

95. Zur säurekatalysierten Reaktion von Galakturonsäure mit Methanol

I. α - und β -Methyl-D-Galakturonofuranosid-methylester

von H. W. H. Schmidt und H. Neukom

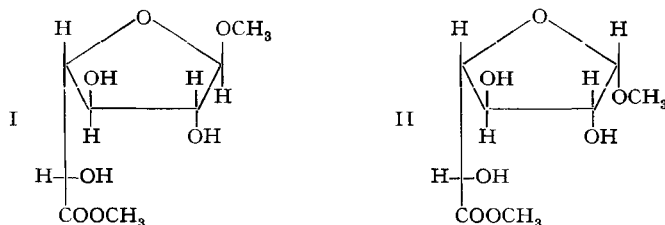
(10. III. 64)

Beim Kochen von D-Galakturonsäure oder Citruspektin mit methanolischer Salzsäure unter Rückfluss [1]¹⁾ konnten bis zu 55% kristalline Methyl-D-galakturonosid-methylester isoliert werden [2] [3], die mit ähnlicher Ausbeute auch aus dem Kaliumsalz der Diaceton-D-galakturonsäure erhalten wurden [4]. Die Pyranosidstruktur dieser kristallinen Produkte, die zum überwiegenden Teil aus dem α -Isomeren bestanden, wurde auf chemischem Weg bewiesen [5]. Als Nebenprodukt der Methanolbehandlung verbleibt ein Sirup, von dem schon früher [2] vermutet wurde, dass er Galakturonofuranoside enthalte. Bisher sind jedoch nur methylierte Galakturonsäurederivate mit furanoider Struktur beschrieben worden [6].

Wie wir jetzt fanden, besteht dieser Restsirup zu ca. 90% aus den beiden Methyl-D-galakturonofuranosid-methylestern.

Die Dünnschichtchromatographie dieses Sirups zeigte drei Flecke. Der unterste verhielt sich wie Methyl-D-galakturonopyranosid-methylester (Mischung von α - und β -Form, deren fast gleiche Laufgeschwindigkeiten keine chromatographische Trennung erlauben). Alle drei Flecke reagierten mit Hydroxylamin-Ferrichlorid, aber nicht mit ammoniakalischem Silbernitrat und Anilin-Xylose [7]. Die beiden unbekannten Substanzen müssen also geschützte Aldehydgruppen aufweisen, und es muss sich um Ester oder Lactone handeln.

Der Sirup wurde an einer Kieselgel-Kolonne fraktioniert. Die dünn-schichtchromatographisch reine Kopffraktion (I) ergab nach dem Eindampfen einen farblosen, nicht kristallisierbaren Sirup. Das IR.-Spektrum wies eine Bande bei 1736 cm^{-1} für Ester oder δ -Lactone auf. Im NMR.-Spektrum fanden sich zwei Methylgruppen-Signale für $-\text{OCH}_3$ und $-\text{COOCH}_3$. Das H_1 -Signal erschien als Singlett. I gab ein gut kristallisierendes Triacetat. Die zweite Verbindung (II), Nadeln von Smp. $64\text{--}67^\circ$, ergab ein NMR.-Spektrum mit zwei Signalen für die beiden Methylgruppen, während das H_1 -Signal als Dublett erschien; II lieferte ein gut kristallisierendes Amid. Im Hydrolysat von I wie von II konnte papierchromatographisch nur Galakturonsäure



¹⁾ Die Ziffern in eckigen Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis, Seite 869.

festgestellt werden. Es muss sich also um Galakturonsäurederivate handeln, und zwar um die α - β -Isomeren des Methyl-D-galakturonofuranosid-methylesters (I und II). Die Zuordnung von α und β ergab sich aus der negativen spezifischen Drehung ($[\alpha]_D^{24} = -107,3^\circ$) der Kopffraktion I und der Tatsache, dass diese im NMR-Spektrum für das anomere Proton ein Singlett aufweist, während im Spektrum der kristallinen Verbindung II das H_1 -Signal in ein Dublett gespalten ist mit einer Kuppelungskonstanten, die auch in den Spektren anderer furanosider Zucker mit *cis*-ständigen Protonen am C-1 und C-2 gefunden wurde [8].

Das Ergebnis der Reduktion der Estergruppe mit $LiAlH_4$ bestätigte die Ringstruktur und diese Zuordnung. Die Reduktionsprodukte verhielten sich papier- und dünnschichtchromatographisch wie die Methyl-D-galaktofuranoside, die nach [9] hergestellt wurden. Das Reduktionsprodukt von I verhielt sich wie β -Methyl-D-galaktofuranosid, das von II wie das entsprechende α -Isomere.

Zur Verfolgung der Reaktion von Galakturonsäure mit Methanol-Salzsäure wurden nach 8, 16 und 27 Std. Reaktionszeit aus dem erhaltenen Sirup die Pyranoside durch Kristallisation aus Methanol-Äthylacetat und Äthylacetat weitgehend entfernt. Der Restsirup wurde dünnschichtchromatographisch analysiert. Das Verhältnis von α - zu β -Furanosid war in allen Ansätzen 1:3. Die Gesamtausbeute an Pyranosiden schwankte jedoch zwischen 38 und 52% der Rohausbeute und stieg mit zunehmender Reaktionszeit. Nach 27 Stunden scheint demnach unter den gewählten Bedingungen das Gleichgewicht zwischen Pyranosiden und Furanosiden noch nicht erreicht zu sein, während sich offenbar das Gleichgewicht zwischen den beiden Furanosiden viel schneller einstellt. Wird α -Pyranosid unter gleichen Bedingungen mit Methanol behandelt, so bilden sich wieder Furanoside. Umgekehrt wird durch 16-std. Kochen eines Restsirups mit 2-proz. methanolischer Salzsäure der Pyranosidgehalt z.B. von 6,7% (neben 93,3% Furanosiden) auf 53,3% erhöht. Demnach können die Ausbeuten an Pyranosiden durch zweimalige Wiederholung der Methanolbehandlung des Restsirups (nach jeweiliger Entfernung der Pyranoside) auf 90% gesteigert werden.

Nach vorläufigen Untersuchungen über die säurekatalysierte Reaktion von Galakturonsäure mit Methanol bildet sich zuerst der Ester der Galakturonsäure [10]. Dieser wird dann bevorzugt zu Furanosiden glykosidiert, wobei im Anfang das α -Furanosid, im weiteren Verlauf das β -Furanosid vorherrscht (Anomerisation). Die Furanoside lagern sich dann in die Pyranoside um, die sich dann ebenfalls anomerisieren. Ähnliche Verhältnisse wurden kürzlich bei entsprechenden Untersuchungen an Pentosen gefunden [11]. -- Über die Untersuchung des Ablaufes der Reaktion von Galakturonsäure mit Methanol unter verschiedenen Bedingungen wird in einer späteren Arbeit berichtet werden.

Experimentelles. - Alle Smp. sind korrigiert.

Materialien und Methoden. D-Galakturonsäure war ein Handelsprodukt (MOSTEREI MÄRWIL)²⁾, umkristallisiert aus 95-proz. Äthanol, Smp.: 158–159°. Die α - und β -Methyl-D-galaktofuranoside wurden nach [9] hergestellt.

Alle Lösungsmittel und flüssigen Reagentien wurden vor dem Gebrauch destilliert. Methanol wurde durch Destillation über Magnesium vorgetrocknet und vor dem Gebrauch nochmals über Natrium destilliert.

²⁾ Herrn Dr. A. GROB danken wir für die Überlassung einer grösseren Menge Galakturonsäure.

Papierchromatographie. WHATMAN-Papier Nr. 1, absteigend, Laufmittel a) für Uronsäuren [12]: Äthylacetat/Pyridin/Eisessig/Wasser (5:5:1:3 *v/v*); b) für Methyl-galaktofuranoside [9]: Äthylacetat/*n*-Propanol/Wasser (5:3:2 *v/v*). Sprühmittel [7]: Anilin-Phtalsäure, Hydroxylamin-Ferrichlorid, ammoniakalisches Silbernitrat.

Dünnschichtchromatographie. Nach STAHL [13] mit Kieselgel G (MERCK), Schichtdicke ca. 250 μ . Laufmittel: c) Äthylacetat/Eisessig/Ameisensäure/Wasser (18:4:1:3 *v/v*); d) Äthylacetat. Sprühmittel: Äthanol/konz. Schwefelsäure (95:5 *v/v*), sowie die oben angegebenen (ausser Anilin-Phtalsäure).

Die NMR.-Spektren wurden mit einem Spektrometer VARIAN A 60 (60 MHz) in CDCl_3 mit Tetramethylsilan als internem Standard, das IR.-Spektrum mit einem PERKIN-ELMER-Spektrographen Typ 21 aufgenommen.

Umsatz von D-Galakturonsäure mit methanolischer Salzsäure. 30–50 g D-Galakturonsäure (im Hochvakuum 2 Tage bei Zimmertemperatur über P_2O_5 getrocknet) wurden mit 250 ml 1-proz. oder 2-proz. methanolischer Salzsäure 8, 16 und 27 Std. unter Rückfluss gekocht. Zur Neutralisation wurde die Lösung durch eine Kolonne aus Dowex-3 (OH-Form) perkoliert bis sie chloridfrei war. Dann wurde sie im Vakuum bei 50° zu einem gelben Sirup eingedampft. Der Sirup (Ausbeute 80–85% d. Th.) wurde in möglichst wenig heissem abs. Methanol aufgenommen. Nach dem Erkalten kristallisierte der α -Methyl-D-galakturonopyranosid-methylester aus (Smp. 145–146°; nach Umkristallisation aus abs. Methanol Smp. 148°). Aus der Mutterlauge konnte durch Zusatz steigender Mengen Äthylacetat weiterer kristalliner Methyl-D-galakturonopyranosid-methylester (α - und β - Isomere) isoliert werden; Ausbeute insgesamt 30–45%, bezogen auf das Rohprodukt.

Die Dünnschichtchromatographie des Restsirups ergab drei Flecke (A, B und C); Rf-Werte in Laufmittel c) (10 cm Laufstrecke): A 0,62–0,65; B 0,54–0,57; C 0,37–0,40. Die Rf-Werte von α - bzw. β -Methyl-D-galakturonopyranosid-methylester (C) betrugen 0,38–0,40 bzw. 0,37–0,39.

Fraktionierung des Restsirups. 1,22 g Restsirup wurden in ca. 20 ml Äthylacetat aufgenommen und auf eine Kieselgel-Kolonne (35 $\times$ 3,2 cm; Kieselgel für die Chromatographie 0,02–0,5 mm, MERCK) aufgebracht. Es wurde mit Äthylacetat eluiert (Tropfgeschwindigkeit 0,5 ml/Min.). Mit einem Fraktionensammler wurden 300 Fraktionen zu ca. 5 ml aufgefangen. Die Fraktionen 73–140 enthielten die Verbindung I (Fleck A), die dünn-schichtchromatographisch rein war. Die Zwischenfraktionen 141–170 enthielten I und II im Verhältnis von ca. 1:1. Die Fraktionen 171–300 enthielten II (Fleck B), verunreinigt mit Spuren von I. Nach dem Eindampfen unter vermindertem Druck bei 50° blieben in allen drei Fraktionsgruppen schwach gelb gefärbte Sirupe zurück (Kopffraktion 639 mg, Zwischenfraktion 66 mg, Schlussfraktion 159 mg).

Hydrolyse. Je 30–50 mg der Kopf- und der Zwischenfraktion wurden in 3–5 ml 0,2N Salpetersäure 8 Std. bei 100° im Bombenrohr hydrolysiert. Nach dem Erkalten wurden die Hydrolysate mit verdünnter Natronlauge neutralisiert und direkt im Laufmittel a) papierchromatographisch untersucht; sie zeigten jedoch nur einen Fleck, der sich wie D-Galakturonsäure verhielt. Beim Kochen der Hydrolysate mit Bleiessig fiel ein ziegelroter Niederschlag aus (Test auf Galakturonsäure [14]).

Reduktion. Je 30–50 mg der Kopf- und der Zwischenfraktion wurden in 5 ml Tetrahydrofuran gelöst und die Lösungen unter Rühren zu einer Lösung von 40 mg LiAlH_4 in 5 ml Tetrahydrofuran bei Zimmertemperatur getropft. Nach 2 Std. wurde das überschüssige LiAlH_4 mit Wasser zersetzt, filtriert und das Filtrat mit Ameisensäure neutralisiert. Nach dem Eindampfen im Vakuum bei 50° wurden die Sirupe in Methanol aufgenommen und direkt papier- und dünn-schichtchromatographisch untersucht. Das Reduktionsprodukt der Kopffraktion (I) verhielt sich wie β -Methyl-D-galaktofuranosid, dasjenige der Zwischenfraktion (I und II) wie ein Gemisch aus α - und β -Methyl-D-galaktofuranosid.

β -Methyl-D-galakturonofuranosid-methylester (I). Der Sirup der Kopffraktion wurde in abs. Methanol in der Wärme aufgenommen, mit Aktivkohle behandelt und durch Celite filtriert. Der nach dem Eindampfen unter vermindertem Druck verbleibende farblose Sirup wurde in wenig heissem Äthylacetat aufgenommen und mit Heptan bis zur Trübung versetzt. Aus der Lösung schied sich I wieder als farbloser Sirup ab. Beim Versuch, diesen im Sublimierrohr zu destillieren, trat teilweise Zersetzung ein. Ein bei ca. 150°/0,01 Torr übergehender Sirup erwies sich dünn-schichtchromatographisch als uneinheitlich. Der aus Äthylacetat-Heptan abgeschiedene Sirup wurde drei Tage bei Zimmertemperatur über P_2O_5 im Hochvakuum getrocknet. $n_D^{25} = 1,4799$,

$[\alpha]_D^{24} = -107,3^\circ$ ($c = 0,900$ in abs. Methanol). NMR.-Spektrum: drei gut aufgelöste Signale bei $\delta = 3,39$ ($-\text{OCH}_3$), $\delta = 3,86$ ($-\text{COOCH}_3$) und $\delta = 4,90$ ppm (H_1 , Singlett).

$\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_7$ Ber. C 43,25% H 6,35% Gef. C 43,64% H 6,54%

α -Methyl-D-galakturonofuranosid-methylester (II). Der Sirup der Schlussfraktion wurde wie oben beschrieben behandelt. Aus der Äthylacetat-Heptan-Lösung kristallisierte II in Nadeln aus; nach zweimaliger Umkristallisation aus dem genannten Lösungsmittelgemisch und dreitägigem Trocknen über P_2O_5 im Hochvakuum Smp. $64-67^\circ$. NMR.-Spektrum: drei gut aufgelöste Signale bei $\delta = 3,47$ ($-\text{OCH}_3$), $\delta = 3,84$ ($-\text{COOCH}_3$) und $\delta = 4,78$ ppm (H_1 , Dublett mit $J = 3,8$ cps).

Amide von I bzw. II. Je ca. 100 mg von I und II, in 5 ml abs. Methanol gelöst, wurden unter Kühlung im Eisbad mit je 15 ml einer gekühlten, gesättigten Lösung von Ammoniak in abs. Methanol versetzt. Das Ganze wurde bei $+2^\circ$ 48 Std. unter Feuchtigkeitsausschluss stehengelassen. Nach dem Einengen im Vakuum blieb jeweils ein gelblicher Sirup zurück, der in abs. Methanol mit Aktivkohle behandelt und zu einem farblosen Sirup eingedampft wurde. Das Amid von I, das dünn-schichtchromatographisch rein war (Rf-Wert 0,47–0,48, Laufmittel c), liess sich nicht kristallisieren. Das Amid von II (Rf-Wert 0,40–0,41) kristallisierte in Nadeln drusenförmig aus heisser Äthylacetatlösung. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Äthylacetat und Trocknung während 48 Std. über P_2O_5 im Hochvakuum Smp. 151° . $[\alpha]_D^{52} = +21,2^\circ$ ($c = 0,892$ in abs. Methanol).

$\text{C}_7\text{H}_{13}\text{O}_6\text{N}$ Ber. C 40,58% H 6,32% N 6,76% Gef. C 40,61% H 6,28% N 6,79%

β -Methyl-2,3,5-tri-O-acetyl-D-galakturonofuranosid-methylester. Die Lösung von 213 mg I in 5 ml abs. Pyridin wurde unter Rühren in einem Eisbad tropfenweise mit der Lösung von 0,6 g über Marmor destilliertem Acetanhydrid (100% Überschuss) in 5 ml abs. Pyridin innert 15 Min. versetzt. Es wurde 10 Min. weiter unter Eiskühlung, dann 35 Min. bei Zimmertemperatur gerührt. Das Reaktionsgut wurde auf Eis gegossen und dreimal mit je 25 ml Äther extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und zu einem dünnflüssigen gelben Sirup eingedampft. Nach Klärung der in Petroläther aufgenommenen Verbindung mit Aktivkohle kristallisierte das Acetat in feinen Nadeln aus, Smp. nach dreimaliger Umkristallisation aus Petroläther $68,5-69^\circ$. $[\alpha]_D^{24} = -79,9^\circ$ ($c = 1,599$ in abs. Methanol).

$\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$ Ber. C 48,27% H 5,79% Gef. C 48,44% H 5,62%

Quantitative Dünnschichtchromatographie. Die Restsirupe wurden in methanolischer Lösung streifenförmig auf der Startlinie von Kieselgel-G-Dünnschichtplatten (10 cm Breite) aufgetragen und mit Äthylacetat als Laufmittel chromatographiert (Laufstrecke 15 cm). Die bei 110° getrockneten Chromatogramme wurden mit einer Polyäthylenfolie so abgedeckt, dass an den Rändern und in der Mitte des Chromatogramms je ein 1 cm breiter Streifen frei blieb. Durch Sprühen mit Äthanol-Schwefelsäure und Erhitzen auf 110° wurden die Flecke auf den Rand- und Mittelstreifen lokalisiert. Entsprechend der Lage der Flecke wurden mit dem Spatel gleich grosse Felder (ca. $1 \times 3,2$ cm) der nicht entwickelten Schicht und vom oberen Teil gleich grosse Schichtflächen als Blindproben von den Platten abgekratzt. Die Proben wurden einzeln in Reagenzgläsern mit 3 ml destilliertem Wasser extrahiert und die Extrakte filtriert. In den Filtraten wurden die Substanzen mit Carbazol kolorimetrisch bestimmt [19].

Gefundene Zusammensetzung der Restsirupe: Pyranoside 7–18%, α -Furanoside 21–24%, β -Furanoside 61–69%; Verhältnis von α - zu β -Furanosiden jedesmal = 1:3.

Die Elementaranalysen wurden in der mikroanalytischen Abteilung des organisch-chemischen Laboratoriums der ETH (Leitung W. MANSER) ausgeführt.

ZUSAMMENFASSUNG

Neben den bisher nach Behandlung von D-Galakturonsäure mit methanolischer Salzsäure in der Wärme gefundenen α - und β -Methyl-D-galakturonopyranosid-methylestern entstehen grössere Mengen von α - und von β -Methyl-D-galakturonofuranosid-methylester im konstanten Verhältnis von 1:3.

Agrikulturchemisches Institut
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] E. FISCHER, Ber. deutsch. chem. Ges. *28*, 1145 (1895).
- [2] F. EHRLICH & R. GUTTMANN, Ber. deutsch. chem. Ges. *66*, 220 (1933).
- [3] S. MORELL & K. P. LINK, J. biol. Chemistry *100*, 385 (1933); J. K. N. JONES & M. STACEY, J. chem. Soc. *1947*, 1340.
- [4] C. NIEMANN & K. P. LINK, J. biol. Chemistry *104*, 195 (1934).
- [5] P. A. LEVENE & L. C. KREIDER, J. biol. Chemistry *120*, 597 (1937).
- [6] S. LUCKETT & F. SMITH, J. chem. Soc. *1940*, 1106, 1114, 1506; H. G. WALKER, M. GEE & R. M. MCCREADY, J. org. Chemistry *27*, 2100 (1962); H. G. WALKER & R. M. MCCREADY, Canad. J. Chemistry *41*, 3133 (1963).
- [7] J. M. HAIS & K. MACEK, Handbuch der Papierchromatographie, Bd. 1, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1958.
- [8] R. J. ABRAHAM, L. D. HALL, L. HOUGH & K. A. McLAUCHLAN, J. chem. Soc. *1962*, 3699; L. D. HALL, Chemistry & Ind. *1963*, 950.
- [9] J. AUGESTAD & E. BERNER, Acta chem. scand. *8*, 251 (1954).
- [10] E. F. JANSEN & R. JANG, J. Amer. chem. Soc. *68*, 1475 (1946).
- [11] C. T. BISHOP & F. P. COOPER, Canad. J. Chemistry *40*, 224 (1962); *41*, 2743 (1963); siehe dort auch für weitere Literatur.
- [12] F. G. FISCHER & H. DÖRFEL, Z. physiol. Chem. *301*, 224 (1953).
- [13] E. STAHL, Dünnschichtchromatographie, Springer-Verlag, Berlin 1962.
- [14] F. EHRLICH, Ber. deutsch. chem. Ges. *65*, 352 (1932).
- [15] E. A. McCOMB & R. M. MCCREADY, Analyt. Chemistry *24*, 1630 (1952).

**96. Dosage ampérométrique rapide, en une seule opération
et sans séparation, du calcium et du magnésium
dans le sérum sanguin et dans l'urine**

par **D. Monnier** et **A. Rouèche**

(13 III 64)

La plupart des méthodes de dosage du calcium et du magnésium dans le sérum sanguin et dans l'urine sont basées sur la complexométrie à l'acide éthylènediamine-tétracétique avec mise en évidence des points équivalents au moyen d'indicateurs métalliques [1]¹⁾. Pour le calcium seul on utilise des méthodes spectrophotométriques [2] ou la spectrophotométrie de flamme [3]. Dans presque tous les dosages calcium-magnésium ce dernier est obtenu par différence. Dans certains cas pourtant on le sépare des autres éléments avant le dosage.

Principe de la méthode: l'importance pratique de ce dosage nous a incités à mettre au point une méthode rapide et directe permettant de déterminer successivement, en un seul titrage et sans séparation, le calcium puis le magnésium. Elle consiste à doser en milieu alcalin et en présence du tampon éthanolamine $10^{-1}M$, le calcium par l'ion éthylèneglycol-bis-(amino-2-éthyléther)-N,N'-tétracétate (EGTA), et le magnésium, par l'ion éthylènediamine-tétracétate (EDTA). La détermination ampérométrique des points équivalents est basée sur l'apparition du courant d'oxydation du mercure en présence d'un excès d'EGTA (fin du titrage du calcium) ou d'un excès d'EDTA (fin du

¹⁾ Les chiffres entre crochets renvoient à la bibliographie, page 873.