

Zur spezifischen Basenwirkung bei der Epimerisation der Zucker.

(Über Zuckerendirole.)

Von

F. Petuely und U. Künßberg.

Aus dem Medizinisch-chemischen Institut und *Pregl*-Laboratorium
der Universität Graz.

(Eingelangt am 29. Okt. 1952. Vorgelegt in der Sitzung am 15. Jan. 1953.)

Es wird gezeigt, daß die theoretischen Erörterungen *A. Kusins* über die spezifische Wirkung von Alkalien auf Monosaccharide auf unrichtigen Grundlagen basieren und nicht den neuen Anschauungen entsprechen. Die teilweise Wiederholung seiner Versuche ergibt, daß die vermeintlichen Enole *Kusins* in Wirklichkeit echte Reduktone vorstellen.

Wenn man auf Zucker wäßrige Alkalilösungen verschiedener Konzentrationen bei Zimmer- und auch bei höheren Temperaturen einwirken läßt, so findet unter anderem eine Umwandlung der Zucker in ihre sogenannten Epimeren statt.

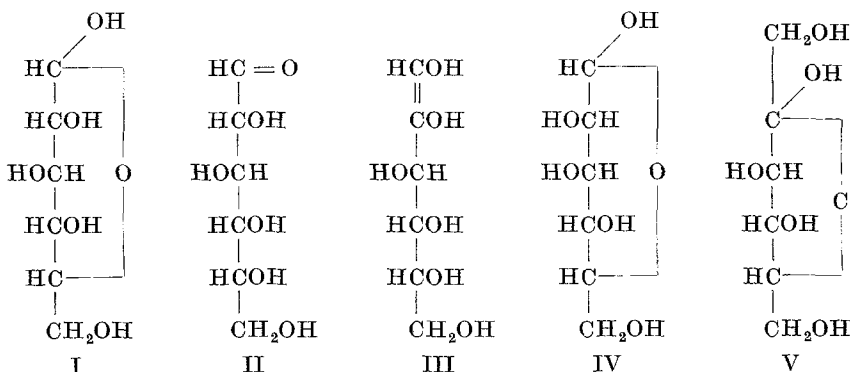
Man stellt sich diese Umwandlung so vor, daß aus den in Halbacetalform (I) vorliegenden Zuckern erst die Carbonylform (II) entsteht und diese dann durch Enolisierung in das tautomere Endiol übergeht (III). Dieses Endiol ist aber nicht nur mit dem ursprünglichen Zucker (I), sondern auch mit den sogenannten epimeren Formen über die offenkettige Form im Gleichgewicht (IV und V).

Die Einstellung des Gleichgewichtes hängt von der Art der Base bzw. ihrer Stärke ab. Bemerkenswert ist, daß es sich verhältnismäßig langsam einstellt, obwohl die Öffnung des Acetalringes, wie auch die Enolisierung relativ rasch verlaufende Reaktionen sein sollen. Dieser Widerspruch soll in einer späteren Arbeit untersucht werden.

Die genannte Enolisierung ist nach der herrschenden Ansicht eine durch OH-Ionen katalysierte Reaktion, wobei das zugehörige Kation keine Rolle spielt. *Lobry de Bruyn* und *van Eckenstein*¹ zeigten bereits,

¹ Rec. Trav. chim. Pays-Bas 14, 203 (1895); 16, 256 (1897).

daß sich das Gleichgewicht zwischen Glukose und ihren Epimeren unabhängig von der Natur der Base einstellt. Weiters soll auch die Bildung anderer Produkte aus Zucker unabhängig von der Natur der Base sein (*Nef*², *Wolfrom* und *Lewis*³).



Nun findet sich aber in den Lehrbüchern der Zuckerchemie, wie z. B. bei *Pigman* und *Goepf*⁴ die Angabe, daß verschiedene Alkalien auf Monosaccharide verschiedene Wirkung hätten. Als Beispiel werden Natriumhydroxyd und Calciumhydroxyd aufgezeigt und eine Arbeit von *A. Kusun*⁵ als Beleg angeführt, die den zitierten Unterschied aufzeigen soll.

Kusun nimmt einen Unterschied zwischen den genannten Basen nur bei Temperaturen zwischen 25° und 30° C an. Bei 60° C soll keine differente Wirkung auftreten. Als Beweis für eine verschiedene Wirkung führt der Autor den vermeintlichen Nachweis bzw. die Bestimmung von Zuckerendiolen an. Seine Erklärung der verschiedenen Einflüsse von $\text{Ca}(\text{OH})_2$ und NaOH seien hier der Verständlichkeit halber kurz angeführt: Die gebildeten Enole sollen verschiedene Strukturen aufweisen, wobei die mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ gebildete Gruppierung die beständigere sei. In Analogie zu den cyclischen Reduktonen (*Ascorbinsäure*) glaubt *Kusun* für das Enol einen noch intakten Pyranosering annehmen zu müssen (VI). Das zuerst entstehende Saccharat wäre nämlich weniger dissoziiert, wodurch eine Wiederabspaltung von $\text{Ca}(\text{OH})_2$ wahrscheinlich sei. Hierbei würde das Enol VI entstehen, das beständig genug sei, um beim Ansäuern nachweisbar zu sein. Bei der Wiederanlagerung von Wasser würde das äußerste C-Atom als das positiv geladene (warum?) vorwiegend Hydroxyl an sich ziehen, was die Bildung von Glukose oder Mannose zur Folge habe. Da eine Ringsprengung nicht erfolge, würde keine Fruktose entstehen.

Bei der Einwirkung von NaOH hingegen könne man eine Ringhydrolyse und die Bildung eines vollständig dissoziierten Saccharates annehmen.

² Amer. Chem. 357, 214 (1907); 403, 204 (1914).

³ J. Amer. Chem. Soc. 50, 837 (1928).

⁴ Chemistry of Carbohydrates, New York (1948).

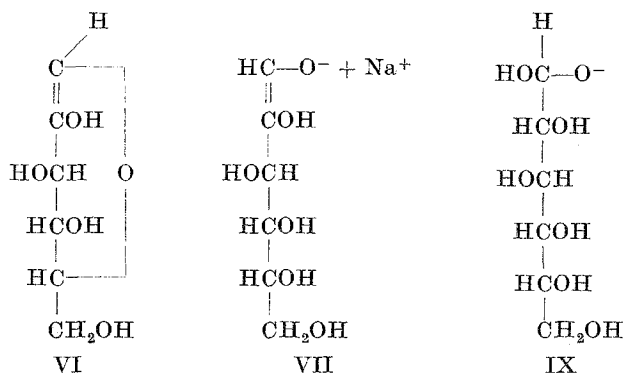
⁵ Enolisierung von Zuckern unter der Einwirkung verschiedener Basen. Ber. dtsh. chem. Ges. 69, 1041 (1936).

Das Ergebnis sei ein acyclisches Enol in Form eines negativ geladenen Ions (VII). Diese Form sei beim Ansäuern unbeständig und würde sofort die cyclische Zuckerform geben, worauf das Verschwinden von reduzierenden Eigenschaften und der FeCl_3 -Reaktion zurückzuführen sein soll. Da das äußerste C-Atom negativ geladen sei, würde nunmehr bei der Wiederaanlagerung von Wasser der Wasserstoff an das C_1 -Atom gehen und das OH an C_2 , wodurch Fruktose entstünde. Auch für die Einwirkung von $\text{Ca}(\text{OH})_2$ auf Fruktose gibt der Verfasser die gleiche Erklärung wie bei der Glukose, nämlich die Umwandlung über ein cyclisches Enol.

Die Versuche, die *Kusins* als Beweis für seine theoretischen Erörterungen anführt, sind folgende:

1. Beeinflussung von Formaldehyd Dismutationen durch Zucker.
2. Auftreten reduzierender Gruppen.
3. Bestimmung der Epimerisation.

Bevor wir die Versuche diskutieren, die *Kusins* als Beweis für seine Hypothese anführt, wollen wir rein theoretisch seine Ansichten beleuchten.



Nach den Angaben *Kusins* soll also eine Enolisierung des Glukosemoleküls stattfinden, ohne daß der Pyranosering gesprengt wird, d. h. daß eigentlich nicht eine Enolisierung, sondern eine Wasserabspaltung stattfindet. Der Zucker besitzt die Summenformel $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (I), das angebliche Enol $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$ (VI). Die Richtigkeit der *Kusins*chen Hypothese vorausgesetzt, würde es sich somit nicht um eine Enolisierung, sondern um eine Dehydratation handeln. Das entstandene Produkt, der innere Äther des Enols der Glukose, würde also ein Oxyglucal darstellen. Es bestehen bisher in der Literatur keine Anhaltspunkte, daß ein solcher Vorgang oder auch nur ein ähnlicher möglich ist. Jedenfalls sind Wasserabspaltungen an ähnlichen Verbindungen unter der Einwirkung von $\text{Ca}(\text{OH})_2$ nicht beschrieben. Das vermeintliche Enol ist nach Ansicht von *Kusins* im sauren Milieu relativ beständig und geht langsam in den entsprechenden Zucker über. Dazu ist zu bemerken, daß bisher Oxyglycale

niemals in die Zucker übergeführt werden konnten, obwohl dies öfters versucht wurde, so daß dieser spontane Übergang undenkbar erscheint⁶. Außerdem schreibt der Autor dem „Enol“, also dem Oxyglucal, sogar im sauren Milieu „reduzierende Eigenschaften“ gegenüber *Tillmans'* Reagens zu. Dazu ist zu bemerken, daß diese Verbindung, in der eine OH-Gruppe des Endiols veräthert ist, nicht einmal in alkalischem, geschweige denn in saurem Milieu *Tillmans'* Reagens reduzieren kann (*Petuely* und *Künßberg*⁷). Auf weitere theoretische Erörterungen zu dieser Hypothese wollen wir nicht eingehen und nur noch erwähnen, daß der Verfasser angibt, 0,5 n $\text{Ca}(\text{OH})_2$ verwendet zu haben. Dies ist aber unmöglich, da $\text{Ca}(\text{OH})_2$ nur bis zu etwa 0,02 n in Wasser löslich ist.

Auch die Einwirkung von Natronlauge stellt sich *Kusin* unter Wasserabspaltung vor, wobei er eine Zwischenform annimmt (IX), die das Ion eines Hydrats der Carbonylform des Zuckers darstellt. Aus dieser hypothetischen Form IX soll unter dem Einfluß von Na^+ -Ionen Wasser abgespalten werden.

Mit dieser Hypothese gibt *Kusin* eine theoretische Erklärung der Enolisierung, die im Gegensatz zu allen herrschenden Ansichten nicht eine Tautomerie mit der Carbonylform des Zuckers vorsieht, sondern eine Hydratisierung und eine Dehydratisierung. Seine Deutung entspricht der alten Mutarotationstheorie über die Hydratform der Zucker. Er vertritt damit eine Richtung, die längst widerlegt ist.

Nach *Kusin* würde die Umwandlung des Enols in Zucker wiederum über eine Wasseranlagerung erfolgen (VI \rightarrow I und IV bzw. VII \rightarrow V). Eine solche Wasseranlagerung darf unter den gegebenen Reaktionsbedingungen als unmöglich betrachtet werden. Wasseranlagerungen an Doppelbindungen sind bekanntlich nur sehr schwer realisierbar.

Wir sehen, daß die theoretischen Erörterungen *Kusins* keineswegs überzeugen können und wollen nun versuchen, seine Versuche zu deuten.

In der Gruppe I seiner Versuche beschreibt *Kusin* die „katalytische Wirkung“ der Glukose bei der Dismutation von Formaldehyd. Der Vorgang ist viel zu schwierig zu übersehen, als daß daraus irgendwelche Schlüsse über die Natur der Enole bzw. Endiole der Glukose gezogen werden könnten.

Die Gruppe II soll das Auftreten reduzierender Gruppen unter der Einwirkung verschiedener Basen zeigen. Die reduzierenden Gruppen wurden mit Jod bzw. Dichlorphenolindophenol nach der Neutralisation bzw. Ansäuerung mit Salzsäure nachgewiesen. Ohne auf die Versuchsbedingungen näher eingehen zu wollen, sei hier nochmals aufgezeigt, daß es 0,5 n $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Lösungen nicht gibt, da $\text{Ca}(\text{OH})_2$ eine zu geringe Löslich-

⁶ *M. Bergmann* und *L. Zervas*, Ber. dtsch. chem. Ges. **64**, 1434 (1931).

⁷ Mh. Chem. **83**, 80 (1952).

keit besitzt. Der Vergleich zwischen verschiedenen Basen, wie z. B. NaOH und $\text{Ca}(\text{OH})_2$, in den Konzentrationen, wie *Kusin* sie verwendet, ist nicht zulässig, da die Lösungen ganz verschiedene OH^- -Konzentrationen aufwiesen, was erfahrungsgemäß einen wesentlichen Unterschied in der Wirkung bedingt. Die Titration mit Jod, die *Kusin* angeführt hat, ist viel zu wenig spezifisch, als daß man daraus schließen dürfte, daß Endiole vorlagen. Spezifisch wäre nur eine Reaktion mit *Tillmans'* Reagens im alkalischen Milieu gewesen, sie ist jedoch nicht geeignet, Endiole im sauren Medium zu erfassen (*Petuely und Künßberg*⁷). Daher hat der Autor bei Verbrauch von *Tillmans'* Reagens im sauren Medium echte Reduktone, d. h. bereits Disproportionierungsprodukte der Zucker, nicht aber Enole, bzw. Zuckerendiole erfaßt. *Kusin* hat seine Experimente a priori falsch ausgelegt. Sie dürfen daher nicht nur auf Grund der bereits erörterten unrichtigen Prämissen, sondern auch aus theoretischen Gründen nicht zur Stützung der vom Autor entwickelten Theorie Verwendung finden.

Um die etwas merkwürdigen Versuchsergebnisse der diskutierten Arbeit zu erklären, stellten wir folgende Experimente an:

1. Wir untersuchten Glukose und Fruktose unter Einwirkung von NaOH und $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ohne Schutzgas nach der Methode von *Kusin*.

Es wurde Glukose bzw. Fruktose in 0,25 m Lösung mit 0,25 n NaOH bei verschiedenen Temperaturen verschieden lange behandelt, dann mit Essigsäure neutralisiert und durch einen geringen Überschuß von Eisessig auf ein pH von etwa 4,5 gebracht. Diese Lösungen wurden mit *Tillmans'* Reagens bis zum Bestehenbleiben der Rotfärbung titriert. Wir erhielten hiebei ähnliche Ergebnisse wie *Kusin*, indem nur wenig oder gar keine im sauren Milieu reduzierende Körper erfaßbar waren. Erst bei Einwirkungsdauer von mehreren Stunden konnten wir geringe Reduktonmengen polarographisch nachweisen (*Petuely und Künßberg*⁷).

Bei Verwendung von gesättigter $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Lösung zeigte es sich, daß die Reduktonbildung etwas rascher auftrat und wir ebenfalls den *Kusinschen* Angaben entsprechende Werte mit *Tillmans'* Reagens erhielten. Auf die Wiedergabe wollen wir daher verzichten.

Wenn wir eine solche Lösung, die mit NaOH gewonnen worden war, nach dem Ansäuern stehen ließen, so zeigte sich eine rasche Abnahme der Reduktionskraft (Tabelle 1). Aber auch die etwas höheren Werte bei Behandlung mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ sanken unter diesen Umständen rasch ab (Tabelle 2). Wir haben für unsere Zwecke 18 Stdn. mit Laugen behandelte Lösungen verwendet, da bei diesen genügend reduzierende Substanz gebildet worden war, um ihre Abnahme verfolgen zu können. Die Menge des gebildeten Reduktions wurde in Prozenten der Ausgangssubstanz berechnet. Gleichlautende Ergebnisse erhielten wir bei der Behandlung der Fruktose mit NaOH und $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Wir verzichten daher auf ihre Wiedergabe.

Aus den Werten der Tabelle I sieht man, daß die Reduktionskraft gegen *Tillmans'* Reagens langsam abnimmt. Diese Abnahme ist durch die Oxidation der gebildeten Reduktone unter Einwirkung des Luftsauerstoffs zu erklären.

0,25 n NaOH und 0,25 m Glukose-lösung in einem offenen Kolben bei 30° C gehalten. Nach 18 Stdn. wird die Lösung abgekühlt, mit einem Überschuß von Essigsäure versetzt und mit gestellter *Tillmans'* Reagenslösung bis zum Bestehenbleiben einer Rotfärbung titriert. Reduktionen werden in Prozenten der Glukose, bezogen auf molare Ausbeute, angegeben.

Tabelle 1.

Titration nach dem Ansäuern	Ausbeute an Redukton in % der Glukose
Sofort.....	0,9
10 Min.....	0,77
20 „	0,7
30 „	0,65
50 „	0,6
60 „	0,55
120 „	0,50
6 Stdn.....	0,4

Gesättigte $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Lösung und 0,25 m Glukoselösung in einem offenen Kolben 18 Stdn. bei 30° C gehalten. Versuchsanordnung wie in Tabelle 1.

Tabelle 2.

Titration nach dem Ansäuern	Ausbeute an Redukton bezogen auf Glukose
Sofort.....	2,4
10 Min.....	1,8
20 „	1,6
30 „	1,5
50 „	1,45
60 „	1,4
120 „	1,0
6 Stdn.....	0,5

Aus den nebenstehenden Werten sieht man, daß die Reduktionskraft gegen *Tillmans'* Reagens langsam abnimmt. Sie ist jedoch zu Beginn höher als bei dem NaOH-Versuch. *Kusin* hat für NaOH überhaupt die Bildung von vermeintlichen „Enolen“ negiert.

2. Wir untersuchten Glukose und Fruktose unter Einwirkung von NaOH und $\text{Ca}(\text{OH})_2$, wobei Stickstoff als Schutzgas Verwendung fand.

Es wurde wiederum Glukose bzw. Fruktose in 0,25 m Lösung bei verschiedenen Temperaturen verschieden lang behandelt. Die Alkalikonzentrationen waren die gleichen wie beim Versuch 1. Alle Lösungen wurden vor dem Versuch ausgekocht und mit Glühlampenstickstoff, der noch über pyrophorem Kupfer⁸ von den letzten Sauerstoffspuren befreit wurde, gesättigt und dann durch eine 1 cm hohe Schicht von Paraffinum liquidum von der Luft abgeschlossen. Dieser Verschluß schafft zwar keinen vollkommenen Schutz vor dem Luftsauerstoff, gestattet aber doch relativ sauerstofffrei zu arbeiten.

Die Ergebnisse waren überraschend. Es zeigte sich nämlich, daß Natronlauge und Calciumhydroxyd zwar anfangs verschiedene Mengen Redukton liefern, nach 72 Stdn. jedoch annähernd gleiche Werte geben. Beim längeren Stehen sinken diese wieder ab. Unerwartet war auch, daß die Fruktose fast gleiche Mengen an Reduktonen lieferte wie die Glukose (Tabellen 3, 4 und 5). Wir haben davon abgesehen, in den Tabellen die Werte bei kurzen Zeiten aufzuzeigen, um nicht unnötige Längen zu schaffen.

⁸ F. R. Meyer und G. Ronge, Angew. Chem. 52, 637 (1939).

Tabelle 3.

Titration nach Stehen bei 30° im Alkali	Ausbeute an Redukton %
24 Std.	2,1
48 „	4,2
72 „	5,7
90 „	6,2
200 „	6,8
240 „	5,6

ker. Die Titrationsen erfolgten knapp nach dem Ansäuern.

Versuchsordnung wie bei Tabelle 1 (NaOH), nur daß, wie beschrieben, die Lösungen sauerstofffrei gemacht wurden und mit Paraffinum liquidum überschieftet wurden. Titriert wurde wieder mit gestellten *Tillmans'* Reagenslösungen nach dem Neutralisieren bzw. Ansäuern mit Essigsäure. Ausbeuten an Redukton in Prozent, bezogen auf den eingesetzten Zuk-

Tabelle 4.

Versuchsordnung wie bei Tabelle 3, aber an Stelle von NaOH gesättigte $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Lösung.

Titration nach Stehen bei 30° im Alkali	Ausbeute an Redukton %
24 Std.	6,2
48 „	7,1
72 „	7,8
90 „	6,4
200 „	4,9
240 „	4,7
504 „	3,6

Tabelle 5.

Versuchsordnung wie bei Tabelle 3, aber an Stelle von Glukose 0,25 m Fruktoselösung mit 0,25 n NaOH.

Titration nach Stehen bei 30° im Alkali	Ausbeute an Redukton %
24 Std.	2,9
48 „	4,9
72 „	5,8
90 „	6,9
200 „	7,8
240 „	8,5
504 „	7,0

Wenn man eine der oben angeführten Lösungen von NaOH oder $\text{Ca}(\text{OH})_2$ mit Glukose oder Fruktose ansäuert und unter Paraffinum liquidum stehen läßt, so nimmt die Reduktionskraft gegenüber *Tillmans'* Reagens wesentlich langsamer ab als bei Versuch Tabelle 1 (Tabelle 6). Der Grund ist darin zu suchen, daß der Luftsauerstoff nur langsam in die Lösung eindringen und die vorhandenen Reduktone oxydieren kann. Beim Ansäuern bringt man relativ viel Sauerstoff in die Lösung, wodurch die Abnahme zu Beginn des Versuches zu erklären ist. Wenn dieser Sauerstoff verbraucht ist, sinkt die Oxydationsgeschwindigkeit ab. Die Tabelle 7 zeigt, daß sich unter diesen Versuchsbedingungen NaOH und $\text{Ca}(\text{OH})_2$ gleich verhalten.

Die Versuche zeigen also klar, daß die vermeintlichen Zuckerenole von *Kusin*, die sich nach dem Ansäuern langsam wieder in die Ausgangszucker bzw. die epimeren Zucker umwandeln sollen, gar keine *Enole* (richtiger Endiole) sind. *Kusin* erfaßte vielmehr Reduktone, die unter seinen Versuchsbedingungen einer Autoxydation unterlagen und so eine „Rückumlagerung“ vortäuschten. Diese Reduktone konnten bei allen unseren Ansätzen auch durch die polarographisch-anodische Oxydationsstufe im schwach sauren Milieu erfaßt werden (*Petuely und Künßberg*, l. c.).

Somit erscheint die Hypothese *Kusins* über die spezifische Wirkung von Alkalien auf Monosaccharide nicht nur theoretisch, sondern auch

Versuchsordnung wie bei Tabelle 1, nur daß die Lösungen vor dem Versuch wie bei den Versuchen in Tabelle 3 sauerstofffrei gemacht wurden und dann mit Paraffinum liquidum geschützt wurden. Die Dauer der Alkalieinwirkung (0,25 n NaOH auf 0,25 m Glukose) war 18 Stdn. Darauf wurde die Lösung auf Zimmertemp. abgekühlt, angesäuert und die Proben wie bei Tabelle 1 nach bestimmten Zeiten entnommen.

Tabelle 6.

Titration nach dem Ansäuern	Ausbeute an Redukton in % der Glukose
5 Min.	4,1
20 „	4,0
30 „	3,95
70 „	3,0
90 „	3,8
120 „	3,8
25 Stdn.	2,9
50 „	2,0
70 „	1,95
93 „	1,6

Versuchsordnung gleich wie bei Tabelle 6. An Stelle von NaOH gesättigte $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Lösung mit 0,25 m Glukose.

Tabelle 7.

Titration nach dem Ansäuern	Ausbeute an Redukton in % der Glukose
Sofort.	4,5
10 Min.	4,1
20 „	3,95
60 „	3,6
80 „	3,4
120 „	3,4
25 Stdn.	2,7
50 „	1,35
93 „	0,38

durch die Belegexperimente selbst widerlegt. Seine Versuche zum Nachweis der Bildung verschiedener Mengen der Epimerisationsprodukte können unter den erwähnten Voraussetzungen nicht als beweisend angesehen werden, da erstens nicht gleiche Alkali-

konzentrationen zur Anwendung kamen, zweitens die Isolierung der Fruktose nur als Ca-Salz erfolgte, was keineswegs quantitativ möglich ist. Dennoch möchten wir aber eine verschiedene Wirkung von NaOH und $\text{Ca}(\text{OH})_2$ nicht ganz negieren und verweisen auf die neueren Arbeiten von *Sowden* und *Schaffer*⁹ und *Topper* und *Stetten*¹⁰.

⁹ J. Amer. Chem. Soc. 74, 499, 505 (1952).

¹⁰ J. Biol. Chem. 189, 191 (1951).