationäre Phase diene, wurden die Papiere durch eine Mischung von Wasser–Aceton (1:2) gezogen und dann zwischen Filtrierpapier ausgepresst. Hierauf wurden die Substanzproben aufgetragen, und dann das Papier so lange an der Luft getrocknet, bis die Gewichtszunahme gegenüber dem trockenen, unbehandelten Papier 50% betrug. Im Falle von Pufferlösung als stationärer Phase wurde das Papier durch die Lösung gezogen, zwischen Filterpapier abgepresst und nach Auftragen der Substanzprobe so lange an der Luft trocknen gelassen, bis auch hier die Gewichtszunahme 50% betrug. Nach dem Einhängen der Papiere in den Trog wurde unmittelbar mit dem Entwickeln begonnen.

Nach Abschluss der Chromatographie wurden die Papiere so lange bei Raumtemperatur einem schwachen Luftstrom ausgesetzt, bis sie sich trocken anfühlten (*ca.* 20 Min.). Zum Lokalisieren der Zucker diene entweder Blautetrazolium<sup>40</sup> (durch die Reagenslösung gezogen) oder Anilinphtalat nach PARTRIDGE<sup>41</sup> (besprüht). Um das Zerreißen der mit dem Reagens imprägnierten Papiere zu vermeiden, wurde das Papier auf dünne, entsprechend dimensionierte Glasplatten gelegt und durch schwache Erwärmen derselben die Farbreaktionen erzeugt.

Herstellung der Pufferlösung: 3.814 g Borax ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) und 0.618 g Borsäure wurden in je 100 ml Wasser gelöst; für die Bereitung der stationären Phase wurden gleiche Volumteile der beiden Lösungen vermischt; pH (potentiometrisch bestimmt): 8.94.

Herstellung der Phosphatlösung: 1.166 g 84%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (= 0.685 ml) wurden mit 20.8 ml 0.3 N NaOH versetzt; pH (potentiometrisch bestimmt): 8.8.

## DANK

Der eine von uns (M.T.K.) dankt dem Research Grant Committee Eli Lilly and Company, Indianapolis, für einen Beitrag an die Kosten der Arbeit.

## ZUSAMMENFASSUNG

Es werden Methoden zur papierchromatographischen Unterscheidung der Hexamethylosen sowie deren 3-O-Methyl-derivate beschrieben. Die  $R_F$ -Werte, die erhalten werden, wenn eine Natriumboratlösung als stationäre Phase diene, wurden mit den stereochemischen Faktoren der Komplexbildung in Beziehung gebracht.

## SUMMARY

Methods are described for the paper-chromatographic separation of hexamethyloses and of their 3-O-methyl derivatives. The  $R_F$  values obtained when a sodium borate solution was used as stationary phase were correlated with the stereochemical factors involved in complex formation.

## LITERATUR

- <sup>1</sup> E. L. HIRST UND J. K. N. JONES, *Discussions Faraday Soc.*, 7 (1949) 268.
- <sup>2</sup> F. A. ISHERWOOD UND M. A. JERMYN, *Biochem. J.*, 48 (1951) 515.
- <sup>3</sup> J. A. MOORE, CH. TAMM UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 37 (1954) 755.
- <sup>4</sup> W. NAGATA, CH. TAMM UND T. REICHSTEIN, *Festschrift Arthur Stoll*, Verlag Birkhäuser, Basel, 1957, S. 715.
- <sup>5</sup> F. KAISER, *Chem. Ber.*, 88 (1955) 556.
- <sup>6</sup> M. A. JERMYN UND F. A. ISHERWOOD, *Biochem. J.*, 44 (1949) 402; F. H. CARPENTER UND G. A. HESS, *J. Am. Chem. Soc.*, 78 (1956) 3351.
- <sup>7</sup> O. RENKONEN UND O. SCHINDLER, *Helv. Chim. Acta*, 39 (1956) 1490.
- <sup>8</sup> R. E. REEVES, *J. Am. Chem. Soc.*, 71 (1949) 1737; 72 (1950) 1499; *Advances in Carbohydrate Chem.*, 6 (1951) 107.
- <sup>9</sup> J. D. LAMB UND S. SMITH, *J. Chem. Soc.*, (1936) 442.
- <sup>10</sup> H. MUHR, A. HUNGER UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 37 (1954) 403.
- <sup>11</sup> F. BLINDENBACHER UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 31 (1948) 1669.
- <sup>12</sup> C. A. GROB UND D. A. PRINS, *Helv. Chim. Acta*, 28 (1945) 840.
- <sup>13</sup> J. V. EUW UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 33 (1950) 485.
- <sup>14</sup> R. FISCHER, H. R. BOLLIGER UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 37 (1954) 6.
- <sup>15</sup> A. WINDAUS UND G. SCHWARTE, *Nachr. Ges. Wiss. Göttingen, Math.-physik. Kl.*, (1926) I.
- <sup>16</sup> F. MICHEEL, *Ber.*, 63 (1930) 347.
- <sup>17</sup> P. A. LEVENE UND J. COMPTON, *J. Biol. Chem.*, 116 (1936) 169.
- <sup>18</sup> E. FISCHER UND K. ZACH, *Ber.*, 45 (1912) 3761.
- <sup>19</sup> P. A. LEVENE UND J. COMPTON, *J. Biol. Chem.*, 111 (1935) 335.
- <sup>20</sup> M. GUT UND D. A. PRINS, *Helv. Chim. Acta*, 29 (1946) 1555.
- <sup>21</sup> A. S. MEYER UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 29 (1946) 139.
- <sup>22</sup> J. SCHMUTZ, *Helv. Chim. Acta*, 31 (1948) 1719.
- <sup>23</sup> H. JÄGER, A. RAMEL UND O. SCHINDLER, *Helv. Chim. Acta*, 40 (1957) 1310.
- <sup>24</sup> A. J. P. MARTIN, *Biochem. Soc. Symposia (Cambridge, Engl.)*, No. 3 (1949) 4.
- <sup>25</sup> E. C. BATE-SMITH UND R. G. WESTALL, *Biochim. Biophys. Acta*, 4 (1950) 427.
- <sup>26</sup> R. KUHN, W. BISTER UND E. FISCHER, *Ann.*, 617 (1958) 109.
- <sup>27</sup> K. S. PITZER UND C. W. BECKETT, *J. Am. Chem. Soc.*, 69 (1947) 977.
- <sup>28</sup> J. BÖESEKEN, *Advances in Carbohydrate Chem.*, 4 (1947) 189.
- <sup>29</sup> A. B. FOSTER, *Advances in Carbohydrate Chem.*, 12 (1957) 81.
- <sup>30</sup> R. PASTERNAK, *Helv. Chim. Acta*, 30 (1947) 1984.
- <sup>31</sup> S. J. ANGYAL UND D. J. MCHUGH, *Chem. & Ind. (London)*, (1956) 1147.
- <sup>32</sup> A. WEISSBACH, *J. Org. Chem.*, 23 (1958) 329.
- <sup>33</sup> A. B. FOSTER, *J. Chem. Soc.*, (1957) 4214.
- <sup>34</sup> A. B. FOSTER, *J. Chem. Soc.*, (1951) 982.
- <sup>35</sup> S. A. BARKER, E. J. BURNE, A. B. FOSTER UND R. M. PINKARD, *Chem. & Ind. (London)*, (1959) 226.
- <sup>36</sup> W. KLYNE, *Progr. in Stereochem.*, 1 (1944) 40.
- <sup>37</sup> C. J. ANGYAL UND J. A. MILLS, *Revs. Pure and Appl. Chem. (Australia)*, 2 (1952) 185.
- <sup>38</sup> R. E. REEVES UND F. A. BLOUIN, *J. Am. Chem. Soc.*, 79 (1957) 2261.
- <sup>39</sup> E. VISCHER UND T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta*, 27 (1944) 1332.
- <sup>40</sup> W. J. MADER UND R. R. BUCK, *Anal. Chem.*, 24 (1952) 666.
- <sup>41</sup> S. M. PARTRIDGE, *Nature*, 164 (1949) 443.