

95. Friedrich Weygand und Rudolf Löwenfeld: Ein neuer Zuckerabbau*).

[Aus dem Chemischen Institut der Universität Heidelberg.]
(Eingegangen am 23. Mai 1950.)

Das Oxim eines Aldozuckers wird mit 4-Fluor-1,3-dinitro-benzol umgesetzt, wobei neben 2,4-Dinitro-phenol und Blausäure die nächst niedere Aldose entsteht.

In den letzten Jahren ist das 4-Fluor-1,3-dinitro-benzol (I) von F. Sanger¹⁾ zur Charakterisierung von Aminosäuren in Form von 2,4-Dinitro-phenyl-Derivaten und vor allem zur Festlegung der endständigen Aminosäuren in Peptiden und Proteinen mit großem Erfolg herangezogen worden. Es reagiert schon bei Zimmertemperatur im Gegensatz zum 4-Chlor-1,3-dinitro-benzol, das von E. Abderhalden²⁾ erst bei höheren Temperaturen mit Aminosäuren in Reaktion gebracht werden konnte. Auch mit Phenolen bildet I leicht Dinitrophenyläther.

Wir haben nun die Einwirkung von 4-Fluor-1,3-dinitro-benzol (I) auf Oxime von Aldozuckern studiert und dabei erwartungsgemäß einen neuen Zuckerabbau aufgefunden. Das abzubauende Oxim wird in natriumhydrogen-carbonathaltiger wässriger Lösung unter Einleiten von Kohlendioxyd mit I bei Temperaturen von 20–70° umgesetzt. I kann in fester Form oder in einem niederen Alkohol gelöst zugegeben werden. Es bilden sich 2,4-Dinitro-phenol, Blausäure und die nächstniedere Aldose, daneben entstehen gelbe bis rote Nebenprodukte, die noch nicht näher untersucht wurden. Die mit Kohlensäure abgeblasene Blausäure wird in Silbernitrat-Lösung aufgefangen und als Silbercyanid zur Wägung gebracht, wodurch der Abbau quantitativ verfolgt werden kann.

Beim Ablauf der Reaktion spielen katalytische, wahrscheinlich autokatalytische Einflüsse eine Rolle, denn es wirkt sich günstig auf die Ausbeute aus, wenn man einem Ansatz einige ccm entnimmt, diese 1–2 Min. zum Sieden erhitzt und die Probe alsdann dem Hauptansatz wieder zufügt.

Zunächst wurden d-Glucose- und d-Mannose-oxim zu d-Arabinose sowie d-Galaktose-oxim zu d-Lyxose abgebaut. In einer langen Reihe von Versuchen konnte die Ausbeute von anfänglich wenigen Prozenten bis auf 50–60% gesteigert werden. Die Ausbeuten wurden durch Wägung des Silbercyanids und im Falle der Arabinose durch Messung der Drehung ermittelt. Die tatsächlich isolierten Mengen an Zucker sind kleiner.

Der Abbau von Pentose-oximen zu Tetrosen geht ähnlich wie beim Wohl-schen Abbau³⁾ auch nach der neuen Abbaumethode nur mit kleinen Ausbeuten (nicht über 10%) vor sich, doch wurden noch keine systematischen Versuche zur Ausbeutesteigerung unternommen.

*) Vorgetragen auf der Chemiedozenten-Tagung in Bonn am 23. 4. 1950.

¹⁾ Biochem. Journ. 89, 507 [1945], 40, 261 [1946], 45, 563 [1949]; R. R. Porter u. F. Sanger, Biochem. Journ. 42, 287 [1948].

²⁾ E. Abderhalden u. P. Blumberg, Ztschr. physiol. Chem. 65, 318 [1910]; E. Abderhalden u. W. Stix, Ztschr. physiol. Chem. 129, 143 [1923].

³⁾ Vergl. V. Deulofeu, Advances in Carbohydrate Chemistry, Vol. 4, 119, New York [1949].

Auch die 6-Methylthio-*d*-glucose von A. L. Raymond⁴⁾, bei der die bisher bekannten Abbaumethoden offenbar versagt haben⁴⁾, ließ sich zur 5-Methylthio-*d*-arabinose abbauen⁵⁾.

Papierchromatographisch konnte in jedem Falle festgestellt werden, daß der Umsatz der Oxime vollständig war⁶⁾; jeweils war nur ein reduzierender Zucker entstanden, der den gleichen R_F-Wert zeigte wie der erwartete.

Die Isolierung der Zucker ist einfach. Das gebildete Dinitrophenol wird bei pH 3–4 abfiltriert, gefärbte Nebenprodukte werden durch Ausschütteln mit Butanol entfernt. Von den Salzen trennt man den Zucker nach dem Eindampfen bei pH 6.5 durch Ausziehen mit Alkohol, Eisessig oder Pyridin ab. Im Falle der *d*-Arabinose fiel der Zucker sogleich beim Abkühlen eines mit Eisessig heiß hergestellten Extraktes krystallin an. Auch die Abscheidung der Zucker als *p*-Nitranilin-*N*-glykoside⁷⁾ erwies sich als vorteilhaft.

Was den Reaktionsmechanismus anbelangt, so bilden sich nach Brady⁸⁾ aus den *anti*-Oximen der aromatischen Aldehyde mit Dinitrochlorbenzol leicht die *O*-Dinitro-phenyläther, die unter Abspaltung von Dinitrophenol in die den Aldehyden entsprechenden Nitrile übergehen. Diese Dinitrophenyläther zeigen somit eine große Ähnlichkeit des Verhaltens mit den acetylierten *anti*-Oximen (β -Formen), die nach A. Hantsch⁹⁾ in alkalischer Lösung ebenfalls leicht Nitrile bilden. Oximäther, die durch Umsatz der Natriumsalze der *syn*-Formen mit Dinitrochlorbenzol entstehen sollten, zerfallen jedoch unter Rückbildung des zugehörigen Aldehyds. Das dabei nicht gefäßte Dinitro-phenylhydroxylamin soll sich weiter zersetzen.

Für die Formulierung der entsprechenden Oximäther der Zucker komplizieren sich die Verhältnisse dadurch, daß allein sechs Formen in Frage kommen, in denen das Oxim reagieren könnte: *syn*- und *anti*-Form des offenkettigen Oxims, α - und β -Formen der pyranoiden und furanoiden Oximformen. Für Methylierungs- und Acetylierungsprodukte der Oxime sind vorwiegend Ringformen^{10,11)}, aber auch offenkettige Formen nachgewiesen worden. Als Zwischenprodukt des Wohlschen Abbaus von *d*-Glucose-oxim wurde das *al*-Hexaacetat von Wolfrom¹²⁾ wahrscheinlich gemacht. Im Falle der Dinitrophenyläther der Aldoseoxime ist aus Analogiegründen die Abspaltung von Dinitro-

⁴⁾ Journ. biol. Chem. **107**, 85 [1934].

⁵⁾ F. Weygand, O. Trauth u. R. Löwenfeld, s. die nachstehende Mitteil., B. **83**, 563 [1950].

⁶⁾ Zuckeroxime lassen sich auf Papierchromatogrammen durch Besprühen mit 4-Fluor-1,3-dinitro-benzol in natriumhydrogencarbonathaltiger wäßrig-methanolischer Lösung durch das Auftreten gelber Flecken beim Erwärmen leicht nachweisen; Zucker bleiben dabei unsichtbar.

⁷⁾ F. Weygand u. P. Kuhner, unveröffentlicht.

⁸⁾ O. L. Brady u. R. Truskowski, Journ. chem. Soc. London **125**, 1087 [1924]; O. L. Brady u. C. Klein, Journ. chem. Soc. London **127**, 844 [1925].

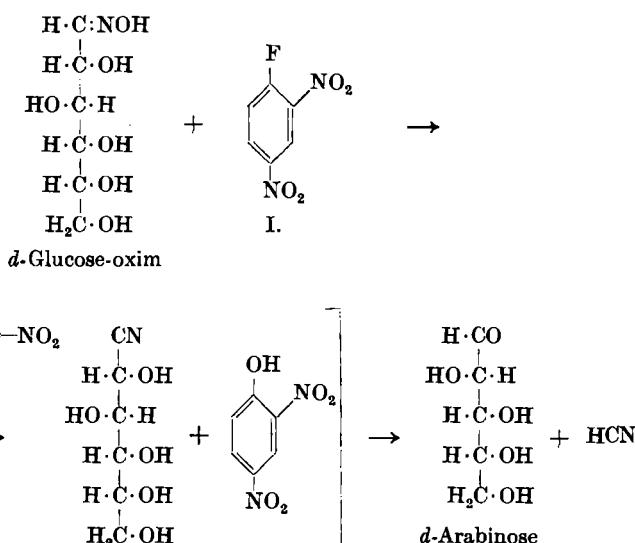
⁹⁾ B. **24**, 21 [1891].

¹⁰⁾ R. Behrend, A. **853**, 106 [1907].

¹¹⁾ J. C. Irvine, Journ. chem. Soc. London, **93**, 1429 [1908].

¹²⁾ M. L. Wolfrom u. A. Thomson, Journ. Amer. chem. Soc. **53**, 622 [1931].

phenol aus der *al*-Form anzunehmen. Demnach könnte der neue Zuckerabbau am Beispiel des Glucose-oxims folgendermaßen formuliert werden:



Es ist jedoch durchaus möglich, daß auch andere Formen des Oxims mit I unter Ätherbildung reagieren und daß sich dann ein Gleichgewicht mit der zum Nitril führenden *anti*-Form einstellt, wie dies bei den Benzoyl-oximäthern in der aromatischen Reihe von G. Vermillon und C. Hauser¹³⁾ nachgewiesen worden ist.

Für das als Zwischenprodukt angenommene Nitril ist bereits von A. Wohl¹⁴⁾ gezeigt worden, daß es unter bestimmten Bedingungen quantitativ durch Abspaltung von Blausäure in den nächst niederen Zucker übergeht. Daß dies auch unter den von uns angewandten Reaktionsbedingungen der Fall ist, konnte gezeigt werden. Inwieweit dieser letzte Schritt bei unserem Abbau in seiner Ausbeute von den Reaktionsbedingungen abhängig ist, wurde noch nicht ausreichend untersucht. Man kann jedoch jetzt schon sagen, daß andere Reaktionsstufen die Ausbeute entscheidend beeinflussen.

Die Bildung von zerfallenden Aldoseoxim-äthern unter den angegebenen Bedingungen ist nicht spezifisch für Fluor-dinitro-benzol. Auch andere Nitrobenzol-Derivate mit reaktionsfähigem Halogen, wie 4-Chlor-1,3-dinitro-benzol, Pikrylchlorid, 4,5-Dichlor-1,2-dinitro-benzol und 4,6-Difluor-1,3-dinitro-benzol reagieren im Prinzip wie I; die Ausbeuten sind aber geringer und in einigen Fällen müssen höhere Reaktionstemperaturen angewandt werden. Statt Natriumhydrogencarbonat wurden auch Lithiumhydrogencarbonat oder tertiäre Amine wie Triäthylamin als Basen benutzt; Vorteile ergaben sich dabei nicht.

Hrn. Dr. G. Erhart, Farbwerke Höchst, danken wir für die Überlassung von Fluorbenzol bestens.

¹³⁾ Journ. Amer. chem. Soc., **62**, 2939 [1940].

¹⁴⁾ A. 500, 281 [1932].

Beschreibung der Versuche.

Abbau von *d*-Glucose-oxim zu *d*-Arabinose.

1.5 g Natriumhydrogencarbonat werden in 70 ccm Wasser in einem Dreihalskolben unter Einleiten von Kohlendioxyd gelöst. 1 g *d*-Glucose-oxim wird zugegeben, die Lösung unter fortwährendem Einleiten von Kohlendioxyd auf 55–60° erwärmt und etwa 20 Min. bei dieser Temperatur gehalten. Dann wird mit einer Lösung von 1.8 g 4-Fluor-1,3-dinitro-benzol in 30 ccm Isopropanol versetzt, die ebenfalls 60° warm ist, wobei das Einleiten von Kohlendioxyd nicht unterbrochen wird. Die Lösung färbt sich gelb bis braun und soll nicht rot werden, was auf einen schädlichen Gehalt an freiem Hydroxylamin hinweisen würde.

Nach Zugabe des Fluor-dinitro-benzols werden mit einer Pipette sofort 2–3 ccm aus dem Ansatz entnommen und in einem Reagensglas kurz aufgekocht. Die Probe wird noch 1 Min. fast bei Siedetemperatur gehalten und dann wieder zur Hauptmenge gegeben. Nun wird der Reaktionskolben verschlossen und es wird weiter ein heftiger Kohlendioxydstrom eingeleitet. Die abströmende Kohlensäure wird durch eine Vorlage mit angesäuertem Silbernitrat-Lösung geleitet. Nach etwa 4 Min. beginnt die Ausscheidung von Silbercyanid¹⁵⁾. Unterläßt man es, eine kleine Probe des Ansatzes aufzukochen und wieder hinzuzufügen, so dauert es etwa 15 Min. bis zur beginnenden Cyanid-Ausscheidung, was sich auf die Ausbeute ungünstig auswirkt.

In 1.5 bis 2 Stdn. ist die Reaktion im wesentlichen beendet. Um sie vollständig zu machen, wird über Nacht weiter Kohlendioxyd eingeleitet und am nächsten Morgen nochmals kurz auf 60° erwärmt. Dabei wird noch eine geringe Menge Blausäure entwickelt. Die Silbernitrat-Vorlage wird zur Kontrolle gewechselt. Das gebildete Silbercyanid wird abfiltriert, 3 Stdn. bei 150° getrocknet und gewogen. Zur Kontrolle wird es kurz geglüht und nochmals als Silber gewogen. Aus diesen Gewichten ergibt sich eine Ausbeute an Arabinose von 420 mg = 61% d. Theorie.

Die nun braunrote Reaktionslösung enthält einen kleinen schmierigen Bodensatz, von dem abgegossen wird. Mit verd. Salzsäure wird vorsichtig auf p_H 3–4 angesäuert und vom Dinitrophenol abgesaugt. Das orange gefärbte Filtrat wird einmal mit Äther und dreimal mit je 70 ccm Butanol ausgeschüttelt. Die währ. Phase wird dabei hellgelb. Das Volumen der Lösung beträgt nun 85 ccm. Folgende Drehung wurde gemessen:

$$\alpha_D^{20} : -0.24^\circ \quad (l = 0.5 \text{ dm}; c = 0.24 \times 100/105 \times 0.5 = 0.46),$$

was unter gewissen Vorbehalten (die Drehung ist stark vom p_H und Salzgehalt der Lösung abhängig) 390 mg (51% d.Th.) an *d*-Arabinose entspricht.

Mit Natriumhydrogencarbonat wird die Lösung auf p_H 6 gebracht und i. Vak. bei 40° Badtemperatur trocken gedampft. Der gut getrocknete Rückstand wird mit 10 ccm Eisessig 10 Min. bei 80–90° ausgezogen und nach Zusatz von etwas Kohle filtriert. Nach dem Animpfen krystallisiert der Zucker über Nacht aus. Durch Einengen i. Vak. wird die Krystallisation vervollständigt. Man erhält 320 mg fast farbloses Rohprodukt mit einem unklaren Schmp. von 150°; es enthält noch 25% Salze. Aus Eisessig, dann aus Alkohol umkrystallisiert schmilzt die *d*-Arabinose bei 157° (Lit. 159°).

$C_5H_{10}O_5$ (150.1) Ber. C 40.00 H 6.72 Gef. C 39.84 H 6.63 (0.8% Asche).

$$[\alpha]_D^{20} : -0.61^\circ \times 100/1.15 \times 0.5 = -106^\circ \quad (\text{Lit. } -105^\circ).$$

Isolierung der *d*-Arabinose als *p*-Nitranilin-*d*-arabinosid: Die wie oben beschrieben vorsichtig eingedampfte Reaktionslösung wird mit 100 ccm 96-proz. Alkohol heiß ausgezogen, nach Zusatz von etwas Kohle filtriert und auf wenige ccm i. Vak. eingeengt. Die blaßgelbe Lösung wird mit 0.4 g *p*-Nitranilin und einem Tröpfchen Eisessig

¹⁵⁾ Die Kohlensäure wird aus dem Reaktionskolben durch ein etwa 30 cm langes Steigrohr abgeleitet. Dadurch wird erreicht, daß das Propanol nicht sofort abdestilliert, aber langsam bis zum Ende der Reaktion von der Kohlensäure fortgeführt wird. Wenn beim Ende der Reaktion noch Propanol im Ansatz ist, macht die Abtrennung der gefärbten Nebenprodukte Schwierigkeiten. Mit Hilfe eines Rückflußkühlers, dessen Kühlung gegen Ende der Reaktion abgestellt wird, kann man den gleichen Effekt auch bei Anwendung von Methanol erreichen.

versetzt und 20 Min. unter Rückfluß gekocht. Über Nacht scheiden sich 280 mg *p*-Nitro-anilin-*d*-arabinosid ab, was einer Ausbeute von 20% (auf eingesetztes Oxim ber.) entspricht. Nach dem Umkristallisieren aus Methanol blaßgelbe Blättchen vom Schmp. 206°.

$C_{11}H_{14}O_6N_2$ (270.2) Ber. C 48.88 H 5.21 N 10.36 Gef. C 48.89 H 5.21 N 10.48.

Abbau von *d*-Galaktose-oxim zu *d*-Lyxose.

Die Umsetzung erfolgt in der gleichen Weise, wie beim Glucose-oxim-Abbau beschrieben ist. Die Ausbeute ist in diesem Fall etwas besser, wenn nur 1 g Natriumhydrogencarbonat auf 1 g Galaktose-oxim verwendet wird.

Es wurden 370 mg Silbercyanid abgeschieden, was einer Ausbeute von 410 mg *d*-Lyxose (55% d.Th.) entsprechen würde. Da keine Impfkristalle vorhanden waren, gelang es nicht, die *d*-Lyxose selbst krystallisiert zu erhalten. Sie wurde daher als *p*-Nitranilin-*d*-lyxosid isoliert. Die Umsetzung wurde wie bei der Gewinnung von *p*-Nitranilin-*d*-arabinosid beschrieben vorgenommen. Ausb. 320 mg (23% d.Th., ber. auf *d*-Galaktose-oxim). Aus Wasser lange, blaßgelbe Nadeln vom Schmp. 143–145°.

$C_{11}H_{14}O_6N_2$ (270.2) Ber. C 48.88 H 5.21 N 10.36 Gef. C 48.60 H 5.28 N 10.56.

96. Friedrich Weygand, Otto Trauth und Rudolf Löwenfeld: Konstitutionsauflärung des Thiozuckers der Adenylthiomethylpentose*).

[Aus dem Chemischen Institut der Universität Heidelberg.]

(Eingegangen am 23. Mai 1950.)

Es wird gezeigt, daß der Thiozucker der Adenylthiomethylpentose die 5-Methylthio-*d*-ribose ist.

Die Adenylthiomethylpentose wurde erstmalig von I. A. Mandel und E. K. Dunham¹⁾ 1912, dann von U. Suzuki²⁾ 1914 aus Hefe isoliert. Erst 1924 erkannten U. Suzuki, S. Odake und T. Mori³⁾, daß die Zuckerkomponente schwefelhaltig ist. Später trennte man die Adenylthiomethylpentose auch von rohen Vitamin B₁-Präparaten³⁾ und von roher Cozymase⁴⁾ (aus Hefe gewonnen) ab. Bei der sauren Hydrolyse zerfällt sie in 1 Mol. Adenin und 1 Mol. Thiozucker der Zusammensetzung $C_6H_{12}O_4S$.

Die bis zum Beginn unserer Untersuchungen über die Konstitution des Thiozuckers gesicherten Tatsachen können nach den Arbeiten von U. Suzuki²⁾, U. Suzuki, S. Odake und T. Mori³⁾, U. Suzuki und T. Mori⁵⁾, P. A. Levene⁶⁾, P. A. Levene und H. Sobotka⁷⁾, A. L. Raymond⁸⁾ sowie G. Wendt⁹⁾ wie folgt zusammengefaßt werden.

Beim Erhitzen mit Salzsäure entsteht Furfurol³⁾, woraus sich das Vorliegen einer linearen C-Kette ergibt. Es handelt sich um eine Pentose, die eine Methylmercapto-Gruppe trägt, denn weder der Zucker selbst noch der leicht daraus erhältliche Zuckeralkohol geben die für SH-Gruppen spezifischen Reak-

*) Vorgetragen auf der Chemiedozenten-Tagung in Bonn am 23. 4. 1950.

¹⁾ Journ. biol. Chem. 11, 85 [1912]. ²⁾ Journ. chem. Soc. Tokio 84, 1134 [1914].

³⁾ Biochem. Ztschr. 154, 278 [1924].

⁴⁾ H. v. Euler u. K. Myrbäck, Ztschr. physiol. Chem. 177, 237 [1928].

⁵⁾ Biochem. Ztschr. 162, 413 [1925]. ⁶⁾ Journ. biol. Chem. 59, 465 [1924].

⁷⁾ Journ. biol. Chem. 65, 551 [1925].

⁸⁾ Journ. biol. Chem. 107, 85 [1934]. ⁹⁾ Ztschr. physiol. Chem. 272, 152 [1942].