

Butin). Die Substanz ist nach dem Misch-Schmp. und dem IR-Spektrum identisch mit dem Dichlorid von SMIRNOW-SAMKOW³⁾.

trans(?)-3.4-Dichlor-hexen-(3): Aus einem entsprechenden Ansatz unter Verwendung von 20.5 g Hexin-(3), 14.0 g Chlor, 1.6 ccm Borfluorid-ätherat und 0.09 g Wasser wurden 22 g Dichlorhexen vom Sdp.₂₀ 45°, n_D^{20} 1.4603, isoliert.

C₆H₁₀Cl₂ (153.0) Ber. C 47.08 H 6.59 Cl 46.33 Gef. C 47.26 H 6.85 Cl 45.8

IR-Spektrum: Starke Banden bei 2920, 1450, 1086, 812 und 707/cm.

Aus dem bei 45–55°/0.08 Torr siedenden Nachlauf schieden sich bei –70° wenige farblose Kristalle vom Schmp. 69–69.5° (aus Pentan) ab: 3.3.4.4-Tetrachlor-hexan.

C₆H₁₀Cl₄ (224.0) Ber. C 32.17 H 4.50 Cl 63.32 Gef. C 33.15 H 4.10 Cl 62.7

trans(?)-3.4-Dichlor-2.2.5.5-tetramethyl-hexen-(3), (CH₃)₃C·CCl·CCl·C(CH₃)₃: Die Behandlung von 34.5 g Di-tert.-butyl-acetylen mit 14.0 g Chlor, 1.6 ccm Borfluorid-ätherat und 0.09 ccm Wasser bei –20° ergab ein Reaktionsgemisch, aus dem sich 5.3 g (11% d. Th.) einer Fraktion vom Sdp._{0.001} 29–29.5°, n_D^{20} 1.5056, isolieren ließen.

C₁₀H₁₈Cl₂ (209.1) Ber. C 57.44 H 8.66 Cl 33.90 Gef. C 57.41 H 7.98 Cl 34.1

FRANZ GOTTWALT FISCHER und HELMUT SCHMIDT

Die Epimerisierung der Uronsäuren

Aus dem Chemischen Institut der Universität Würzburg

(Eingegangen am 5. Mai 1959)

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Stefan Goldschmidt zum 70. Geburtstag gewidmet

Uronsäuren werden durch Erhitzen der neutralen wäßrigen Lösungen ihrer Salze auf 100° überraschend schnell am C-5 epimerisiert. Die epimeren Säurepaare lassen sich durch Ionenaustauscher trennen. Das ermöglicht eine einfache Darstellung der Uronsäuren der L-Reihe. Die Gewinnung von *L*-Iduronsäure, *L*-Guluronsäure und *L*-Altruronsäure aus D-Glucuronsäure, D-Mannuronsäure und D-Galakturonsäure wird beschrieben.

Im Gegensatz zu den mannigfaltigen, vieluntersuchten Umlagerungs- und Zerfallsreaktionen, die neutrale Monosaccharide in alkalischen Lösungen erleiden, tritt die Epimerisierung von Aldonsäuren durch Erhitzen ihrer Lösungen in Chinolin oder in wäßrigem Pyridin ohne allzusehr entmutigende Substanzverluste ein. Sie hat daher nicht nur in den Händen ihres Entdeckers E. FISCHER zur ersten Darstellung der epimeren Aldonsäuren aus den durch Oxydation natürlich vorkommender Saccharide zugänglichen gedient und damit die Synthese des Traubenzuckers und anderer Hexosen und Pentosen ermöglicht¹⁾; sie ist auch später mehrfach zu präparativen

¹⁾ E. FISCHER, Ber. dtsch. chem. Ges. **23**, 799, 2611 [1890]; **24**, 2136, 3622 [1891]; **27**, 1524 [1894]; E. FISCHER und O. PILOTY, ebenda **24**, 4214 [1891]; E. FISCHER und R. S. MORRELL, ebenda **27**, 382 [1894]; E. FISCHER und J. W. FAY, ebenda **28**, 1975 [1895]; E. FISCHER und H. HERBORN, ebenda **29**, 1961 [1896]; E. FISCHER und O. BROMBERG, ebenda **29**, 581 [1896].

Zwecken verwendet worden. Die Epimerisierung erfolgt jedoch so langsam, daß die Aldonsäuren z. B. in Chinolin 1 Stde. auf 140°, in wäßrigem Pyridin 3 Stdn. auf 150° oder 115–140 Stdn. auf 100°, in Lösungen mit Bariumhydroxyd 115 Stdn. auf 100° erhitzt werden müssen. „Gleichgewichtslagen“ sind damit immer noch nicht erreicht. Zersetzungsreaktionen verbieten ein Erhitzen auf höhere Temperaturen oder für längere Zeiten. Die Ausbeuten an epimeren Säuren übersteigen selten 25% (z. B. D-Mannonsäure aus D-Gluconsäure zu 20%²⁾, D-Talonsäure aus D-Galaktonsäure zu 25%³⁾, D-Ribonsäure aus D-Arabonsäure zu 16%⁴⁾).

Epimerisierungsreaktionen von *Uronsäuren* sind bisher unseres Wissens nicht untersucht worden, vielleicht mit Rücksicht auf ihre Alkaliempfindlichkeit.

Wir haben durch die papierchromatographisch leicht möglich gewordene Analyse der Uronsäuren^{5,6)} festgestellt, daß diese Säuren viel schneller als die Aldonsäuren durch Erhitzen der neutralen, wäßrigen Lösungen ihrer Salze auf 100° epimerisiert werden. Schon das Eintrocknen von Tropfen ihrer Lösungen auf Papierchromatogrammen durch heiße Luft genügt zur teilweisen Epimerisierung; nach Entwicklung solcher Chromatogramme sind zwei Säureflecke sichtbar.

Die sterische Umlagerung findet am carboxylbenachbarten C-5 statt, so daß Säuren der D-Reihe in solche der L-Reihe übergehen. Für eine Epimerisierung am C-2, in der Nachbarschaft des glykosidischen Hydroxyls, finden sich keine Anzeichen, solange jeder Überschuß von Alkali vermieden wird. Auch die sonstigen für die LOBRY DE BRUYN-ALBERDA VAN EKENSTEINSche Reaktion kennzeichnenden Isomerisationen und Zersetzungen treten in den neutralen Lösungen nur in geringem Umfang ein.

Die Werte der Tabelle lassen erkennen, daß *D-Glucuronat* und *D-Mannuronat* bei 100° nach 24 Stdn. praktisch das „Gleichgewicht“ mit ihren epimeren Säureionen erreicht haben und daß nach dieser Zeit etwa 10% der eingesetzten Säuren Zersetzungen erlitten haben. Für präparative Zwecke ist ein 2stdg. Erhitzen zweckmäßig, während dessen nur 5% der Säuren zerstört werden. *D-Galakturonat* isomerisiert sich langsamer, so daß zur Gewinnung von *L-Altruronsäure* sich 6stdg. Erhitzen empfiehlt, wobei etwa 20% Verluste in Kauf zu nehmen sind. Bei diesem Säurepaar entsteht schließlich auch relativ weniger *L-Säure*.

C-5-Epimerisierung der Uronsäuren (0.01 *m* Na-Uronat in neutraler Lösung bei 100°)

	D-Säure : L-Säure			Prozentuales Endverhältnis
	in % der eingesetzten Säuremenge nach 2 Stdn.	4 Stdn.	6 Stdn.	
D-Glucuronsre. → L-Iduronsre.	61:34	49:40	40:42	50:50
D-Mannuronsre. → L-Guluronsre.	27:68	23:68	19:63	30:70
D-Galakturonsre. → L-Altruronsre.	80:16	—	45:35	55:45

2) H. T. BONNETT und F. W. UPSON, J. Amer. chem. Soc. **55**, 1245 [1933].

3) O. F. HEDENBURG und L. H. CRETCHER, J. Amer. chem. Soc. **49**, 478 [1927]; W. BOSSHARD, Helv. chim. Acta **18**, 482 [1935]; C. GLATTHAAR und T. REICHSTEIN, ebenda **21**, 3 [1938].

4) M. STEIGER, Helv. chim. Acta **19**, 189 [1936].

5) F. G. FISCHER und H. DÖRFEL, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **301**, 224 [1955].

6) F. G. FISCHER und H. DÖRFEL, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **302**, 186 [1955].

Wir überzeugten uns, daß die in der Tabelle angegebenen Endverhältnisse D-Säure: L-Säure nach spätestens 6 Stdn. auch erreicht werden, wenn die *L-Uronsäuren* Ausgangsprodukte der Epimerisierung sind. Die durch solche Versuchsreihen ermittelten Endwerte stimmten innerhalb $\pm 5\%$ mit den oben angegebenen überein.

Wir haben die Geschwindigkeit der Umlagerungen vor allem mit Lösungen der Natriumsalze untersucht; aus einigen Versuchen läßt sich jedoch schließen, daß sie auch in Lösungen anderer Salze der Uronsäuren gleich schnell erfolgen, z.B. auch in solchen der Pyridiniumsalze. Wesentlich ist nur, daß kein Lacton in der Lösung vorhanden ist oder entstehen kann. Wenn die Uronsäure unvollständig neutralisiert wird, so entzieht sich ein entsprechender Teil der Epimerisierung.

Zur sterischen Umlagerung können die Säuren auch als Salze hochmolekularer Kationen vorliegen, d. h. an die OH^\ominus -Form eines *basischen Ionenaustauschers* (Dowex-1-Harz) gebunden sein. Das Harz muß in äquivalenten Mengen vorliegen. Kleine Mengen wirken nicht etwa katalytisch epimerisierend; dazu ist die Hydrolyse der Uronate offenbar nicht zureichend. Die Anwendung eines basischen Harzes hat den Vorteil, daß eine Alkalizugabe vermieden wird und die im folgenden angegebene Aufarbeitung noch schneller und bequemer wird. Die Ausbeuten sind die gleichen wie nach Umlagerung von Alkaliuronaten in Lösung.

Während des Erhitzens der Harz-Uronate in Wasser (2 Stdn. auf 100°) ist eine geringe Kohlendioxydentwicklung zu bemerken. Als Produkte der Decarboxylierung lassen sich in den Lösungen *Pentosen* nachweisen (etwa 5% der Uronsäuren) und leicht abtrennen, da sie nicht mehr am Harz haften. Aus D-Glucuronsäure entsteht fast ausschließlich D-Lyxose, nicht D-Xylose, wie zu erwarten wäre.

Erhitzt man *D-Xylose*, *D-Arabinose* oder *D-Ribose* mit Dowex-1-Harz (OH^\ominus -Form, Gewichtsverhältnis 1:1) in wäßriger Suspension 4 Stdn. auf 100° , so bilden sich aus jedem Saccharid alle vier Pentosen nebeneinander, in ungefähr gleichen Mengenverhältnissen, mit einer geringfügigen Bevorzugung der D-Lyxose. Nachweis und Bestimmung der Aldopentosen wurden papierchromatographisch geführt⁷⁾.

Es tritt also nicht nur am C-2, sondern an allen drei asymmetrischen Atomen der Pentosekette Konfigurationswechsel ein.

Eine gleichartige Einwirkung von basischem Harz auf Aldohexosen läßt hingegen fast nur Epimerisierung am C-2 eintreten.

Die *Trennungen der beiden Epimeren eines Aldonsäurepaares* sind von früheren Autoren (in meist verlustreichen Operationen) durch Ausnutzung verschieden großer Löslichkeiten der Lactone oder der Salze oder anderer Derivate erzielt worden. Wir fanden, daß durch Verwendung eines *Anionenaustauschers* (Dowex-1, Acetat-Form) und Entwicklung mit 1.6 *n* Essigsäure sich in einem Arbeitsgang die epimeren Uronsäuren aus ihren Natriumsalzen gewinnen und voneinander trennen lassen. Schon mit kurzen Säulen gelingt derart die Trennung der D-Glucuronsäure von der L-Iduronsäure vollständig und scharf. Auch die Paare: D-Mannuronsäure/L-Guluronsäure und D-Galakturonsäure/L-Altruronsäure werden in der Hauptmenge getrennt. Nur geringe Anteile bleiben als Gemisch in Zwischenfraktionen des Säuleneluats. Die hier angegebene Gewinnung der L-Iduronsäure aus D-Glucuron dürfte bequemer und

⁷⁾ F. G. FISCHER und H. DÖRFEL, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 297, 164 [1954].

schneller sein als die vielstufige Synthese nach M. WOLFROM⁸⁾. Die L-Altruronsäure war bisher nicht beschrieben worden. Sie ist zu einer Lactonisierung ebensowenig fähig wie die D-Galakturonsäure.

Die schnelle Epimerisierung der Uronsäuren wird bei den Arbeitsgängen zu ihrer Isolierung aus Naturprodukten und ihrer Identifizierung zu beachten sein. Um Täuschungen auszuschließen, ist ein längeres Erhitzen der Lösungen ihrer Salze unbedingt zu vermeiden.

Bisher sind zwei *L-Uronsäuren als Naturstoffe* nachgewiesen worden: *L-Guluronsäure* findet sich in reichlichen Mengen neben D-Mannuronsäure in den Hydrolysaten der Alginsäuren aus Braunalgen⁶⁾. Wir haben uns durch vielfache Kontrollversuche vergewissert, daß die L-Säure nicht etwa durch Umlagerung der D-Säure bei der Aufarbeitung der Hydrolysate entsteht, sondern tatsächlich ein Baustein dieser sauren Polysaccharide ist. Die Uronsäure-Komponente in den Hydrolysaten von β -Heparin (Chondroitinsulfat B) ist als *L-Iduronsäure* erkannt worden⁹⁾. Auch die Operationen bis zur Isolierung und Identifizierung dieser Säure schließen die Möglichkeit einer Bildung durch sterische Umlagerung von D-Glucuronsäure aus.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Die analytischen Trennungen und Bestimmungen der Uronsäuren wurden papierchromatographisch ausgeführt⁵⁾, nachdem die genau neutralisierten 0.01 *m* Lösungen der Säuren in zugeschmolzenen Reagenzgläsern im Thermostaten auf 100° erhitzt worden waren. Mit dem angegebenen Trenngemisch wurden folgende auf die R_F -Werte von Glucose = 1 bezogene R_{Glucose} -Werte beobachtet: L-Iduronsäure 0.65, L-Altruronsäure 0.40, L-Iduron 0.85. Die R_{Glucose} -Werte der anderen Uronsäuren sind früher schon angegeben worden⁵⁾.

L-Iduronsäure aus D-Glucuronsäure: 5.00 g D-Glucuron wurden in 50 ccm Wasser gelöst und mit der berechneten Menge 2 *n* NaOH in Na-Glucuronat übergeführt. Die Lösung (die nötigenfalls mit Essigsäure auf p_H 7.0 eingestellt war) wurde im verschlossenen Gefäß 2 Stdn. auf 100° gehalten, dann im Wasserstrahlvakuum auf 10 ccm eingedampft und auf eine Dowex-1-Säule (Acetatform, 4 \times 40 cm) gegossen. Nach dem sorgfältigen Herauswaschen der Nationen mit dest. Wasser wurde mit 1.6 *n* Essigsäure eluiert. Die mit Hilfe eines Fraktomaten aufgefangenen Fraktionen von je 15 ccm (Ausflußzeit je 6 Min.) wurden auf ihre Reduktionswirkung und papierchromatographisch auf ihre Einheitlichkeit geprüft. Die ersten 2.70 l enthielten keine Uronsäure, die folgenden 1.50 l L-Iduronsäure, die nächsten 0.25 l keine Uronsäure, die weiteren 2.40 l D-Glucuronsäure. Nach dem Eindampfen der saccharidenthaltenden Eluate i. Vak. der Wasserstrahlpumpe, schließlich im Exsikkator, wurden erhalten: 1.30 g L-Iduronsäure, 2.60 g D-Glucuronsäure.

Die Säuren erwiesen sich bei der papierchromatographischen Analyse als völlig einheitlich. Aus der D-Glucuronsäure bildet sich im Exsikkator nach einigen Tagen kristallines D-Glucuron. Die Lactonisierung wurde durch 8 stdg. Erhitzen auf 65°/0.1 Torr vervollständigt. Nach Umkristallisation aus wäßr. Äthanol: Schmp. 163–165°, $[\alpha]_D^{20}$: +17° (Lit.¹⁰⁾: Schmp. 175°, $[\alpha]_D^{20}$: +19°).

⁸⁾ J. Amer. chem. Soc. 77, 2568 [1955].

⁹⁾ P. HOFFMANN, A. LINKER und K. MEYER, Science [Washington] 124, 1252 [1956]; Arch. Biochem. Biophysics 69, 435 [1957]; J. A. CIFONELLI, J. LUDOWIEG und A. DORFMAN, J. biol. Chemistry 233, 541 [1958].

¹⁰⁾ K. REHORST, Ber. dtsch. chem. Ges. 62, 519 [1929].

Die *L*-Iduronsäure lactonisierte unvollständig (Titration) und bildete auch nach einigen Tagen ein nicht kristallisierendes Harz. $[\alpha]_D^{25}$: +30° (2 Stdn.). Lit.⁸⁾: $[\alpha]_D^{25}$: +33° (4 Stdn.).

L-Iduronsäure aus *D*-Glucuronsäure mit Dowex-1-Harz: Nach Bestimmung der Kapazität des Dowex-1-Harzes (OH⁻-Form) durch Titration (1 g feuchtes Harz band 46 mg HCl bzw. 314 mg Glucuron) wurde die berechnete Menge zur wäßr. Lösung des Lactons gegeben (16 g Harz zu 5.0 g *Glucuron* in 30 ccm Wasser). Nach 10 Min. bei 50° war kein Lacton mehr in der Lösung. Während des Erhitzens (1½ Stdn. auf 100°) wurde geringe CO₂-Entwicklung beobachtet. Nach dem Waschen des Harzes zur Entfernung der entstandenen neutralen Saccharide (*D*-Lyxose) wurde es auf eine vorbereitete Dowex-1-Säule (Acetatform) gebracht und in der beschriebenen Weise mit 1.6 *n* Essigsäure eluiert. Ausbeuten an vollständig getrennten Säuren: 2.4 g *D*-Glucuronsäure, 1.5 g *L*-Iduronsäure.

L-Altruronsäure aus *D*-Galakturonsäure: In gleicher Weise, wie im vorstehenden Beispiel angegeben, wurden aus der 3 Stdn. auf 100° erhitzten, neutralen Lösung des Natriumsalzes von 5.00 g *D*-Galakturonsäure 3.30 g dieser Säure kristallisiert zurückerhalten und nur 0.55 g *L*-Altruronsäure gewonnen.

Die Trennung durch Ionenaustausch ist nicht so scharf wie beim Glucuronsäure/Iduronsäure-Paar. Die Elution (Säule und sonstige Bedingungen wie in vorstehendem Beispiel) hatte ergeben: Die ersten 3300 ccm waren leer, dann 825 ccm mit Galakturonsäure, weitere 390 ccm mit Säuregemisch, schließlich 700 ccm mit reiner *L*-Altruronsäure.

Die *D*-Galakturonsäure schmolz nach Umkristallisation aus wäßrigem Äthanol bei 143 bis 145° (Lit.¹¹⁾: 156°). $[\alpha]_D^{25}$: +49° (Lit.¹¹⁾: $[\alpha]_D^{25}$: +50.9°).

Die *L*-Altruronsäure war papierchromatographisch völlig einheitlich, kristallisierte jedoch auch nach längerem Aufbewahren nicht. Zur Lactonbildung ist sie nicht fähig. $[\alpha]_D^{25}$: +5.3° (Wasser, *c* = 0.568, 1-dm-Rohr).

L-Guluronsäure aus *D*-Mannuronsäure: Von *D*-Mannuronsäure ausgehend, läßt sich die Gewinnung von *L*-Guluronsäure in gleicher Weise ausführen. Nach 2 Stdn. bei 100° sind in der neutralen Lösung 2/3 des Säuregemisches Guluronsäure. Auch bei diesem Säurepaar werden nach den Eluatzen, die reine Mannuronsäure enthalten, vor den Fraktionen mit reiner Guluronsäure Zwischenfraktionen mit Gemischen der Säuren erhalten, allerdings mit nur kleinen Mengen.

Beispiel der Trennung eines Gemisches aus 500 mg *Mannuron* (neutrale Lösung des Natriumsalzes in 5 ccm Wasser 2 Stdn. auf 100° gehalten): Dowex-1-Säule (Acetatform, 1.6 × 30 cm). Nach dem Auswaschen der Natrium-Ionen mit dest. Wasser Elution mit 1.6 *n* Essigsäure. Die ersten 630 ccm leer, dann 70 ccm mit *D*-Mannuronsäure, 15 ccm mit Säuregemisch, 345 ccm mit *L*-Guluronsäure. Ausbeute an vollständig getrennten Säuren: 100 mg *D*-Mannuronsäure, 290 mg *L*-Guluronsäure.

Beide Säuren waren papierchromatographisch völlig einheitlich. Als Vergleichspräparate dienten *L*-Guluronsäure und *D*-Mannuronsäure, die aus Alginsäure-Hydrolysaten gewonnen waren⁶⁾.

11) F. EHRLICH und F. SCHUBERT, Ber. dtsh. chem. Ges. 62, 1987 [1929].