

Synthese «gepaarter Glukuronsäuren».¹⁾

VIII. Mitteilung über Glukuronsäure.

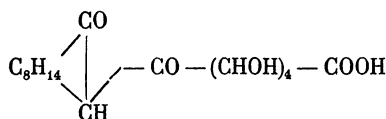
Von

Carl Neuberg und Wilhelm Neimann.

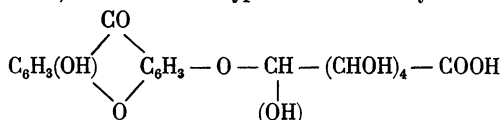
(Aus dem chemischen Laboratorium des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 10. Februar 1905.)

Wo immer in der Natur die Glukuronsäure vorkommen mag, sie findet sich primär niemals als freie Säure oder deren Salz, sondern stets in gebundener Form als «gepaarte Glukuronsäure». Wie diese Paarung zustande kommt und welcher Art die Bindung ist, weiß man bisher nicht mit Sicherheit. Schmiedeberg und Hans Meyer²⁾ haben für die gepaarten Glukuronsäuren, speziell für die Kampher-Glukuronsäure, eine Formulierung



vorgeschlagen, nach welcher eine Karbonylgruppe die Bindung von Glukuronsäure und Paarling besorgt. Später hat Graebe³⁾ die Anschauung vertreten, daß die Euxanthon-Glukuronsäure (Euxanthinsäure) nach dem Typus der Aldehydalkoholate



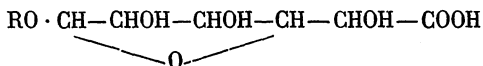
konstituiert sei.

¹⁾ Vorgetragen auf der 74. Versammlung deutscher Naturforscher und Ärzte zu Karlsbad am 23. September 1902. Vergl. Verhandl. S. 60.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. III, S. 445 (1879).

³⁾ Annalen der Chemie, Bd. CCLIV, S. 278 (1889).

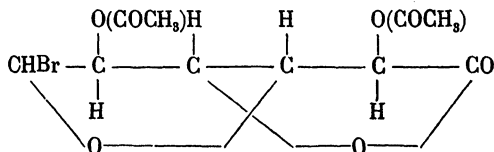
Nach der jetzt allgemein angenommenen Hypothese von Fischer und Piloty¹⁾ entstehen die gepaarten Glukuronsäuren im Organismus aus Glukosiden des Traubenzuckers, derart, daß die endständige Alkoholgruppe in den Karboxylrest übergeht. Nachdem durch Fischer und seine Schüler die Konstitution dieser Glukoside aufgeklärt ist, liegt es nahe, den gepaarten Glukuronsäuren entsprechende Formeln zuzuerteilen. Daß in der Tat diese Substanzen nach dem Glykosidtypus



gebaut sind, konnte durch die folgenden von uns ausgeführten Synthesen bewiesen werden.

Die Methoden der Glukosidbereitung haben gerade in den letzten Jahren große Vervollkommnung erfahren. Wir bedienen uns des alten Michaelischen²⁾ Prinzips, welches die Umsetzung zwischen Acetohalogenzuckern und Alkoholaten zur Grundlage hat; dabei konnte die Erfahrung von Königs und Knorr³⁾ verwertet werden, daß Acetylbromid dem Chloracetyl für die Darstellung von Acetohalogenkohlehydraten überlegen ist.

Mit dem von uns aus kristallisiertem Glukuronsäurelaktone und Acetylbromid erhaltenen Diacetylbromglukuronsäurelaktone



konnten wir die künstliche Darstellung dreier gepaarter Glukuronsäuren ausführen, die der Phenolglukuronsäure, Isoeuxanthinsäure und Euxanthinsäure. Letztere fügt sich zusammen aus Glukuronsäure und Euxanthon, welches nach der Synthese von Graebe⁴⁾ aus Hydrochinonkarbonsäure und β -Resorcyssäure 3-7-Oxyketodiphenylenoxyd ist.

¹⁾ Annalen der Chemie, Bd. CCCXVIII, S. 347 (1901).

²⁾ American Chem. Journal, Bd. I, S. 305 (1879)
American Chem. Journal, Bd. VI, S. 336 (1885).

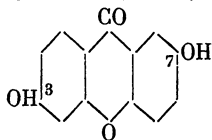
³⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXXIV, S. 957 (1901).

⁴⁾ Annalen der Chemie, Bd. CCLIV, S. 278.

Bei der Einwirkung von Euxanthon, Kaliummethylat und Acetobromglukuronsäurelaktan aufeinander entstanden bei Verarbeitung des Rohproduktes zwei Säuren, welche in gebundener Form Glukuronsäure enthielten und durch ihre verschiedene Löslichkeit leicht getrennt werden konnten. Die eine erwies sich in allen Eigenschaften als identisch mit der natürlichen Euxanthinsäure, während die andere ein minderes Drehungsvermögen und andere Kristallform sowie abweichendes chemisches Verhalten zeigte. Die Annahme, daß hier stereoisomere Substanzen vorlägen, die im Verhältnis von α - und β -Methylglukosid ständen, war von vornherein unwahrscheinlich, da die Acetobromverbindung eine einheitliche Substanz ist, und auch die analoge Synthese der Acetohalogenzucker stets nur zu einem der beiden möglichen Isomeren führt. Ungezwungen erklärt sich die Existenz zweier gepaarter Glukuronsäuren des Euxanthon durch den unsymmetrischen Bau des Euxanthonmoleküls.

Da dieses nach Graebes erwähnten Ermittlungen¹⁾

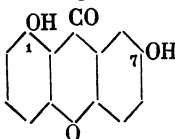
3-7-Oxyketodiphenylenoxyd



ist, müssen zwei verschiedene Säuren entstehen, je nachdem die Hydroxylgruppe in Stellung 3 oder 7 in Paarung mit der Glukuronsäure tritt. Ein Argument für diese Auffassung der beiden Säuren und zugleich ein weiterer Beweis für die glukosidartige Natur der gepaarten Glukuronsäuren bietet ihr Verhalten zu Enzymen.

Während die beiden vom Euxanthon derivierenden synthetischen Säuren unempfindlich gegen Hefenmaltase sind, werden sie beide von Emulsin und Kefirlaktase angegriffen,

¹⁾ Nach v. Kostanecki und Neßler (Ber., Bd. XXIV, S. 3983) kommt dem Euxanthin möglicherweise die Formel des 1-7-Oxyketo-

diphenylenoxyds  zu, die gleichfalls unsymmetrisch ist.

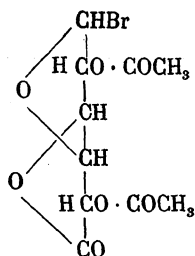
wenn auch die Spaltung — ähnlich wie bei einigen Glukosiden, z. B. beim Coniferin — nur langsam und unvollständig vor sich geht. Ein solches Verhalten zeigen nun niemals zwei einander entsprechende α - und β -Glukoside. Da Emulsin nach Emil Fischers Ermittlungen geradezu ein Reagens auf β -Glukoside ist, müssen beide Säuren, die synthetische Euxanthinsäure und ihr Isomeres, welches Isoeuxanthinsäure benannt sei, als β -Glukoside angesprochen werden.

Das gleiche Verhalten gegenüber Enzymen, Unempfindlichkeit gegen Maltase und Spaltbarkeit durch Kefirlaktase und Emulsin, zeigt auch die natürliche Euxanthinsäure. Übrigens ist das Verhalten der gepaarten Glukuronsäuren zu Fermenten bisher nicht Gegenstand der Untersuchung gewesen, und eine weitere Verfolgung dieser Versuche wird vielleicht instande sein, über den Ort und das Zustandekommen der physiologischen Glukuronsäurepaarung wichtige Aufschlüsse zu geben.

Die analoge Synthese der Phenolglukuronsäure aus Phenolkalium und Acetobromglukuronsäurelaktone führt in Übereinstimmung mit der Theorie nur zu einer Verbindung, die vermutlich mit dem Naturprodukte identisch ist. Da die Angaben über das letztere jedoch ziemlich ungenau sind, kann nur durch einen direkten Vergleich die Frage nach ihrer Identität entschieden werden.¹⁾

Experimenteller Teil.

a) Diacetylbromglukuronsäurelaktone.



3 g bei 100° im Vacuum getrocknetes Glukuronsäurelaktone werden in einem mit Rückflußkühler und Chlorcalcium-

¹⁾ Hierüber wird demnächst berichtet werden.

rohr versehenen, absolut trockenen Kolben mit 12 g Acetyl-
bromid übergossen. Alsbald tritt zumeist von selbst die Reaktion
ein, welche man auch durch schwaches Erwärmen einleiten
kann. Nach Verlauf von 40—50 Minuten ist in der Regel
alles gelöst; man gießt dann die braun gefärbte Flüssigkeit in
viel kaltes Wasser und schüttelt die neue Verbindung mit
 $\frac{3}{4}$ kg Äther heraus. Der mehrfach mit reinem Wasser ge-
waschene Ätherauszug wird dann 6—10 Stunden über geglühtem
Glaubersalz getrocknet und abdestilliert. Zunächst hinterbleibt
ein schwach gefärbtes Öl, welches dann beim Abkühlen erstarrt.
Aus der Lösung in warmem Äther scheidet sich auf Zusatz
von Ligroin die Substanz in feinen weißen Nadelchen vom
Schmelzpunkt 90° (korr.) aus.

Über Natronkalk und konzentrierter Schwefelsäure auf-
bewahrt, bleibt die Substanz mehrere Tage beständig, während
sich ihre Lösungen in organischen Solventien nach einiger Zeit
unter Dunkelfärbung zersetzen; schneller erfolgt der Zerfall in
wässriger Lösung, in der sich bald Bromwasserstoff und Essig-
säure neben freier Glukuronsäure bilden. Die Substanz ver-
hält sich in dieser Beziehung also ganz wie die Acetohalogen-
zucker.

Die Ausbeute, die an reinem Produkt nur 13% beträgt,
läßt sich auf keine Weise erhöhen; die Vorsichtsmaßregeln
indessen (dauernde Rotation der reagierenden Produkte unter
Lichtabschluß und fortgesetzte Kühlung), die Königs und Knorr
für die analoge Bereitung der Acetobromglukose angegeben
haben, sind hier überflüssig. Dagegen können bis 15 g der
Glukuronsäure auf einmal verarbeitet werden.

Die Verbindung löst sich leicht in Alkohol, Äther und
Essigäther, wenig in aromatischen Kohlenwasserstoffen und
nicht in Ligroin. Im Gegensatz zu freier Glukuronsäure reduziert
die Substanz Fehlingsche Lösung nicht in der Kälte, sondern
erst nach einigem Kochen.

0,2982 g Substanz verbr. 9,7 ccm $\frac{1}{10}$ n-AgNO₃ = 0,0776 g Br.

0,1533 „ „ : 0,2112 g CO₂ und 0,0496 g H₂O

C₁₀H₁₄O₇Br

Berechnet: Br = 24,76; C = 37,15; H = 3,40%

Gefunden : Br = 24,90; C = 37,40; H = 3,62%

dem er sich unter Zurücklaug von wenig unverändertem Euxanthon löst. Durch Schefelsäure wird wieder ein voluminöser Niederschlag gefällt, er, nochmals derselben Umfällung unterworfen, nunmehr kristallisch und absaugbar wird. Nach zweimaliger Kristallisation an Alkohol von 60% bildet der Körper hellgelbe verfilzte Nälchen.

Diese Substanz gleicht ihren Löslichkeitsverhältnissen ganz der vorher beschriebenen, sie unterscheidet sich von ihr nur durch ihr geringeres Dringungsvermögen, sowie durch den Mindergehalt eines Moleküls Kristallwasser.

F. 1—159°.

0,2103 g Substanz: 0,40 g CO₂ und 0,0759 g H₂O

C₁₈O₁₀

Berechnet: C = 56,44; H = 3,96%

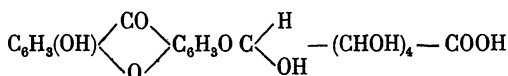
Gefunden: C = 56,41; H = 4,02%

0,1474 g Substanz, in 24,0 cc Alkohol von 70% gelöst, zeigten

[α]_D = -87,4°

(α = -32'; = 0,613; l = 1).

Wie bereits in der Eileitung erwähnt, hat Graebe¹⁾ für die Euxanthinsäure die Formel C₁₉H₁₈O₁₁ =

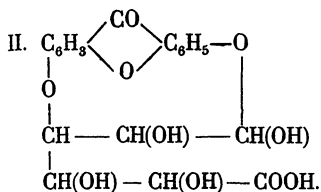
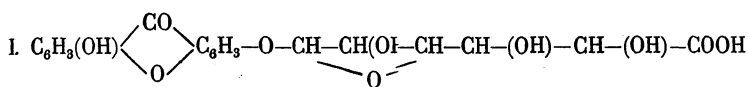


aufgestellt. Diese Verhältnisse führen jedoch eine Komplikation durch die Beobachtung, daß ein Silbersalz der Euxanthinsäure, sowie deren Ester sich von der Formel ableiten, die um ein Molekül wasserärmer ist also dem Typus C₁₉H₁₅O₁₀ · R entsprechen.

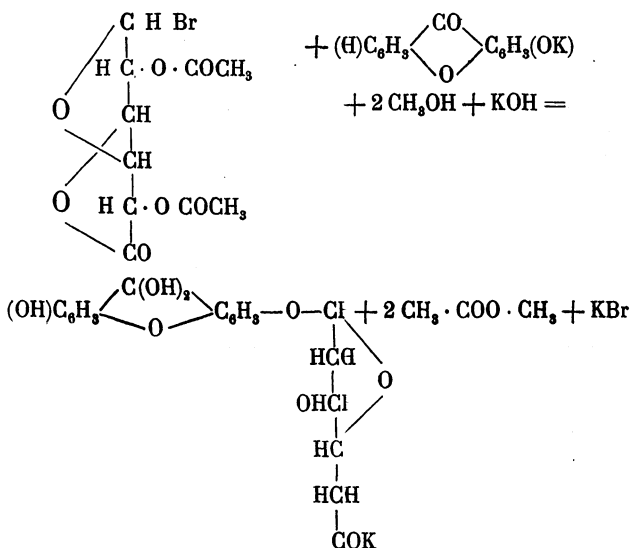
Zur Erklärung dieser Tatsache haben nun vor einiger Zeit Graebe, Aders und Heyer die Annahme gemacht, daß die letztgenannten Verbindungen sich von einer Säure herleiten, die durch innere Anhydridbildung aus der oben angenommenen hervorgeht, und sie schreiben diesen inneren Äthern eine der folgenden Konstitutionen zu:

¹⁾ Annalen der Chemie, BCCCLIV, S. 278 (1889).

²⁾ Annalen der Chemie, BCCCXVIII, S. 347 (1901).



Allein die große Analogie, welche die soeben mitgeteilte Synthese der Euxanthinsäure mit der Michaelischen Glukosidsynthese hat, macht es wahrscheinlich, daß die Konstitution der Euxanthinsäureverbindungen anders zu formulieren ist. Die Entstehung einer Säure mit Gräbes Formel aus Acetobromglukuronsäurelaktone und Euxanthinkalium stünde ohne Analogie da und ließe sich nur gezwungen deuten. Viel besser gestützt ist die Annahme, daß dieser Körper nach dem Glykosidtypus gebaut ist und in folgender Weise entsteht:



Hierfür sprechen ferner folgende Gründe:

1. Euxanthinsäure wird durch Emulsin und Kefirlaktase wie ein Glukosid gespalten; es ist aber nicht bekannt, daß

Fermente auf Verbindungen vom Aldehydalkoholatcharakter hydrolysierend wirken.

2. Bei der physiologischen Glukuronsäurepaarung — und durch solche entsteht ja unzweifelhaft die natürlich aus Kamelsharn gewonnene Euxanthinsäure — findet ausnahmslos der Zusammentritt der Komponenten, Glukuronsäure und Alkohol resp. Phenol, unter Wasseraustritt statt, so daß bei der Annahme der Graebeschen Formel für die Euxanthinsäure eine Sonderstellung bestände, welche durch ihr chemisches Verhalten (s. Punkt 3) nicht gerechtfertigt wäre.

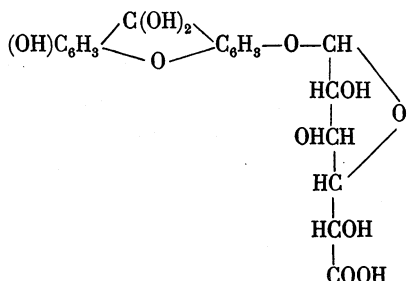
3. Die Euxanthinsäure gehört zu den beständigsten gepaarten Glukuronsäuren; sie wird bekanntlich nur durch Erhitzen auf ca. 125° oder durch andauerndes Kochen mit verdünnten Mineralsäuren in die Komponenten gespalten.¹⁾ Es ist indessen nicht anzunehmen, daß eine Verbindung vom Aldehydalkoholatcharakter so wenig zum Zerfall neigen sollte; werden doch die wahren Vertreter dieses Typus außerordentlich leicht zu den Komponenten verseift.

4. Die Existenz der Isoeuxanthinsäure, welche auch in freiem Zustande die Formel $C_{19}H_{16}O_{10}$ besitzt, ist am einfachsten mit der Annahme der Glukosidkonstitution zu erklären. Denn bei Zugrundelegung der inneren Anhydridformeln von Graebe, Aders und Heyer — Laktonbildung an der Karboxylgruppe schließen die genannten Autoren ausdrücklich aus — müßte man die unwahrscheinliche Annahme machen, daß beim Übergang von isoeuxanthinsäuren Salzen in die freie Säure sich freiwillig eine ätherartige Anhydrierung zwischen zwei Hydroxylgruppen vollziehe. Den eigentümlichen Umstand, daß sich eine Reihe von Salzen von der Formel $C_{19}H_{18}O_{11}$ ableitet, glauben wir vielmehr anders erklären zu sollen.

Soweit die Annahme eines Moleküls Kristallwasser nicht ausreicht, kann man sich nämlich die chemische Bindung eines Wassermoleküls an die Carbonylgruppe des Euxanthonrestes vorstellen, d. h. die wasserreichen Salze wären nach Art der vom Mesoxalsäurehydrat derivierenden Verbindungen

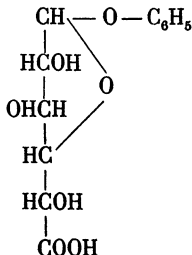
¹⁾ Vergl. Mann und Tollens, *Annalen der Chemie*, Bd. CCXC, S. 155, sowie Neuberg, *Ber. d. Deutsch. chem. Ges.*, Bd. XXXIII, S. 3316.

konstituiert. Diese Körperklasse ziehen auch bereits Graebe und seine Mitarbeiter zum Vergleiche heran; sie gedenken jedoch nicht der naheliegenden Analogie, welche die Gegenwart der Ketogruppe in diesen Verbindungen bedingt. Vielmehr sind sie der Meinung, daß hier nur ein formaler Zusammenhang bei dem Übergange der wasserreicheren in die wasserärmeren Verbindungen besteht. Am einfachsten erscheint dagegen der Schluß, daß die ein Molekül Wasser enthaltenden Euxanthinsäureverbindungen sich von der Formel



herleiten.

c) *Phenolglukuronsäure.*



16 g Acetobromglukuronsäurelaktone und 3,18 g Phenol werden in 150 ccm absolutem Methylalkohol gelöst und mit einer Lösung von 1,5 g Kalium in 20 ccm Methylalkohol versetzt. Die Flüssigkeit färbt sich bald gelb und scheidet dabei reichlich Kristalle von Bromkalium ab, wobei sich der Geruch von Essigsäuremethylester zu erkennen gibt. Nach drei Wochen filtriert man die bis dahin verschlossen und im Dunkeln aufbewahrte Lösung und verdunstet sie bei gewöhnlicher Temperatur. Den sirupösen Rückstand löst man in wenig Wasser, leitet zur Zersetzung von noch vorhandenem Phenolkalium Kohlensäure ein

und extrahiert das in Freiheit gesetzte Phenol mit Petroläther. Nunmehr verdünnt man die wässrige Flüssigkeit mit 20 ccm Wasser und schüttelt sie mit aufgeschlämmtem Silberkarbonat bis zur völligen Bindung des Broms. Das niederfallende Bromsilber klärt gleichzeitig die vorher dunkle Flüssigkeit, aus der man die entstandene Phenolglukuronsäure mit Bleiessig fällt. Der gut mit kaltem Wasser gewaschene Bleiniederschlag wird sodann in Wasser suspendiert und mit Schwefelsäure zersetzt. Als Filtrat vom Schwefelblei resultiert eine wasserhelle Flüssigkeit, welche schwaches Reduktionsvermögen besitzt und dadurch einen Gehalt an ungebundener Glukuronsäure verrät; demgemäß kristallisiert die im Vacuum konzentrierte Lösung nicht von selbst. Man zieht deshalb den restierenden Sirup mit siedendem Essigäther aus; nach dem Verdampfen desselben bleibt wiederum ein schwach gelb gefärbter Sirup zurück, der nach fünfmonatlichem Aufbewahren im Exsikkator erstarrt. Die auf Ton gestrichenen Kristalle lassen sich nunmehr ohne Schwierigkeit aus heißem Wasser umkristallisieren, aus dem die Verbindung in farblosen, undurchsichtigen, bis zu 1 cm langen Nadeln prismatischer Form anschießt. Smp. 150—151° (Präparat I).

Schneller gelangt man zum Ziele, wenn man das eingedampfte in der beschriebenen Weise von Phenol befreite Reaktionsprodukt mit sehr verdünnter (höchstens fünfprozentiger) Schwefelsäure bis zur deutlich sauren Reaktion versetzt und mit einem Gemisch von zwei Vol. Äther und einem Vol. Alkohol so lange extrahiert, als noch nennenswerte Substanzmengen in Lösung gehen (ca. 5—6 mal). Die vereinigten Auszüge werden auf dem Wasserbade bei einer 40° nicht überschreitenden Temperatur zum Sirup verdunstet, der nur wenig Zersetzungsprodukte enthält und demgemäß innerhalb 48 Stunden zu einem dichten Brei von Phenolglukuronsäure erstarrt. Diese wird nach dem Abpressen auf Ton und Kristallisation aus heißem Wasser unter Zusatz von Knochenkohle rein erhalten. (Präparat II.)

Die Verbindung löst sich leicht in Alkohol und heißem Essigäther, weniger in Äther und garnicht in Ligroin. Sie reduziert erst nach dem Kochen mit Säuren, wonach die zuvor maskierten Phenolproben sämtlich eintreten. Bei längerem Stehen im direkten

Tageslichte färbt sich die feste Substanz wie ihre wässrige Lösung schwach rosa.

Präparat I. 0,1213 g Substanz: 0,2373 g CO₂ und 0,0578 g H₂O

II. $\left\{ \begin{array}{lll} 0,1818 > > > 0,3539 > > > 0,0883 > > \\ 0,1240 > > > 0,2420 > > > 0,0592 > > \end{array} \right.$



Berechnet: C = 53,33%; H = 5,19%

Gefunden: C = 53,41%; H = 5,28%

C = 53,10%; H = 5,39%

C = 53,22%; H = 5,31%

$[\alpha]_{\text{D}17} = -83,3^\circ$

$(\alpha = -2^\circ 3'; c = 3,00; l = 1).$

Durch Kefirlaktase sowie Emulsin, nicht aber Hefenmaltase, wird auch die Phenolglukuronsäure langsam und partiell hydrolysiert.

Die Salze der Phenolglukuronsäure sind sämtlich wasserlöslich, bis auf die Bleiverbindung, die durch Bleiessig aus der freien Säure wie aus deren Salzen gefällt wird.

Phenolglukuronsäure ist nach den Untersuchungen von C. Neuberg und P. Mayer¹⁾ ein Bestandteil des normalen Harns. In vermehrter Menge findet sie sich hierin, wenn unter pathologischen Verhältnissen die Menge des im Darmkanale gebildeten Phenols vermehrt ist. Daß bei künstlicher Zufuhr von Phenol oder solchen Substanzen, die im Tierkörper in dieses übergehen (Benzol), gleichfalls eine Steigerung des Gehaltes an «Phenolglukuronsäure» statthat, ist schon längere Zeit bekannt.

Baumann und Preuße²⁾ haben zuerst beobachtet, daß Hunde nach nicht zu geringen Phenolgaben einen stark linksdrehenden Harn entleeren. Dieselbe Wahrnehmung hat Schmiedeberg³⁾ bei Verfütterung von Benzol gemacht; er beschreibt die hierbei im Harne auftretende Verbindung als ein Gemisch einer kristallisierenden und einer amorphen stickstoffhaltigen Säure, deren Reindarstellung oder Überführung in charakteristische Salze ihm aber nicht möglich war. Erst

¹⁾ l. c.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. III, S. 159 (1879).

³⁾ Arch. f. experiment. Path., Bd. XIV, S. 307 (1881).

Külz¹⁾ gelang es, die Phenolglukuronsäure in Substanz darzustellen, als er Phenol an Kaninchen, also an Pflanzenfresser, verfütterte, bei denen, wie wir heute wissen, die physiologische Glukuronsäurepaarung am vollständigsten ist. Aus der Bleiessigfällung der Phenolharn isolierte er eine gut kristallisierende Säure, die bei der Spaltung Phenol und Glukuronsäure lieferte; ihr Schmelzpunkt lag ungefähr bei 148°, ließ sich aber nicht mit voller Sicherheit ermitteln, da die Substanz sich schon bei niedriger Temperatur stark zersetzte. Aus den analytischen Daten dieser Verbindung berechnete Külz die Formel $C_{12}H_{16}O_7$. Eine derartige Verbindung ist nun überhaupt nicht zum Zerfall in Phenol und Glukuronsäure befähigt; wahrscheinlich hat Külz ihren Wasserstoffgehalt um zwei Atome zu hoch angenommen ($C_6H_{10}O_7 + C_6H_5OH - H_2O = C_{12}H_{14}O_7$).

In der Tat kommt der künstlich dargestellten Phenolglukuronsäure auf Grund der Synthese sowie ihrer analytischen Daten die von der Theorie verlangte Zusammensetzung $C_{12}H_{14}O_7$ zu. Da Külz keine Angaben über die spezifische Drehung seiner Substanz gemacht hat, so muß angesichts der verschiedenen kleinen Differenzen die Frage nach der Identität der synthetischen und natürlichen Phenolglukuronsäure vorläufig offen gelassen werden; sie wird sich durch den Vergleich der prachtvoll kristallisierenden Alkaloidsalze, insbesondere der Brucinverbindung, entscheiden lassen.

Die beschriebene Synthese der gepaarten Glukuronsäure ist weiterer Anwendung fähig und wird zur Darstellung anderer physiologisch wichtiger Substanzen aus dieser Körperklasse dienen können.

¹⁾ Zeitschr. f. Biologie, Bd. XXVII, S. 248 (1890).