

alles in Lösung ging. Nach 1 Stde. wurde mit Wasser verdünnt. Das *Lävulinsäure-cofein-(8)-hydrazon* schied sich in gelben Kristallen ab; Roh-Schmp. 220–225°, nach wiederholtem Umkristallisieren farblose Kristalle; Schmp. 253–255°.

Bei mindestens 6–8 stdg. Kochen in Wasser gelang die Spaltung auch ohne Gegenwart von Salzsäure.

KURT HEYNS und MANFRED BECK

## XII. Mitteil. über katalytische Oxydationen<sup>1)</sup>

### DIE SYNTHESE DER D-GALAKTOSAMINURONSÄURE (2-AMINO-2-DESOXY-D-GALAKTURONSÄURE)

Aus dem Chemischen Institut der Universität Hamburg

(Eingegangen am 16. Juli 1957)

Benzyl-*N*-carbobenzoxy- $\alpha$ -D-galaktosaminid, das durch Umsetzung von *N*-Carbobenzoxy-D-galaktosamin mit Benzylalkohol zugänglich ist, wird mit Sauerstoff am Platinkontakt zum Benzyl-*N*-carbobenzoxy- $\alpha$ -D-galaktosaminuronid oxydiert. Abspaltung der Benzyl- und Carbobenzoxyreste durch Hydrierung liefert die freie D-Galaktosaminuronsäure.

Amino-hexuronsäuren sind in Naturstoffen häufig vermutet worden<sup>2)</sup>, ohne daß eine einwandfreie Identifizierung bisher gelungen ist. M. E. WEBSTER, W. R. CLARK und M. E. FREEMAN<sup>3)</sup> haben im Vi-Antigen von *Bact. coli* eine Amino-uronsäure angenommen. Als einzige Polyhydroxyaminosäure ist bisher die Lactaminsäure<sup>4)</sup> bzw. Neuraminsäure<sup>5)</sup> in ihrer Struktur als Ketosäure mit einer Kette von 9 C-Atomen aufgeklärt worden. Die Uronsäuren des D-Glucosamins und des D-Galaktosamins sind von Interesse, da diese Aminozucker beide in zahlreichen Mucopolysacchariden<sup>6)</sup> und Mucoproteinen<sup>6)</sup> stets gemeinsam mit D-Glucuronsäure vorkommen.

Die hier beschriebene Darstellung der D-Galaktosaminuronsäure schließt sich eng an die kürzlich von K. HEYNS und H. PAULSEN<sup>7)</sup> angegebene Synthese der D-Glucosaminuronsäure an. Für die entscheidende Stufe wurde ebenfalls das Verfahren der katalytischen Oxydation<sup>8)</sup> angewendet. In wäßriger schwach alkalischer Lösung bei wenig erhöhter Temperatur und Gegenwart eines Platinkatalysators läßt sich auch hier die primäre Alkoholgruppe am C-Atom 6 des D-Galaktosamins selektiv neben den vorhandenen sekundären Alkoholgruppen mit Sauerstoff in die Carboxylgruppe

<sup>1)</sup> XI. Mitteil.: K. HEYNS und M. BECK, Chem. Ber. **89**, 1648 [1956].

<sup>2)</sup> J. T. PARK, J. biol. Chemistry **194**, 877, 885, 897 [1952]; E. T. KREBS und Mitarbb., C. **1952**, 4960; A. L. PETTIGREW, C. **1953**, 2952.

<sup>3)</sup> Arch. Biochem. Biophysics **50**, 223 [1954].

<sup>4)</sup> R. KUHN und R. BROSSMER, Chem. Ber. **89**, 2471 [1956].

<sup>5)</sup> E. KLENK, Angew. Chem. **68**, 349 [1956]; J. W. CORNFORTH, M. E. DAINES und A. GOTTSCHALK, Proc. chem. Soc. **1957**, 25.

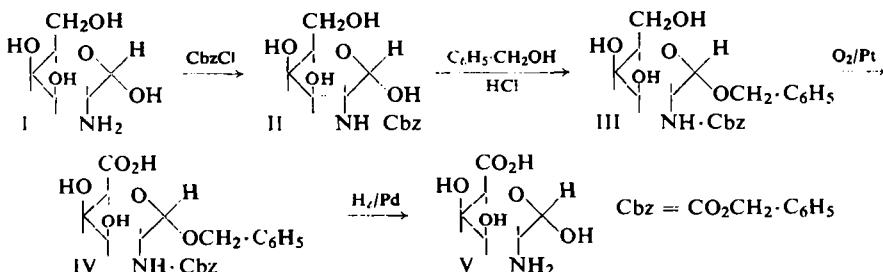
<sup>6)</sup> P. W. KENT und M. W. WHITEHOUSE, Biochemistry of Aminosugars, Butterworth Publications Ltd., London 1955, S. 241. <sup>7)</sup> Chem. Ber. **88**, 188 [1955].

<sup>8)</sup> Zusammenfassende Übersicht über die Anwendbarkeit der katalytischen Oxydation siehe K. HEYNS und H. PAULSEN, Angew. Chem. **69**, 600 [1957].

überführen. Dabei ist ein Schutz der leicht oxydablen Aldehydgruppe am C-Atom I und der Aminogruppe des  $\alpha$ -Galaktosamins erforderlich.

In bestimmten Fällen sind ungeschützte Aminogruppen unter den Bedingungen einer milden katalytischen Oxydation ( $30^\circ$ ) stabil, wie z. B. bei der Oxydation von  $\alpha$ -Glucosamin zu  $\alpha$ -Glucosaminsäure<sup>9)</sup>. Eine besonders stabile Aminogruppe fanden wir im Tris-hydroxymethyl-aminomethan, das in wäßriger Lösung bei  $p_H$  10 und  $60^\circ$  mittels der katalytischen Oxydation nicht angreifbar ist.

Im vorliegenden Falle zeigte sich, daß auf eine Blockierung der Aminogruppe nicht verzichtet werden kann, was hier mittels Carbobenzoxylierung erfolgte<sup>10)</sup>. *N*-Carbobenzoxy- $\alpha$ -galaktosamin (II) ist wesentlich leichter in Wasser löslich als die entsprechende Verbindung des  $\alpha$ -Glucosamins<sup>11)</sup>. Es läßt sich mittels Essigesters im Zweiphasensystem abscheiden. Die stark unterschiedliche Löslichkeit beider Carbobenzoxylverbindungen kann zur Trennung von  $\alpha$ -Glucosamin und  $\alpha$ -Galaktosamin ausgenutzt werden, indem aus einer hinreichend verdünnten Lösung eines Gemisches beider Aminozucker mit Carbobenzoylchlorid praktisch nur das *N*-Carbobenzoxy- $\alpha$ -glucosamin abgeschieden wird<sup>12)</sup>.



Die Aldehydgruppe des  $\alpha$ -Galaktosamins läßt sich vorteilhaft als Benzylglykosid festlegen, da Benzyl- und Carbobenzoxylgruppen durch Hydrierung zugleich entfernt werden. II liefert mit salzsäurehaltigem Benzylalkohol Benzyl-*N*-carbobenzoxy- $\alpha$ -D-galaktosaminid (III).

An  $\alpha$ -Galaktosamin mit freier Aminogruppe erwies sich eine direkte Glykosidierungsreaktion als nicht durchführbar; sie gelingt nur, wenn die Aminogruppe acyliert ist. Bei der Benzylierung bildet sich ein schwer lösliches Nebenprodukt mit mehreren Benzylresten, dessen Struktur wir noch nicht aufklären konnten; es ließ sich unter den Bedingungen der katalytischen Oxydation nicht zur Carbonsäure oxydieren, sondern wurde unverändert aus Oxydationsansätzen wieder zurückgewonnen.

Die Oxydation von III mit Platin-Kohle-Katalysator, wie sie bei der Darstellung der  $\alpha$ -Glucosaminuronsäure mit Erfolg angewendet worden war, ergab einen unbefriedigenden Reaktionsverlauf (höchstens 20% Ausb.) und schwer zu reinigende Reaktionsprodukte. Ein Reinplatin-Katalysator, durch Hydrierung von Platindioxyd nach ADAMS<sup>13)</sup> dargestellt, ermöglichte dagegen Ausbeuten von 76%. Bei Verwendung

<sup>9)</sup> K. HEYNS und W. KOCH, Chem. Ber. 86, 110 [1953].

<sup>10)</sup> K. HEYNS und H. PAULSEN, Chem. Ber. 89, 1152 [1956].

<sup>11)</sup> J. E. JOLLES und W. T. J. MORGAN, Biochem. J. 34, 1183 [1940].

<sup>12)</sup> E. CHARGAFF und M. BOVARNIK, J. biol. Chemistry 118, 421 [1936].

<sup>13)</sup> Vgl. auch R. P. A. SNEEDEN und R. B. TURNER, J. Amer. chem. Soc. 77, 190 [1954].

des Platin-Kohle-Katalysators trat während der Reaktion eine zunehmende Inaktivierung auf, während der Reinplatin-Katalysator sich bei mehreren Ansätzen wiederverwenden ließ, nachdem er mit 2 n HCl und dest. Wasser gewaschen worden war. Die Verwendung des Platin-Kohle-Katalysators führte zur merklichen Bildung von Benzaldehyd während der Reaktion; auch diese Nebenreaktion trat bei Verwendung von Reinplatin weitgehend zurück\*).

Die Uronsäure IV kann aus der Reaktionslösung mit Salzsäure ausgefällt werden. Durch Hydrieren von IV mit Pd-Kohle-Katalysator in Wasser wird die freie D-Galaktosaminuronsäure (V) erhalten, wobei zunächst der Carbobenzoxyrest und später der Benzylrest abhydriert werden. Beide Abspaltungsreaktionen überschneiden sich, so daß die Zwischenstufe nur schwer zu fassen ist.

Die katalytische Oxydation von Methyl-N-acetyl- $\alpha$ -D-galaktosaminid lieferte Reaktionslösungen, in denen chromatographisch nur Abbauprodukte und Ausgangsmaterial festgestellt werden konnten. Ähnliche Ergebnisse zeigte die Oxydation von Benzyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminid<sup>7)</sup>; anscheinend reicht der Schutz der Aminogruppe durch N-Acetylierung hier nicht aus.

Die D-Galaktosaminuronsäure ähnelt in ihren Eigenschaften der D-Glucosaminuronsäure. Während die Zwischenstufen der Synthese stets eine größere Löslichkeit als die entsprechenden D-Glucosamin-Derivate hatten, ist die D-Galaktosaminuronsäure in reinem Wasser noch schwerer löslich als die D-Glucosaminuronsäure. Sie verträgt ohne Zersetzungerscheinungen kurzzeitiges Erhitzen mit Wasser auf 80°, wobei sie rasch in Lösung geht. Aus Wasser kristallisiert sie sehr langsam unter Zusatz von wenig Äthanol im Verlauf von mehreren Tagen in kristallwasserfreier Form aus.

In sauren und basischen wäßrigen Lösungen ist die D-Galaktosaminuronsäure sehr leicht löslich. Die Lösungen in Alkali sind unbeständig und zeigten in 2 n NaOH nach 10 Min. langem Erhitzen auf 70° Braunfärbung. Beim Chromatographieren mit Butanol-Eisessig-Wasser ließen sich neben wenig Ausgangsmaterial vier weitere mit ammoniakalischer Silbernitratlösung anfärbbare Flecken nachweisen. In 1 n HCl ist die Verbindung stabil. Einstündiges Erwärmen bei 80° ergab keinerlei Veränderungen; die Lösung blieb dabei vollkommen hell, chromatographisch war nur die Uronsäure nachzuweisen. Beim Chromatographieren einer wäßrigen Uronsäurelösung mit Pyridin-Amylalkohol zeigte die Verbindung keine Zersetzung, sondern lieferte einen einheitlichen Fleck.

Mit Kalignost bildet D-Galaktosaminuronsäure einen in Wasser schwer, in Aceton leicht löslichen Niederschlag; sie reagiert positiv mit Ninhydrin, mit ammoniakalischem Silbernitrat und Fehlingscher Lösung. Die Naphthoresorcin-Reaktion nach B. TOLLENS<sup>14)</sup> verläuft negativ. Die ELSON-MORGAN-Reaktion<sup>15)</sup> ist positiv. Es entsteht dabei wie beim D-Galaktosamin ein roter Farbstoff. Dieser Farbstoff wurde nach C. J. M. RONDLE und W. T. J. MORGAN<sup>16)</sup> hergestellt und das Spektrum im Zeiß-Spektralphotometer ausgemessen. Zum Vergleich wurde die gleiche Reaktion mit der

\* ) Wir führen dies hier ausdrücklich an, weil das Verfahren der katalytischen Oxydation, wie wir es in größerem Umfang zur Anwendung gebracht haben, sich vielfach nicht von einem Substrat auf ein verwandtes System übertragen läßt, sondern häufig erst nach Variation des Verfahrens präparativ zum Erfolg führt.

<sup>14)</sup> Ber. dtsch. chem. Ges. 41, 1788 [1908].

<sup>15)</sup> L. A. ELSON und W. T. J. MORGAN, Biochem. J. 27, 1824 [1933].

<sup>16)</sup> Biochem. J. 61, 586 [1955].

$\alpha$ -Glucosaminuronsäure durchgeführt. Beide Amino-uronsäuren ergeben gleichermaßen einen Farbstoff, der ein Maximum bei  $520 \text{ m}\mu$  besitzt. Die Farbintensität liegt bei der  $\alpha$ -Galaktosaminuronsäure niedriger als bei der  $\alpha$ -Glucosaminuronsäure. Der unter den gleichen Bedingungen aus  $\alpha$ -Glucosamin und  $\alpha$ -Galaktosamin hergestellte Farbstoff zeigt ein Maximum bei  $530 \text{ m}\mu$ .

Der PROMONTA GMBH., Hamburg, danken wir für die Aufarbeitung einer größeren Menge Rindertracheen auf Chondroitinschwefelsäure.

### BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

*Darstellung des Katalysators:* 2 g Platindioxyd nach ADAMS wurden in einer Schüttelente in Eisessig suspendiert. Man hydrierte bei Zimmertemperatur, bis die Wasserstoffaufnahme beendet war. Dann wurde die Schüttelente mehrere Male an der Wasserstrahlpumpe evakuiert. Ein derart behandelter Katalysator besitzt eine größere Aktivität. Der Katalysator wurde abgesaugt, mit Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet. Er zeigte bei neun katalytischen Oxydationen, wobei verschiedene Substanzen oxydiert wurden, keinerlei Aktivitätsschwund. Nach jeder Oxydation wurde er mit  $2n$  HCl und dann mit heißem Wasser gewaschen.

*D-Galaktosamin-hydrochlorid:* 100 g Chondroitinschwefelsäure wurden nach S. GARDELL.<sup>17)</sup> mit Zinn(II)-chlorid und Salzsäure hydrolysiert, die Sn-Ionen durch Fällen mit Schwefelwasserstoff entfernt, die Lösung mit Kohle entfärbt und i. Vak. zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde in 100 ccm Methanol aufgenommen. Nach Abtrennen von ungelöster Substanz wurde in die gelbfärbte methanol. Lösung 1–2 Min. Chlorwasserstoff eingeleitet und 1–2 Tage im Eisschrank aufbewahrt, worauf das  $\alpha$ -Galaktosamin-hydrochlorid auskristallisierte. Diese Abscheidung ist der von GARDELL beschriebenen Aceton-Fällung vorzuziehen. Das  $\alpha$ -Galaktosamin-hydrochlorid wurde abfiltriert und mit Methanol und Aceton gewaschen. Ausbeuten der ersten Fällung 15–20 g. Aus der Mutterlauge ließ sich beim Einengen eine weitere Fraktion gewinnen. Gesamtausb. 20 g.  $[\alpha]_D^{20}: +114.5^\circ \rightarrow +89.0^\circ$  ( $c = 4.18$ , in Wasser).

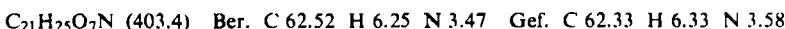
*N-Carbobenzoxy- $\alpha$ -galaktosamin (II):* 13.6 g  $\alpha$ -Galaktosamin-hydrochlorid wurden in 100 ccm Wasser gelöst und 13 g Natriumhydrogencarbonat zugegeben. Unter Schütteln wurden in fünf Portionen insgesamt 15 ccm Carbobenzoxychlorid zugesetzt. Man ließ den entstandenen weichen Brei über Nacht im Kühlschrank stehen. Dann gab man 130 ccm Essigester hinzu und erwärmt, bis sich eine zweiphasige Lösung gebildet hatte, die von einer Trübung durch Absaugen befreit wurde. Nach einiger Zeit begann das *N-Carbobenzoxy- $\alpha$ -galaktosamin* in beiden Phasen auszukristallisieren. Man vervollständigte die Kristallisation durch 12 stdg. Aufbewahren im Eisschrank. Es wurde scharf abgesaugt, mit viel Essigester gewaschen und auf Ton getrocknet. Man erhielt 12.2 g Rohprodukt, das man umkristallisierte, indem die Substanz in 70 ccm Eisessig in der Wärme gelöst und bis zur schwachen Trübung Essigester zugegeben wurde. Ausb. 10.4 g (52 % d. Th.). Nach dreimaligem Umkristallisieren erreicht die Substanz von  $170^\circ$  ab und schmilzt bei  $177-178^\circ$ .  $[\alpha]_D^{20}: +86.6^\circ$  (15 Min.)  $\rightarrow +78.7^\circ$  (18 Stdn.) ( $c = 2.04$ , in Pyridin).

$C_{14}H_{19}O_7N$  (313.3) Ber. C 53.67 H 6.11 N 4.47 Gef. C 53.42 H 6.11 N 4.35

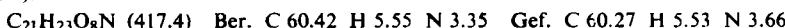
*Benzyl-N-carbobenzoxy- $\alpha$ -D-galaktosaminid (III):* 7 g einmal umkristallisiertes *N-Carbobenzoxy- $\alpha$ -galaktosamin* wurden fein gepulvert und in 175 ccm Benzylalkohol, der 2 % HCl enthält, bei  $62^\circ$  unter Röhren eingetragen. Nach einiger Zeit war alles in Lösung gegangen. Man rührte 60 Min., neutralisierte rasch mit Bleicarbonat und filtrierte. Das Lösungsmittel

<sup>17)</sup> Acta chem. scand. 5, 195 [1951].

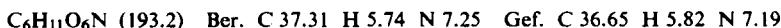
wurde sofort bei 80–100°/1–2 Torr abdestilliert. Je länger die Substanz mit dem Lösungsmittel in Berührung blieb, umso geringer waren die Ausbeuten. Es bildete sich dann in größerer Menge ein Nebenprodukt mit dem Schmp. 207°,  $[\alpha]_D^{20} : +182^\circ$  (Pyridin,  $c = 2.2$ ). Der gelbbraune Rückstand wurde in 60 ccm Äther-Petroläther-Gemisch (1:1) suspendiert und  $\frac{1}{2}$ –1 Stde. unter gelegentlichem Zerreiben der Substanz stehengelassen. Man filtrierte ab, digerierte mit einem Gemisch von Äther-Petroläther (2:1) und erhielt 8.1 g eines schwach gelben Pulvers, das aus Acetonitril umkristallisiert wurde. Ausb. 4.1 g (35 % d. Th.) vom Schmp. 195°. Nochmaliges Umkristallisieren lieferte ein Produkt vom Schmp. 200–201°. Die analysenreine Substanz schmilzt bei 202.5–203°.  $[\alpha]_D^{20} : +170.0^\circ$  ( $c = 2.0$ , in Pyridin).



*Benzyl-N-carbobenzoxy- $\alpha$ -D-galaktosaminuronid (IV):* 2.6 g *Benzyl-N-carbobenzoxy- $\alpha$ -D-galaktosaminid* vom Schmp. 201° wurden in 350 ccm Wasser von 60° suspendiert. Man fügte 1.3 g Platinkatalysator hinzu. Der  $p_H$ -Wert der Lösung lag dann bei 6.2. Nach Zugabe von 12 ccm einer 9-proz. Natriumhydrogencarbonatlösung hatte die Lösung einen  $p_H$ -Wert von 7.2. Unter Konstanthaltung der Temperatur (Thermostat) wurde 10 Stdn. lang *Sauerstoff* durch die Lösung geblasen. Es trat dabei ein leichter Geruch nach Benzaldehyd auf. Nach 7 Stdn. Oxydationsdauer fügte man nochmals 6 ccm Hydrogencarbonatlösung hinzu. Die hellgelbe Lösung wurde nach der Oxydation vom Katalysator abfiltriert und i. Vak. auf 200 ccm eingengt. Das gebildete Uronid fällt man durch tropfenweise Zugabe von 6 ccm konz. Salzsäure aus, wobei kräftig geschüttelt werden mußte. Man ließ 2 Stdn. im Eisschrank stehen, filtrierte ab und wusch mit Wasser nach. Es wurde umkristallisiert, indem man die Substanz in 80 ccm Methanol löste, von Verunreinigungen abfiltrierte und Wasser bis zur schwachen Trübung zugab. Nach Aufbewahren im Kühlenschrank filtrierte man ab, wusch mit Wasser. Ausb. 2.05 g (76 % d. Th.), Schmp. 231–235° (Hauptmenge bei 234°). Nochmaliges Umkristallisieren lieferte ein Produkt vom Schmp. 234–235°.  $[\alpha]_D^{20} : +140.2^\circ$  ( $c = 2.05$ , in Pyridin).



*D-Galaktosaminuronsäure (V):* 2.2 g *Uronid IV* wurden in 30 ccm Wasser suspendiert, 1.4 g Palladiumkatalysator (Pd-Carboraffin 10-proz. an Pd) zugefügt und bei Zimmertemperatur 16 Stdn. *Wasserstoff* durch die Suspension geleitet. Man erkannte die einsetzende Hydrierung am Toluolgeruch des Abgases. Nach der Hydrierung filtrierte man vom Katalysator ab, wusch diesen zweimal mit warmem Wasser (50°), vereinigte die Lösungen und engte i. Vak. (40° Wasserbad) auf etwa 5 ccm ein. Aus der gelben Lösung kristallisierte im Kühlenschrank eine Vorfraktion aus, die die Verunreinigungen enthielt und die verworfen wurde. Nach Zugabe von wenig Äthanol zur Mutterlauge kristallisierten im Verlauf einiger Tage (bis zu zwei Wochen) 577 mg (57 % d. Th.) an *D-Galaktosaminuronsäure* aus. Man filtrierte ab und wusch mit Wasser und anschließend mit Methanol. Die Säure zeigt keinen charakteristischen Schmelz- oder Zersetzungspunkt, sondern verkohlt beim Erhitzen ab 160°.  $[\alpha]_D^{20} : +84.5^\circ$  ( $c = 0.994$ , in Wasser-HCl von  $p_H$  2.0).



*R<sub>F</sub>-Werte:* Die Chromatogramme wurden mit Butanol-Eisessig-Wasser (7:0.7:2.3) = Bu/E oder Pyridin-Amylalkohol-Wasser (7:7:6) = P/A entwickelt und mit Ninhydrin oder ammoniakalischem Silbernitrat besprüht. Der *R<sub>F</sub>*-Wert des *N*-Carbobenzoxy-galaktosamins lag bei 0.66 (Bu/E). Für die *D*-Galaktosaminuronsäure wurde als Bezugssubstanz die *D*-Galaktose (*R* = 1) gewählt. Es fanden sich folgende Werte:  $R_{\text{Gal}} = 0.61$  (Bu/E);  $R_{\text{Gal}} = 0.28$  (P/A).