

297. Über die Aldobionsäure aus dem Samenschleim von *Plantago arenaria* Waldst. et Kit.

von F. Hostettler und H. Deuel.

(19. X. 51.)

Aus den Samen von *Plantago arenaria* Waldst. et Kit. wurde nach Nelson & Percival¹⁾ durch Extraktion mit kaltem Wasser und nachherige Ausfällung mit Isopropanol ein uronsäurehaltiges Polysaccharid in 5% Ausbeute gewonnen. Der Sulfataschengehalt von anfänglich 5,1% fiel nach Behandlung mit Salzsäure-Isopropanol auf 0,75%. Die elektrometrische Titration ergab ein Äquivalentgewicht von 1930.

Durch partielle Hydrolyse mit 3-proz. Oxalsäure wurden neben ungefähr 1% unlöslichem Anteil (hauptsächlich Zellulose²⁾) in Übereinstimmung mit der Literatur¹⁾ eine Aldobionsäure, viel D-Xylose, wenig L-Arabinose und sehr wenig D-Galaktose erhalten.

Durch schwefelsaure Hydrolyse bildete sich aus dem Bariumsalz der Aldobionsäure viel D-Xylose, wenig D-Galakturonsäure und sehr wenig Arabinose (wahrscheinlich L).

Zur Identifizierung der Hexuronsäure wurde das Bariumaldobionat nach Heidelberg & Goebel³⁾ mit Brom und Bromwasserstoffsäure oxydiert und lieferte dabei Schleimsäure (Smp. 214—215°). Demnach enthält der Pflanzenschleim D-Galakturonsäure.

Reines Aldobionsäuremonohydrat wurde aus dem Bariumaldobionat durch Perkolation über den Kationenaustauscher Amberlite IR-120 und Kristallisation aus Aceton-Wasser gewonnen. Das Monohydrat, Smp. 212—214°, hatte bei 20° eine Dissoziationskonstante K von $4,52 \cdot 10^{-4}$ 4).

Die Aldobionsäure (I) wurde durch Methylierung mit Dimethylsulfat und Natronlauge⁵⁾, Veresterung der Carboxylgruppe mit Diazomethan⁶⁾ und anschliessende Totalmethylierung nach Purdie⁷⁾ in den Methylester des Pentamethyl-methylaldobionids II, $[\alpha]_D^{21} = +125,5^\circ$, übergeführt. Nach Hydrolyse fiel die spezifische Drehung auf

¹⁾ W. A. G. Nelson & E. G. V. Percival, Soc. 1942, 58.

²⁾ Unveröffentlichte Untersuchungen am hiesigen Institut.

³⁾ M. Heidelberg & W. F. Goebel, J. Biol. Chem. 74, 613 (1927).

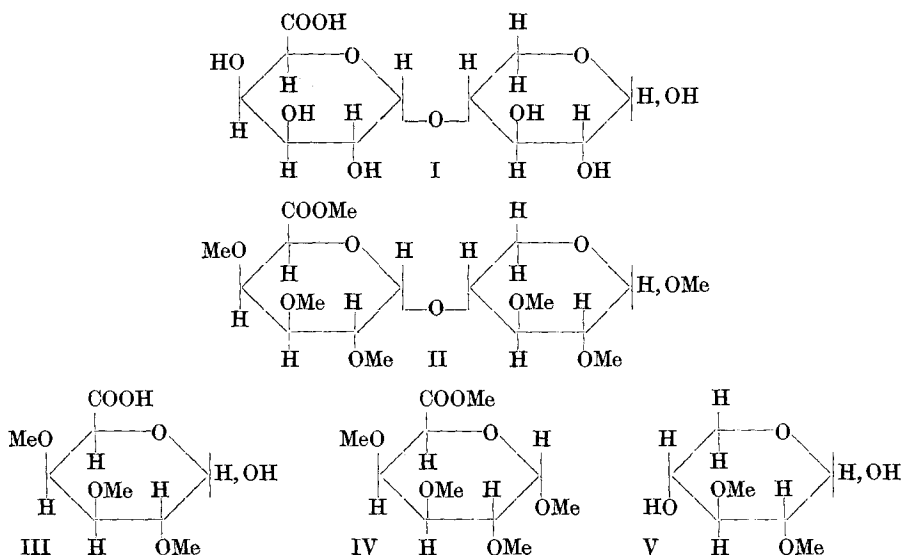
⁴⁾ F. Hostettler, Diss. E.T.H., Zürich 1951.

⁵⁾ W. N. Haworth, Soc. 107, 8 (1915); P. A. Levene, G. M. Meyer & M. Kuna, J. Biol. Chem. 125, 703 (1938); P. A. Levene & M. Kuna, J. Biol. Chem. 127, 49 (1939).

⁶⁾ R. S. Tipson, C. C. Christman & P. A. Levene, J. Biol. Chem. 128, 609 (1939); F. Arndt in C. R. Noller et al., Organic Syntheses 15, 6 (1935).

⁷⁾ T. Purdie & J. C. Irvine, Soc. 83, 1021 (1903); P. A. Levene & L. C. Kreider, J. Biol. Chem. 120, 597 (1937).

$[\alpha]_D^{21} = +74,8^\circ$, was mit dem für ein äquimolekulares Gemisch von 2,3,4-Trimethyl-D-galakturonsäure¹⁾ (III) und 2,3-Dimethyl-D-xylose²⁾ (V) berechneten Wert von $+74,2^\circ$ gut übereinstimmt.



Die Hydrolyse des Methylderivates II führte tatsächlich zu 2,3,4-Trimethyl-D-galakturonsäure (III) und 2,3-Dimethyl-D-xylose (V). III wurde durch Überführung in den Methylester von 2,3,4-Trimethyl- α -methyl-D-galakturonosid (IV)³⁾ und V durch Überführung in sein kristallines Anilid²⁾ identifiziert.

Danach sind die Hydroxylgruppen der C-Atome 2,3 und 4 der D-Galakturonsäure in der Aldobionsäure frei. Die D-Galakturonsäure muss also pyranoid im Disaccharid vorliegen. Die Hydroxylgruppen der C-Atome 2 und 3 der D-Xylose sind ebenfalls frei. Zur Glykosidbildung sind demnach nur die Hydroxylgruppen der C-Atome 4 und 5 befähigt. Infolge der grossen Säurestabilität der Aldobionsäure ist eine furanoide Konfiguration der D-Xylose unwahrscheinlich. Es wird deshalb angenommen, dass die Hydroxylgruppe am C-Atom 4 der D-Xylose mit der Halbacetalhydroxylgruppe der D-Galakturonsäure verknüpft ist. Die optischen Drehungen des Bariumsalses, des Monohydrates und des Methylderivates der Aldobionsäure sind sehr stark positiv. Die beiden Monosaccharide dürften daher durch 1,4- α -glykosidische Bindung verknüpft sein. Die aus dem Schleim von *Plantago arenaria* Waldst. et Kit. isolierte Aldobionsäure ist demnach 4- α -D-Galakturonopyranosido-D-xylopyranose (I).

¹⁾ R. S. Tipson, J. Biol. Chem. **125**, 341 (1938).

²⁾ H. A. Hampton, W. N. Haworth & E. L. Hirst, Soc. **1929**, 1739.

³⁾ P. A. Levene & L. C. Kreider, J. Biol. Chem. **120**, 597 (1937); R. S. Tipson & L. C. Kreider, J. Biol. Chem. **122**, 199 (1937/38).

Experimenteller Teil.

1. Extraktion des Polysaccharides. 2 kg Samen¹⁾ wurden mit 25 l Wasser versetzt und 24 Std. bei Zimmertemperatur gerührt. Der dickflüssige Schleim wurde durch feinporige Gaze abgenutscht. Die Samen wurden nochmals mit 10 l Wasser bei Zimmertemperatur 24 Std. gerührt. Die Gesamtausbeute an Polysaccharid konnte dadurch um etwa 10% gesteigert werden. Die vereinigten Filtrate wurden darauf langsam und unter Rühren in die doppelte Menge Isopropanol eingegossen. Nach 24 Std. wurde das ausgefällte Polysaccharid filtriert, mit Isopropanol und Äther gut ausgewaschen und bei Zimmertemperatur 24 Std. im Vakuum getrocknet. Ausbeute an lufttrockenem Polysaccharid 120 g (5,5% bezogen auf den Samen); Sulfataschengehalt 5,1%, Wassergehalt 8,5%.

Zur Entfernung der Asche behandelte man das Polysaccharid 3 Std. bei Zimmertemperatur mit 2 l salzsäurehaltigem Isopropanol (100 cm³ konz. HCl). Darauf wurde abgenutscht, mit Isopropanol bis zur Chlorfreiheit gewaschen und mit Äther nachgespült. Nach 72std. Trocknen im Vakuum bei Zimmertemperatur erhielt man 115 g lufttrockenes Polysaccharid mit 0,75% Sulfatasche und 7,1% Feuchtigkeit. 0,2022 g lufttrockenes Polysaccharid (= 0,1853 g wasserfrei) verbrauchten bei der elektrometrischen Titration 4,9 cm³ 0,02-n. NaOH: Äqu.-Gew. 1930.

2. Partialhydrolyse des Polysaccharides und Gewinnung des reinen Bariumaldobionates. 115 g lufttrockenes Polysaccharid wurden mit 1700 cm³ 3-proz. Oxalsäure 20 Std. im Ölbad bei 100° erhitzt. Das hellbraune Hydrolysat wurde von 2,1 g unlöslichem Produkt abfiltriert. Das Filtrat wurde bei 60° mit Bariumcarbonat neutralisiert und das entstandene Bariumoxalat abfiltriert. Das im Vakuum bei 50° auf ca. 60 cm³ eingeeengte Filtrat wurde in die fünffache Menge Äthanol eingegossen. Dabei fiel ein Bariumaldobionat in grossen, grauen Flocken aus. Nach 12 Std. wurde abdekantiert; der Niederschlag wurde abgenutscht, mit Äthanol und Äther gut gewaschen und 24 Std. bei 40° im Vakuum getrocknet. Ausbeute an Rohprodukt 17,2 g.

Das Rohaldobionat wurde in 400 cm³ Wasser von 60° gelöst, die Lösung mit 1 g Aktivkohle behandelt, die Aktivkohle abfiltriert und mit heissem Wasser ausgewaschen. Das fast farblose Filtrat wurde im Vakuum auf 50 cm³ eingeeengt und mit der fünffachen Menge Äthanol versetzt. Es fiel ein rein weisser Niederschlag von Bariumaldobionat aus, der nach 12 Std. abfiltriert, gründlich mit absolutem Alkohol und Äther gewaschen und 48 Std. im Vakuum getrocknet wurde. Wiederholung dieser Umfällung lieferte 16,7 g Bariumaldobionat (15,6% bezogen auf wasserfreies Ausgangspolysaccharid).

12,065; 11,255 mg Substanz gaben 3,456; 3,230 mg BaSO₄
(C₁₁H₁₇O₁₁)₂Ba Ber. Ba 17,43% Gef. Ba 16,90; 16,89%

Die Zusammensetzung entspricht ungefähr der des Bariumsalzes einer Aldobionensäure, aus einer Hexuronsäure und einer Pentose.

$$[\alpha]_D^{22} = \frac{+2,36 \cdot 100}{2 \cdot 1,8942} = +63,3^\circ \text{ (in Wasser)}$$

3. Bestimmung der Zucker des Partialhydrolysates. Das alkoholische Filtrat des Aldobionatniederschlags wurde eingedampft. Aus dem erhaltenen Sirup wurde eine kleine Menge einer 1-proz. Lösung hergestellt, die mit einem Gemisch von Butanol-Äthanol-Wasser (45% : 5% : 49%)²⁾ mit 1% NH₃ an *Whatman*-Papier Nr. 1 bei 20° chromatographiert wurde. Dabei wurden sehr viel D-Xylose (R_F = 0,172), wenig L-Arabinose (R_F = 0,143) und sehr wenig D-Galaktose (R_F = 0,091) identifiziert.

¹⁾ Samen *psyllii* der Firma *AG. vormalis B. Siegfried*, Zofingen (fast ausschliesslich Samen von *Plantago arenaria Waldst. et Kit.*). Wir danken Herrn Prof. Dr. H. Flück, Pharmazeutisches Institut der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich, bestens für die botanische Identifizierung der Droge.

²⁾ S. M. Partridge, *Biochem. J.* **42**, 238 (1948).

4. Bestimmung der Monosaccharidkomponenten der Aldobionsäure. 1 g Bariumaldobionat wurde mit 25 cm³ 4-proz. Schwefelsäure 24 Std. bei 120° im Autoklaven erhitzt. Nach Neutralisation mit Bariumcarbonat wurde filtriert und über Amberlite IR-120 in der H-Form perkoliert. Das Perkolat wurde im Vakuum bei 40° zum Sirup eingedampft und davon eine 1-proz. Lösung hergestellt. Diese wurde mit Butanol-Äthanol-Wassergemisch (45% : 5% : 49%)¹⁾ mit 1% NH₃ bei 20° an *Whatman*-Papier Nr. 1 chromatographiert. Man identifizierte sehr viel D-Xylose ($R_F = 0,170$), wenig D-Galakturonsäure ($R_F = 0,086$) und Spuren von Arabinose ($R_F = 0,146$). Die Hauptmenge der D-Galakturonsäure dürfte bei der Hydrolyse des Aldobionates decarboxyliert worden sein.

2 g Bariumaldobionat wurden in 50 cm³ 1-n. HBr unter Zugabe von 0,5 cm³ Brom gelöst und 20 Std. am Rückfluss gekocht. Portionenweise wurden erneut 0,5 cm³ Brom zugegeben. Daraufhin gab die Lösung nur noch einen schwachen Naphtoresorcinrest auf Uronsäuren und reduzierte *Fehling*'sche Lösung nicht mehr. Zur Entfernung von Brom und HBr wurde bei 60° im Vakuum eingedampft, das verbleibende HBr mit Silbercarbonat neutralisiert und das Silberbromid abfiltriert. Metallionen wurden durch Perkolation über Amberlite IR-120 entfernt. Das Perkolat wurde bei 50° im Vakuum auf 2 cm³ eingengt, mit Schleimsäure angeimpft und bei 0° stehengelassen. Nach 14 Tagen hatten sich 0,150 g Schleimsäure abgeschieden. Nach Umkristallisation aus heissem Wasser Smp. 214–215°, Misch-Smp. mit authentischer Schleimsäure ebenso.

4,195 mg Subst. gaben 5,272 mg CO₂ und 1,809 mg H₂O
 C₆H₁₀O₈ Ber. C 34,29 H 4,80% Gef. C 34,30 H 4,82%

5. Gewinnung des Aldobionsäuremonohydrates. 5 g Bariumaldobionat wurden in 50 cm³ Wasser gelöst und über Amberlite IR-120 in der H-Form perkoliert. Das Perkolat wurde im Vakuum bei 40° auf 5 cm³ eingedampft und bis zur eben auftretenden Opaleszenz mit Aceton versetzt. Nach 3 Wochen Stehen bei 0° waren 2,2 g Aldobionsäure-monohydrat, Smp. 212–214°, auskristallisiert.

3,555 mg Subst. gaben 4,992 mg CO₂ und 1,795 mg H₂O
 0,2503 g Subst. verloren über P₂O₅ bei 80° 0,0128 g
 C₁₁H₁₈O₁₁, H₂O Ber. C 38,37 H 5,85 Krist.-H₂O 5,23%
 Gef. „ 38,32 „ 5,65 „ 5,11%

$$[\alpha]_D^{21} = \frac{+0,270 \cdot 100}{2 \cdot 0,5320} = +67,2^\circ \text{ (in Wasser)}$$

6. Methylierung der Aldobionsäure zum Methylester des Pentamethylmethylaldobionids. In einem Dreihalskolben mit hochtourigem Stahlrührwerk (max. 10000 Touren/min.) wurden 7,5 g Bariumaldobionat in 50 cm³ Wasser gelöst und mit 120 cm³ Dimethylsulfat versetzt. In das durch starkes Rühren gut emulgierte Gemisch wurden bei Zimmertemperatur in 6 Std. 240 cm³ 30-proz. Natronlauge zugetropft. Danach wurde *Fehling*'sche Lösung nicht mehr reduziert. Nach weiterem 6std. Rühren gab man 75 g festes NaOH zu und rührte bis zur völligen Auflösung. Anschliessend wurden in 8 Std. 150 cm³ Dimethylsulfat zugetropft. Nach 12 Std. Stehen wurde unter Rühren $\frac{1}{2}$ Std. auf 100° erhitzt, um unverbrauchtes Dimethylsulfat zu verseifen. Dann wurde mit Eis auf +5° gekühlt und mit konz. Schwefelsäure auf pH 3 angesäuert. Das Bariumsulfat wurde abfiltriert; aus dem Filtrat wurde die partiell methylierte Aldobionsäure mit 6 × 300 cm³ Chloroform extrahiert. Die Chloroformextrakte wurden über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Man erhielt so 4,5 g zähflüssige, gelblich gefärbte, partiell methylierte Aldobionsäure, die erneut in Wasser gelöst und nach Zutropfen von 120 cm³ Dimethylsulfat und 240 cm³ 30-proz. NaOH unter lebhaftem Rühren 6 Std. weiter methyliert wurde. Nach 12 Std. wurde $\frac{1}{2}$ Std. auf 100° erhitzt und, wie oben beschrieben, aufgearbeitet. Die letzten Reste Lösungsmittel wurden im

¹⁾ S. M. Partridge, *Biochem. J.* **42**, 238 (1948).

Vakuum bei 40° entfernt. Der Rückstand, 4,0 g gelber, hochviskoser Sirup, wurde in 50 cm³ Äther gelöst, mit Eis-Kochsalz auf -10° abgekühlt und unter Rühren langsam mit einer tiefgekühlten Lösung von 4,5 g Diazomethan in 200 cm³ Äther versetzt. Nach 10 Std. Stehen bei 0° wurden überschüssiges Diazomethan und Äther im Vakuum bei Zimmertemperatur abdestilliert. Man erhielt 4,0 g des partiell methylierten Aldobionsäure-methylesters.

Dieser wurde zur vollständigen Methylierung noch nach *Purdie* methyliert. 4,0 g Substanz wurden in einem Dreihalskolben mit Rückflusskühler und Rührwerk in 30 cm³ absolutem Methanol gelöst und mit 50 cm³ Methyljodid versetzt. Bei 40–45°, wo das Methyljodid schwach siedet, wurden 75 g Silberoxyd halbstundenweise in 10 Portionen zugefügt. Anschliessend wurde noch eine Std. erwärmt. Nun wurde das AgJ abfiltriert und mit 300 cm³ heissem Methanol gut nachgewaschen. Die Methanollösung wurde eingedampft. Der zurückbleibende Sirup wurde in absolutem Äther gelöst und von mitgegangenen Silbersalzen durch Filtration befreit. Die ätherische Lösung, im Vakuum eingedampft, ergab 3,95 g gelben, hochviskosen Sirup. Die Methylierung wurde viermal wiederholt. Abschliessend wurde nochmals mit Diazomethan verestert. Ausbeute an vollmethylierter Substanz 3,8 g gelblicher Sirup, der im *Claisen*-Kolben im Hochvakuum fraktioniert wurde: 0,9 g (120–160° Badtemp.; 0,2–0,3 mm Hg; $n_D^{20} = 1,4721$) vermutlich monomere Produkte; 2,2 g (195–220° Badtemp.; 0,5 mm Hg; $n_D^{20} = 1,4692$) Methylester des Pentamethyl-methylaldobionids:

3,511 mg Subst. verbrauchten 17,274 cm³ 0,02-n. Na₂S₂O₃
 C₁₈H₃₂O₁₁ (7 OCH₃) Ber. OCH₃ 51,18% Gef. OCH₃ 50,87%

$$[\alpha]_D^{21} = \frac{+4,57 \cdot 100}{2 \cdot 1,82} = +125,5^{\circ}$$

7. Hydrolyse des Methylesters des Pentamethyl-methylaldobionids. 1,82 g permethylierter Aldobionsäure-methylester wurden in 120 cm³ wässriger 7-proz. Salzsäure bei 100° am Rückfluss erwärmt. Die spez. Drehung fiel in 6 Std. auf $[\alpha]_D^{21} = +74,8^{\circ}$, um dann konstant zu bleiben.

Die auf Zimmertemperatur abgekühlte Lösung wurde mit Silbercarbonat neutralisiert. Das entstandene Silberchlorid wurde abzentrifugiert, mehrmals mit Wasser aufgewirbelt, erneut abzentrifugiert und das überstehende Waschwasser abdekantiert. Lösung und Waschwasser wurden vereinigt und durch Schwefelwasserstoff von Silberionen befreit. Der überschüssige Schwefelwasserstoff wurde durch Luft verdrängt und dann das Silbersulfid abfiltriert. Das Filtrat wurde im Vakuum bei 50° auf 50 cm³ eingeeengt und zur Abtrennung der methylierten D-Galakturonsäure mit 1,3 g Bariumcarbonat (kleiner Überschuss) so lange auf 60° erwärmt, bis die Lösung neutral reagierte. Nach Entfernung von überschüssigem Bariumcarbonat wurde im Vakuum bei 50° zur Trockene eingedampft. Aus dem gelblichen Rückstand, bestehend aus Bariumsalz der Dimethyl-D-galakturonsäure und aus Dimethyl-D-Xylose, wurde letztere durch Extraktion mit siedendem absolutem Äther (15 × 100 cm³) abgetrennt. Die eingedampften ätherischen Extrakte ergaben 0,80 g Dimethylxylose als farblosen, dickflüssigen Sirup, $n_D^{21} = 1,4780$, von richtigem Methoxygehalt.

3,094 mg Subst. verbrauchten 10,260 cm³ 0,02-n. Na₂S₂O₃
 C₇H₁₄O₅ Ber. OCH₃ 34,83% Gef. OCH₃ 34,29%

Der Rückstand der ätherischen Extraktion ergab 1,05 g Bariumsalz der methylierten D-Galakturonsäure.

8. Identifizierung der Dimethylxylose als Anilid. 0,4 g (1 Mol.) des Dimethylpentose-Sirups wurden in 20 cm³ Äthanol gelöst, mit 1,7 g Anilin (7 Mol.) versetzt und 3 Std. am Rückfluss gekocht. Anschliessend wurde im Vakuum eingedampft und der Rückstand bei 0° aufbewahrt. Nach einer Woche hatten sich 0,190 g Anilid in langem weissen Nadeln abgeschieden. Überschüssiges Anilin wurde durch Waschen mit absoluten,

Äther entfernt und das Anilid aus Essigester umkristallisiert. Smp. 145° (nach Lit.¹⁾ 146°), Misch-Smp. mit authentischem Anilid der 2,3-Dimethyl-D-xylose ebenso.

3,634 mg Subst. gaben 8,200 mg CO₂ und 2,468 mg H₂O
 3,198 mg Subst. gaben 0,157 cm³ N₂ (22°, 730 mm Hg)
 3,010 mg Subst. verbrauchten 7,269 cm³ 0,02-n. Na₂S₂O₃
 C₁₃H₁₉O₄N Ber. C 61,64 H 7,56 N 5,35 OCH₃ 24,50%
 Gef. „ 61,58 „ 7,60 „ 5,46 „ 24,97%

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{+0,56 \cdot 100}{2 \cdot 0,150} = +187^\circ \text{ (in Essigester; nach Lit.¹) } [\alpha]_D^{22} = +185^\circ$$

9. Identifizierung der Trimethyl-D-galakturonsäure als Methylester von 2,3,4-Trimethyl- α -methyl-D-galakturonosid. Der ätherunlösliche Bariumrückstand (Abschnitt 7) wurde in 20 cm³ Wasser gelöst und über Amberlite IR-120 perkoliert. Das Perkolat, im Vakuum bei 40° eingedampft, ergab 0,9 g einer gelblichen, amorphen Masse, die in 90 cm³ wasserfreiem Methanol mit 1% HCl 6 Std. unter Rückfluss gekocht wurde. Danach wurde mit Silbercarbonat neutralisiert und nach Abfiltration des AgCl im Vakuum eingedampft. Der Rückstand (0,9 g gelblicher Sirup) wurde in Äther aufgenommen, von einer Spur unlöslicher Substanz befreit und auf 2 cm³ eingedampft. Nach Impfung mit einem Kristall des Methylesters von 2,3,4-Trimethyl- α -methyl-D-galakturonosid kristallisierten sofort 0,7 g breite, quadratische Blättchen, die abfiltriert, mit wenig absolutem Äther gewaschen und getrocknet wurden. Einmalige Umkristallisation aus absolutem Äther lieferte 0,5 g vom Smp. 70–71° (Lit.²): 70,2–70,3°).

4,378 mg Subst. gaben 7,990 mg CO₂ und 3,030 mg H₂O
 3,411 mg Subst. verbrauchten 19,280 cm³ 0,02-n. Na₂S₂O₃
 C₁₁H₂₀O₇ Ber. C 49,99 H 7,63 OCH₃ 58,72%
 (5 OCH₃) Gef. „ 49,80 „ 7,74 „ 58,45%

$$[\alpha]_D^{21} = \frac{+4,46 \cdot 100}{2 \cdot 1,50} = +148,6^\circ \text{ (in Aceton; nach Lit.²) } [\alpha]_D^{27} = +149,3^\circ$$

Die Mikroanalysen wurden von Herrn A. Peisker, Mikroanalytisches Laboratorium, Brugg, ausgeführt. — Die vorliegende Arbeit wurde durch Mittel des *Arbeitsbeschäftigungskredit des Bundes* ermöglicht. Wir danken bestens für diese Unterstützung.

Zusammenfassung.

Aus dem uronsäurehaltigen Polysaccharid der Samen von *Plantago arenaria* Waldst. et Kit. wurde eine Aldobionsäure, und zwar 4- α -D-Galakturonopyranosid-D-xylopyranose, isoliert.

Agrikulturchemisches Institut
 der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

¹⁾ H. A. Hampton, W. N. Haworth & E. L. Hirst, Soc. 1929, 1739.

²⁾ P. A. Levene & L. C. Kreider, J. Biol. Chem. 120, 597 (1937); R. S. Tipson & L. C. Kreider, J. Biol. Chem. 122, 199 (1937/38).