

SYNTHESE DER AMADORI-VERBINDUNG 2-DESOXY-2-[(1-DESOXY-D-FRUCTOFURANURONSÄURE)-1-YL]AMINO- α -D-GLUCOPYRANOSE*

ALMUTH KLEMER UND WERNER FUNCKE

Organisch-Chemisches Institut der Universität Münster, 44 Münster (Deutschland)

(Eingegangen am 30 Oktober 1973, angenommen in revidierter Form am 26 Dezember 1973)

ABSTRACT

Condensation of 2-amino-2-deoxy-D-glucose hydrochloride with D-glucuronic acid in methanol containing a trace of pyridine gave crystalline 2-deoxy-2-[(1-deoxy-D-fructofuranuronic acid)-1-yl]amino- α -D-glucopyranose (**2**) in a yield of 34%. The compound was characterized by analytical and spectroscopic data and by its hepta-O-acetyl derivative. At pH 6.5, **2** was split quantitatively into 2-amino-2-deoxy-D-glucose and D-glucuronic acid.

ZUSAMMENFASSUNG

2-Amino-2-desoxy-D-glucosehydrochlorid ergibt mit D-Glucuronsäure oder D-Mannuronsäure in pyridinhaltigem Methanol kristalline 2-Desoxy-2-[(1-desoxy-D-fructofuranuronsäure)-1-yl]amino- α -D-glucopyranose (**2**) in 34% Ausbeute. Die Verbindung wurde durch analytische und spektroskopische Daten und ihr Heptaacetat charakterisiert. Bei pH 6,5 zerfällt **2** quantitativ unter Bildung von 2-Amino-2-desoxy-D-glucose und D-Glucuronsäure.

EINLEITUNG

Kurzlich beschrieben wir^{1,2} die Synthese von 2-Desoxy-2-(D-glucofuranosyl-urono-6,3-lacton)amino-D-galaktopyranose (**1**). Kenntnis über die Bildung und die chemischen Eigenschaften dieses Glykosylamins — insbesondere seine Tendenz zur Amadoriumlagerung — sind von besonderem Interesse.

Mit der Umlagerung von 2-Desoxy-2-(D-glucopyranosyl)amino-D-glucose befaßten sich bereits Micheel und Mitarbeiter³. In Äthanol mit wasserfreier Oxalsäure als Katalysator konnten sie keine Umlagerung erzielen. Es entstanden im wesentlichen D-Glucose und 2-Amino-2-desoxy-D-glucose-oxalat. Erst nach Einführung eines Benzylidenrestes in die 4,6-Stellung des D-Glucose-Teils ihres Glykosylamins gelang die Umlagerung in Eisessig mit molaren Mengen Triathyamin als Katalysator.

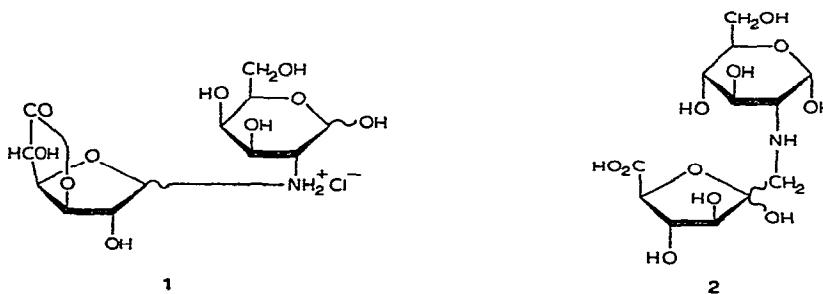
*Reaktionen von 2-Amino-2-desoxy-hexosen mit Alduronsäuren. Teil IV.

Umlagerungen von verschiedenen einfachen Glucopyranosyluronsäure-aminen führten Heyns und Mitarbeiter⁴ durch Sie fanden, daß nur die Verbindungen mit freier Uronsäuregruppe (oder deren Salze) nicht aber die Lactone umgelagert werden können Aus Aminosäuren und D-Glucuronsäure ließen sich direkt Amadoriprodukte in guten Ausbeuten gewinnen⁵

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Alle Versuche zur Umlagerung unseres Glykosylamins (**1**) nach den üblichen Methoden⁶ verliefen ergebnislos⁷. Überraschend gut setzen sich jedoch 2-Amino-2-desoxy-D-hexosen mit D-Hexuronsäuren in pyridinhaltigem Methanol direkt zu den betreffenden Amadori-Verbindungen um. Für die Beurteilung der Bausteinanalysen von Kohlenhydrat-Eiweißverbindungen ist dieser Befund von großer Wichtigkeit⁸, weil beim Arbeiten unter diesen Bedingungen, die bisher eigentlich für indifferent gehalten wurden, völlig falsche Aminozucker- und Uronsäurewerte resultieren müssen. Im Folgenden berichten wir über die Darstellung von 2-Desoxy-2-[(1-desoxy-D-fructofuranuronsäure)-1-yl]amino-α-D-glucopyranose (**2**) aus 2-Amino-2-desoxy-D-glucose und D-Glucuronsäure. Wie die Produktanalysen verschiedener Ansätze am Aminosäureanalysator zeigten, entsteht **2** nahezu quantitativ beim kurzzeitigen Erhitzen der Komponenten in Methanol mit 10% Pyridin, während eine Verringerung des Pyridingehaltes deutlich zu einer Ausbeuteverminderung führt. In allen Fällen waren außer **2** und nicht umgesetzter 2-Amino-2-desoxy-D-glucose keine weiteren ninhydrinpositiven Substanzen nachzuweisen.

Für die Isolierung von 2 durch Austauscherchromatographie bewährten sich Ansätze mit höchstens 1% Pyridin am besten, weil größere Mengen der Base bei der Aufarbeitung störten. Als Eluierungsmittel diente Trichloressigsäure, die sich anschließend durch Extraktion mit Äther wieder entfernen ließ. Das Amadoriprodukt konnte in reiner, kristalliner Form und einer Ausbeute von ca. 34% gewonnen werden.



Die Strukturaufklärung von **2** bereitete erhebliche Schwierigkeiten, da die meisten Befunde die isomere Glykosylamin-Struktur nicht ausschlossen. Die C,H,N-Werte entsprechen der angegebenen Struktur. Die Verbindung verhält sich wie eine

Monoamino-monocarbonsäure, wie elektrophoretische Untersuchungen bei verschiedenen pH-Werten und ihr Verhalten im Aminosaureanalysator (Retentionszeit 45 min) zeigten Sie reduziert spontan Methylenblau oder 1,2-Dinitrobenzol. Da jedoch aus der bei dieser Reaktion zum Teil entstehenden D-Glucuronsäure im alkalischen Bereich Verbindungen mit ähnlichem Reduktionsvermögen entstehen können^{9 10}, ist die Zuordnung von **2** auf dieser Basis unsicher. Aus dem 1^{H} -Spektrum von **2** lassen sich folgende Aussagen machen: Es fehlt die C=O-Bande bei 1755 cm^{-1} ; es liegt also — wie bereits gezeigt — keine Lactonstruktur vor. Ebenso fehlt die C=O-Bande bei 1720 cm^{-1} , demnach liegt kein offenkettiges Fructuronsäurederivat vor. Ferner fehlt die für furanoide Amadoriverbindungen sehr häufig zu findende typische Bande¹¹ bei 3570 cm^{-1} . Das $\text{n}^{\text{m}}\text{r}$ -Spektrum von **2** zeigt mit einem Doublett bei $\tau 4,3$ und einer Kopplungskonstante $J 3\text{ Hz}$ eine α -Konfiguration des 2-Amino-2-desoxy-D-glucose-Teils an¹².

Auf Grund seiner Instabilität ließ sich **2** trotz schonender Bedingungen nur wenig befriedigend in sein Acetat, 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2-[(2,3,4-tri-O-acetyl-1-desoxy-D-fructofuranuronsäure)-1-yl]amino-D-glucopyranose (**3**), überführen. Immerhin konnte nach verlustreichem Reinigen fast reines **3** in 10-prozentiger Ausbeute erhalten werden. Das 1^{H} -Spektrum von **3** zeigt keine Saureamidbanden, der Stickstoff liegt demnach nicht acetyliert vor. Das $\text{n}^{\text{m}}\text{r}$ -Spektrum bestätigt diesen Befund. Es werden die Methylprotonen von sieben O-Acetylgruppen bei $\tau 8,0$ gefunden.

Insgesamt ließ sich eine sichere Entscheidung zwischen einer Amadori- und einer Glykosylaminstruktur auf spektroskopischem Wege nicht treffen.

Wie aus zahlreichen Untersuchungen bekannt ist^{6 13}, lassen sich Amadori-verbindungen in der Regel auf Grund ihrer Stabilität gegenüber verdunnten Säuren von den betreffenden isomeren Glykosylaminen unterscheiden. Lediglich einige Keturon-Aminosäuren bilden eine Ausnahme⁵. Sie unterliegen wahrscheinlich teilweise einer „Retro-Amadori-Umlagerung“, wie aus der Rückbildung der betreffenden Aminosäure und einer nicht näher untersuchten Uronsäure geschlossen wurde. Auch die Verbindung **2** ist instabil. Durch Produktanalysen im Aminosäureanalysator wurde gezeigt, daß aus **2** bei 70° in wäßriger Lösung bei pH 6,5 2-Amino-2-desoxy-D-glucose fast quantitativ zurückgebildet wird.

Zur Identifizierung des weiteren Spaltproduktes dienten Papierchromatographie und Elektrophorese. Es ließ sich eindeutig und ausschließlich D-Glucuronsäure nachweisen. Als Vergleichssubstanzen dienten D-Glucuronsäure, D-Fructuronsäure¹⁴ und D-Mannuronsäure, wobei wir uns durch einen Testversuch überzeugten, daß unter den betreffenden Bedingungen weder D-Fructuronsäure noch D-Mannuronsäure zu D-Glucuronsäure isomerisiert werden. Die Stabilitätseigenschaften und die Struktur der Hydrolysenprodukte sprechen also mehr für eine Glykosylamin- als für eine Amadori-Struktur, denn bei einer Retro-Amadori-Umlagerung, wie sie bereits diskutiert wurde⁵, sollte man zumindest geringe Mengen D-Mannuronsäure als Spaltprodukt erwarten. Trotzdem ist **2** eindeutig eine Amadori-Verbindung. Dies konnten wir durch die Synthese eines in allen Punkten mit **2** identischen Produktes ausgehend

von D-Mannuronsäure und 2-Amino-2-desoxy-D-glucose beweisen. Wiederum überzeugten wir uns zuvor, daß D-Mannuronsäure unter den Synthese-Bedingungen nicht in einer vorgelagerten Reaktion zu D-Glucuronsäure epimerisiert wird.

EXPERIMENTELLER TEIL

Allgemeine Methoden — Das Einengen von Lösungen erfolgte im Rotationsverdampfer bei 40–50°. Schmelzpunkte wurden mit einem Thermopan-Heiztischmikroskop der Firma C Reichert, Wien, bestimmt, Drehwerte mit einem Perkin-Elmer Polarimeter 141 mit einer 1 dm-Kuvette.

Samtliche Papierchromatogramme wurden nach der absteigenden Methode hergestellt. Als Laufmittel¹⁴ diente Athylacetat-Eisessig-Wasser (3:1:1), Laufzeit 15 h, Streifenlänge 41 cm. Aminozucker-Derivate wurden mit Ninhydrin bei 120°, reduzierende Zucker mit Anilinphthalat bei 120° angefärbt.

Elektrophoretische Untersuchungen wurden an einem Gerät der Firma Hormuth-Vetter, Wiesloch, Modell 64 durchgeführt, Laufzeit 2 h, Papier Whatman 3 MM, Feldstärke 20 V/cm, Kuhlstufe 4, Stromstärke 5–50 mA/cm (je nach Puffer), Puffersysteme (a) pH 1,9, Essigsäure-Ameisensäure-Wasser (3:1:16), (b) pH 3,6 Essigsäure-Pyridin-Wasser (10:1:89), (c) pH 5,6 Essigsäure-Pyridin-Wasser (1:10:89).

Qualitative und quantitative Untersuchungen der ninhydrinpositiven Substanzen wurden am Aminosaureanalysator der Firma Beckman, Modell Unichrom, nach Werksangaben vorgenommen (A) für Kurzinformationen Saulenfüllung 0,9 cm × 6,8 cm, Harzsorte M 81, Analysendauer bis 45 min, Puffersystem Natriumcitrat 0,5M an Natriumionen, pH 5,28 ± 0,02, (B) alle anderen Messungen. Saulenfüllung 0,9 cm × 45,5 cm, Harzsorten M 72 bzw. UR 30, Analysendauer bis 4 h; Puffersystem Natriumcitrat 0,2M an Natriumionen, pH 3,25 ± 0,01, bzw. Natriumcitrat 0,2M an Natriumionen, pH 4,25 ± 0,02, Pufferwechsel nach 87 min. Alle weiteren Parameter stimmten während der Untersuchungen mit den vorgeschriebenen überein. Jede Analyse wurde so vorbereitet, daß — abgepuffert auf pH 2,2 ± 0,03 — etwa 0,5–1,5 ml aufgetragener Lösung 0,2–1,5 µmol Substanz enthielten.

Zur Aufnahme der ¹H-Spektren wurde ein Perkin-Elmer Infracord-Spektrometer vom Typ 257 benutzt. Die Substanzen wurden in Kaliumbromid-Preßlingen gegen Kaliumbromid gemessen. Die ¹³C-NMR-Spektren wurden an einem Varian A 56/60 Spektrometer gemessen. Als Lösungsmittel dienten Deuteriumoxid bzw. Chloroform-d und Tetramethylsilan als innerer Standard.

2-Desoxy-2-[(I-desoxy-D-fructofuranuronsäure)-I-yl]amino-α-D-glucopyranose (2) — *A. Aus 2-Amino-2-desoxy-D-glucose-hydrochlorid und D-Glucuronsäure* 2-Amino-2-desoxy-D-glucose-hydrochlorid (2,15 g) und D-Glucuronsäure (4 g) wurden in absolutem Methanol (300 ml) und Pyridin (3 ml) 30 min unter Rückfluß gekocht. Nach 5 min lösten die Substanzen sich auf. Nach Hinzugabe von Eisessig (8 ml) wurde die dunkelbraune Lösung auf etwa 30 ml eingeengt und an Dowex 50W (X8, H⁺, mesh 200–400) Ionenaustauscherharz chromatographiert (Säule 3,0 cm × 44 cm). Mit Wasser (300 ml) und 0,5M Essigsäure (300 ml) wurden nicht umgesetzte D-

Glucuronsäure und Huminprodukte eluiert Verbindung 2 wurde sodann mit 0,25M Trichloressigsäure nach 600 ml Vorlauf desorbiert (Geschwindigkeit 1 Tropfen/sec) Mit Hilfe eines Perforators nach Kutscher und Steudel¹⁵ wurde die Trichloressigsäure in 20 h mit Ather extrahiert Die wäßrige, gelbgefarbte Lösung, die außer 2 geringe Mengen 2-Amino-2-desoxy-D-glucose und D-Glucuronsäure enthielt, wurde bis auf 30 ml in vacuo bei 25° eingedampft und nochmals am gleichen Austauscherharz mit 0,05M Trichloressigsäure unter Kühlung der Säule und des Perforators auf 10° chromatographiert Die dann erhaltene farblose, klare wäßrige Lösung wurde *in vacuo* bei 25° zur Trockne eingedampft Durch mehrfaches Aufnehmen mit absolutem Methanol und Eindampfen wurden die letzten Wasserreste entfernt, und die zurückbleibende sirupose Masse in heißem absolutem Methanol (200 ml) gelöst Beim langsamem Abkuhlen der Lösung fiel 2 als weißes, kristallines Produkt aus. Durch fraktionierte Fallung konnten zwei weitere leicht gelbgefarbte, aber einheitliche Fraktionen erhalten werden (Gesamtausbeute 1,20 g, 33,8% bezogen auf 2-Amino-2-desoxy-D-glucose), Schmp 115–120° (Zers), $[\alpha]_D^{25} +49,6 \rightarrow +28,5^\circ$ (*c* 1, Wasser, nach 45 min), ν m ν -Spektrum 3500–2500 (OH), 2970–2920 (CH), 1600 cm^{-1} (C=O), ν m ν -Spektrum (Deuteriumoxid) τ 4,3 (*d*, $J_{1,2}$ 3 Hz, H-1)

Anal. Ber. für $C_{12}H_{21}NO_{11}$. C, 40,56, H, 5,96, N, 3,94. Gef. C, 40,49, H, 6,14; N, 3,49.

B Aus 2-Amino-2-desoxy-D-glucose-hydrochlorid und D-Mannuronsäure D-Mannuronsäure (2 g) und 2-Amino-2-desoxy-D-glucose-hydrochlorid (1 g) wurden wie unter *A* beschrieben umgesetzt und aufgearbeitet Das isolierte Produkt ist identisch mit 2 (Ausb 340 mg, 21% bezogen auf 2-Amino-2-desoxy-D-glucose), Schmp 114–118° (Zers), $[\alpha]_D^{25} +49,0 \rightarrow +28,4^\circ$ (*c* 1, Wasser, nach 45 min) Alle weiteren Daten sind identisch mit denen des nach Methode *A* dargestellten Produktes

Anal. Ber. für $C_{12}H_{21}NO_{11}$. C, 40,56, H, 5,96, N, 3,94. Gef. C, 40,64, H, 6,16; N, 3,53

Hydrolyse von 2 bei pH 6,5 — Eine Probe von 2 (8–10 mg) wurde genau eingewogen und in Wasser (10 ml) bei 70° 20 h hydrolysiert Die leicht gelb gefärbte Lösung wurde *in vacuo* über Kaliumhydroxid eingedampft Der Rückstand wurde im Citratpuffer (0,2M an Natriumionen, pH 2,2) aufgenommen, auf 10 ml aufgefüllt und gemessen Die quantitative Auswertung des Spektrums ergab, daß aus 1 μmol 2 0,98 μmol 2-Amino-2-desoxy-D-glucose entstanden war Eine 1% wäßrige Lösung wurde wie zuvor hydrolysiert und 2-Amino-2-desoxy-D-glucose und D-Glucuronsäure durch absteigende Papierchromatographie¹⁴ nachgewiesen $R_{\text{Glucurono-6-3-lacton}}$ von 2-Amino-2-desoxy-D-glucose aus 2 0,40, 2-Amino-2-desoxy-D-glucose als Vergleich 0,40, D-Glucuronsäure aus 2 0,54, D-Glucuronsäure als Vergleich 0,54, D-Fructuronsäure¹⁴ 0,66, D-Mannuronsäure 0,60

1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2-[(2,3,4-tri-O-acetyl-1-desoxy-D-fructofuranuronsäure)-1-yl]amino-D-glucopyranose (3). — Verbindung 2 (400 mg) wurde in einer Mischung von Pyridin (6 ml) und Acetanhydrid (5 ml) bei 0° gelöst und anschließend 24 h bei 5–7° stehengelassen, wobei starke Braunfärbung eintrat Das Reaktionsgemisch wurde auf Eis (100 g) gegossen und mehrere Male mit Chloroform (je 10 ml)

extrahiert. Die Extrakte wurden mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und *in vacuo* bei 0° eingeengt. Der zurückbleibende dunkelbraune, nach Pyridin riechende Sirup wurde in viel Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet, wonach 480 mg (63,6%) eines braunen, amorphen Pulvers erhalten wurde. Zusammensetzung höchstens 50% der Verbindung 3, sonst Abbauprodukte und acetolytische Spaltprodukte. Aus warmen Dusopropylather ließen sich durch Abkuhlen auf Raumtemperatur 40 mg amorphes, leicht braungefärbtes 3 in chromatographisch einheitlicher Form gewinnen, Schmp 172–175° (Zers.), $[\alpha]_D^{25} +79\ 0^\circ$ (*c* 1, Chloroform), i.r.-Spektrum 3500–3300 (NH, OH), 2960–2860 (CH), 1760 cm^{-1} (C=O), n m r.-Spektrum (Chloroform-*d*) τ 7,9–8,0 (COCH₃)

Anal. Ber. für C₂₆H₃₅NO₁₈. C, 47,98, H, 5,39, N, 2,16 Gef C, 46,74, H, 5,08, N, 2,24.

DANK

Wir danken dem Landesamt für Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen und dem Fonds der chemischen Industrie für die finanzielle Unterstützung

LITERATUR

- 1 A KLEMER UND G MULLER, *Tetrahedron Lett.*, (1972) 2313
- 2 A KLEMER, G MULLER UND A LUDWIG, *Carbohyd Res.*, 33 (1974) 307
- 3 F. MICHEEL, K H HEINEMANN, K H SCHWIEGER UND A FROWEIN, *Tetrahedron Lett.*, (1965) 3769
- 4 K HEYNS UND W BALTES, *Chem Ber.*, 93 (1960) 1616
- 5 K HEYNS UND W SCHULZ, *Chem Ber.*, 95 (1962) 709
- 6 J E HODGE, *Advan Carbohyd Chem.*, 10 (1955) 169
- 7 G MULLER, *Dissertation Universität Münster*, (1973), unveröffentlicht
- 8 A KLEMER UND D MEMPEL, *Z Naturforschung, B*, 20 (1965) 553
- 9 M ISHIDATE, M KIMURA UND M KAWATA, *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 11 (1963) 1083
- 10 K HEYNS UND W BEILFUSS, *Chem Ber.*, 106 (1973) 2693
- 11 F MICHEEL UND B SCHLEPPINGHOFF, *Chem Ber.*, 89 (1956) 1702
- 12 J M VAN DER VEEN, *J Org Chem.*, 28 (1963) 564
- 13 G P ELLIS UND J HONEYMAN, *Advan Carbohyd Chem.*, 10 (1955) 95
- 14 B CARLSSON UND O SAMUELSON, *Acta Chem Scand*, 23 (1969) 261
- 15 KUTSCHER UND STEUDEL, *Organikum*, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 1970, S 76.