

### 34. Fritz Micheel und Wilhelm Berlenbach: Eine neue Methode zur Darstellung von Kohlenhydrat-Aminosäure-Derivaten und verwandten Verbindungen

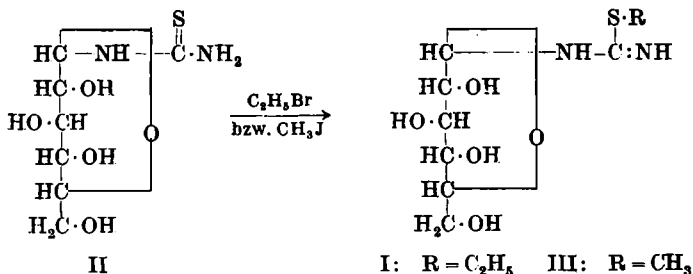
(Mitbearbeitet von Kurt Weichbrodt)

[Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Münster/Westf.]

(Eingegangen am 28. November 1951)

Es werden die *S*-Äther von *d*-Glucosyl-isothioharnstoff dargestellt. Diese setzen sich mit Aminen, Aminosäuren, Peptiden und Eiweißstoffen unter Abspaltung von Mercaptanen zu *N*-[Glucosyl-guanyl]-Derivaten dieser Stoffe um.

Im Rahmen der Synthesen von Verbindungen von Kohlenhydraten mit Aminosäuren und Eiweißstoffen<sup>1)</sup>, die eine Bindung des Kohlenhydrat-Restes in biologisch möglicher Struktur enthalten, haben wir ein neues Verfahren ausgearbeitet, das zunächst auf Aminosäuren, Peptide, Eiweißstoffe und einfache Amine angewandt wurde. Es zeichnet sich durch seine besonders milden Reaktionsbedingungen aus und besteht in der Einwirkung von Monosaccharid-isothioharnstoff-Derivaten auf obige Stoffe. Wir beschreiben im folgenden die

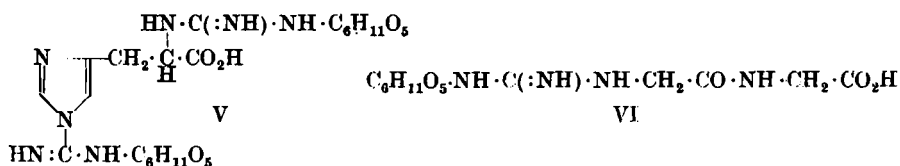
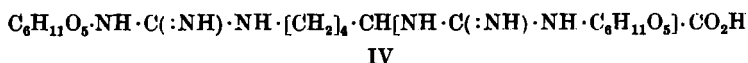


Darstellung des *S*-Äthyl-*N*-[*d*-glucosyl]-isothioharnstoffs (I), der durch Äthylieren des bekannten Glucosyl-thioharnstoffs<sup>2)</sup> (II) gewonnen wird und dessen Umsetzungen mit Glycin, *d,l*-Lysin, *l*-Histidin, Glycyl-glycin und Tetramethylen-diamin. Über weitere Synthesen wird später berichtet. Die primären Aminogruppen der genannten Stoffe reagieren mit *S*-Äthyl-*N*-[*d*-glucosyl]-isothioharnstoff (I) unter Abspaltung von Mercaptan und Bildung der betreffenden *N*-[*d*-Glucosyl-guanyl]-aminosäuren bzw. Amine. Aus Glycin wird *N*-[*d*-Glucosyl-guanyl]-glykokoll, aus *d,l*-Lysin *N,N'*-Bis-[*d*-glucosyl-guanyl]-*d,l*-lysin (IV), aus *l*-Histidin das 1.*N*<sup>a</sup>-Bis-[*d*-glucosyl-guanyl]-*l*-histidin (V) erhalten. Es reagiert also beim Histidin außer der Aminogruppe die NH-Gruppe des Imidazolringes. Aus Glycyl-glycin entsteht *N'*-[*d*-Glucosyl-guanyl]-glycyl-glycin (VI) und aus Tetramethylen-diamin ein *N,N'*-Bis-[*d*-glucosyl-guanyl]-tetramethylen-diamin. Bei diesen Reaktionen wird Äthylmercaptan abgespalten. Beim Umsatz mit Cystin bzw. mit cystinhaltigen Proteinen war zu erwarten, daß durch dies Mercaptan S-S-Bindungen reduziert werden würden

<sup>1)</sup> VIII. Mittell.: B. 84, 210 [1951]; dort Angabe der früheren Arbeiten.

<sup>2)</sup> B. Helferich u. W. Kosche, B. 59, 71 [1926].

und dadurch eine unerwünschte sekundäre Veränderung, insbesondere beim Umsatz der Proteine einträte. Es wurde deshalb der *S*-Methyl-*N*-[*d*-glucosyl]-isothioharnstoff<sup>3)</sup> aus Glucosyl-thioharnstoff (II) mit Methyljodid oder Dimethylsulfat hergestellt und mit Cystin zur Reaktion gebracht. So wurden das *N,N'*-Bis-[*d*-glucosyl-guanyl]-*L*-cystin und durch Reduktion mit Schwefelwasserstoff daraus das *N*-[*d*-Glucosyl-guanyl]-*L*-cystein erhalten. Wegen des



niedrigen Siedepunktes des Methylmercaptans entwich dieses aus dem Reaktionsansatz leichter als das gebildete Äthylmercaptan. Es zeigte sich, daß bei Verwendung des Äthyl-Derivates I die Aufspaltung der S-S-Bindung zwar verhältnismäßig gering war, jedoch größer als bei Verwendung des Methyl-Derivates III. I läßt sich gut mit verschiedenen Proteinen zu Kohlenhydrat-Protein-Verbindungen umsetzen. Hierüber wie über die Reaktionen mit weiteren Aminosäuren und Aminen wird später berichtet.

Wir danken der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft für die Unterstützung der Arbeiten sowie dem Fonds der Chemie für die Gewährung eines Stipendiums an den einen von uns (B.).

### Beschreibung der Versuche

*S*-Äthyl-*N*-[*d*-glucosyl-(1)]-isothioharnstoff (I): 10 g Glucosyl-(1)-thioharnstoff<sup>4)</sup> werden bei 55° in 25 ccm Wasser gelöst, ein Gemisch von 8 ccm Äthylbromid und 30 ccm Äthanol zugegeben und bei einer Badtemperatur von etwa 55° gehalten. Anschließend wird i. Vak. abgedampft, mit absol. Äthanol aufgenommen, vom Ungelösten abgesaugt, die Lösung i. Vak. erneut abgedampft und noch einige Male mit Alkohol + Benzol behandelt und i. Vak. eingedampft. Der Rückstand wird beim Verreiben mit Äther zu einem festen hygroskopischen Pulver, das in Wasser, Methanol und Äthanol sehr leicht löslich und unlöslich in Äther u. a. hydrophoben Lösungsmitteln ist. Es ist das nicht ganz reine Hydrobromid; Kristallisationsversuche waren bisher ohne Erfolg.

$\text{C}_9\text{H}_{18}\text{O}_5\text{N}_2\text{S}\cdot\text{HBr}$  (347.2) Ber. C 31.15 H 5.53 N 8.07 Gef. C 33.53 H 5.76 N 8.83

*N*-[*d*-Glucosyl-guanyl]-glykokoll: Zu einer Lösung von 4.5 g I in 10 ccm Wasser werden bei 0° 14 ccm *n*NaOH gegeben und sodann eine 70° warme Lösung von 1.2 g Glykokoll in 15 ccm Wasser. Es wird sofort Mercaptan abgespalten. Die Reaktionslösung wird mit 30 ccm Äther überschichtet und 20 Stdn. bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Sodann werden beide Lösungsmittel getrennt und die wäbr. Phase nach Neutralisation mit *n*HCl i. Vak. zum Sirup eingedampft. Der Rückstand wird dreimal aus Wasser mit Methanol umgefällt, sodann in Wasser gelöst und bei 50° mit Isopropanol bis zur Trübung versetzt. Es scheiden sich allmählich prismenförmige Kristalle ab, die

<sup>3)</sup> K. Weichbrodt, Diplomarbeit Münster 1951.

<sup>4)</sup> Die Methode von Helferich<sup>2)</sup> wurde etwas modifiziert.

noch zweimal aus Wasser + Isopropanol (3 : 2) umkristallisiert werden; Schmp. 208° (Zers.). Fehlingsche Lösung wird reduziert, die Sakaguchi-Reaktion ist positiv; nach saurer Verseifung ist die Ninhydrin-Reaktion ebenfalls positiv.

$C_9H_{17}O_7N_7$  (279.2) Ber. C 38.68 H 6.06 N 15.00 Gef. C 38.48 H 6.09 N 15.0  
 $[\alpha]_D^{25}$ :  $-115^\circ$  (Wasser).

*N,N'*-Bis-[*d*-glucosyl-guanyl]-*d,l*-Lysin (IV): Zu einer Aufschlammung von 5.5 g krist. Bariumhydroxyd in 100 ccm Wasser werden 1.7 g *d,l*-Lysin-hydrochlorid und 6.5 g I gegeben, 20 Min. auf 40° erwärmt und sodann 3 Tage bei Zimmertemperatur aufgehoben. Darauf wird das Ba<sup>2+</sup> mit Kohlendioxyd ausgefällt, abfiltriert und die Lösung i. Vak. eingedampft. Das in dem Rückstand vorhandene Bariumbromid wird durch mehrfaches Ausreiben mit Methanol herausgelöst. Zur Entfernung noch vorhandener Barium-Ionen wird in Wasser gelöst und letztere mit Schwefelsäure ausgefällt, das Bariumsulfat abzentrifugiert und die mit  $n_{10}$  H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf p<sub>H</sub> 5 gebrachte Lösung i. Vak. bis auf 3–4 ccm eingedampft. Mit der 20–25 fachen Menge Methanol fällt ein farbloses, pulveriges Niederschlag, der dreimal aus Wasser mit Äthanol umgefällt wird; hygroskopisches Pulver vom Schmp. 178° (Zers.). Die Reaktionen mit Fehlingscher Lösung und nach Sakaguchi sind stark positiv, die Ninhydrin-Reaktion nach der Hydrolyse mit heißer Salzsäure.

$C_{20}H_{39}O_{12}N_6 \cdot \frac{1}{2} H_2SO_4$  (603.8) Ber. C 39.73 H 6.53 N 13.95 SO<sub>4</sub> 7.9 Glucose 59.5  
 Gef. C 39.53 H 6.38 N 14.09 SO<sub>4</sub> 8.4 Glucose<sup>5)</sup> 50 (±10)

1. *N*<sup>α</sup>-Bis-[*d*-glucosyl-guanyl]-*l*-histidin (V): 2 g *l*-Histidin-hydrochlorid und 8.5 g I werden in 24 ccm Wasser gelöst, 39 ccm *n*NaOH hinzugegeben, mit Äther überschichtet und 4 Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen (p<sub>H</sub> 9–10). Sodann wird i. Vak. zur Hälfte eingedampft, mit Salzsäure auf p<sub>H</sub> 7.5 gebracht und i. Vak. zum Sirup eingedampft. Das Rohprodukt wird mehrfach aus Wasser mit Methanol umgefällt und sodann mit  $n_{10}$  H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in Wasser auf p<sub>H</sub> 5–5.5 gebracht. Diese Lösung wird i. Vak. eingeeengt und mit einem Überschuß von Methanol das Sulfat von V als farbloses Pulver gefällt. Dies wird noch dreimal aus Wasser mit Methanol umgefällt und i. Vak. getrocknet; Zers. bei 160°.

$C_{18}H_{31}O_{12}N_7 \cdot \frac{1}{2} H_2SO_4$  (598.5) Ber. C 38.14 H 5.40 N 16.39 SO<sub>4</sub> 8.1  
 Gef. C 38.48 H 5.58 N 16.40 SO<sub>4</sub> 8.5

Die Sakaguchi-Reaktion ist rotbraun, da Histidin mit dem Reagens eine braune Farbe gibt. Fehlingsche Lösung wird reduziert.

*N'*-[*d*-Glucosyl-guanyl]-glycyl-glycin (VI): 1 g Glycyl-glycin und 3 g I werden in 30 ccm Wasser gelöst, mit Natronlauge auf p<sub>H</sub> 9 gebracht, mit Äther überschichtet und 12 Stdn. bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Sodann wird mit Salzsäure auf p<sub>H</sub> 7.5 gebracht und i. Vak. zum dünnflüssigen Sirup eingedampft. Nebenprodukte werden mit dem 25fachen Überschuß eines Gemisches von Methanol + Äthanol (1 : 1) ausgefällt und die abfiltrierte Lösung stehen gelassen. Im Laufe einiger Wochen scheidet sich das Reaktionsprodukt kristallin ab. Es wird aus Wasser + Isopropanol umkristallisiert; Schmp. 180° (Zers.).

$C_{11}H_{20}O_8N_4$  (336.7) Ber. C 39.23 H 5.92 N 16.64 Gef. C 38.52 H 5.88 N 16.50

*S*-Methyl-*N*-[*d*-glucosyl-(1)]-isothioharnstoff (III)<sup>6)</sup>: 4.52 g Glucosyl-thioharnstoff werden in 20 ccm Äthanol mit 7.5 g Dimethylsulfat versetzt. Auf Zugabe weniger Tropfen Wasser entstand eine homogene Lösung unter Wärmeentwicklung. Nach 2 Tagen wird i. Vak. abgedampft, noch zweimal mit absol. Alkohol aufgenommen und die Lösung i. Vak. abgedampft. Der zurückbleibende Sirup wird zur Entfernung von Dimethylsulfat und Methylschwefelsäure sechsmal mit je 10 ccm absol. Äther ausgerieben und sodann in absol. Alkohol gelöst. Durch langsames Ausfällen mit absol. Äther erhält man ein farbloses amorphes Pulver, das stark hygroskopisch und im Gegensatz zum Ausgangsstoff in absol. Alkohol löslich ist. Es besteht im wesentlichen aus dem Sulfat von III.

<sup>5)</sup> Bestimmt nach der Orcinmethode.

<sup>6)</sup> Dieser und die folgenden Versuche wurden von K. Weichbrodt ausgeführt.

Das Hydrojodid wurde auf folgende Weise gewonnen: 4.5 g Glucosyl-thioharnstoff werden in 30 ccm Wasser gelöst, 5.6 g Methyljodid hinzugegeben und tropfenweise mit so viel Alkohol versetzt, daß eine homogene Lösung entsteht. Sodann wird 5 Stdn. unter Rückfluß gekocht und i. Vak. abgedampft. Nach mehrfacher Zugabe von absol. Alkohol und Abdampfen i. Vak. wird eine amorphe, hygroskopische Masse erhalten, die im wesentlichen aus dem Hydrojodid von III besteht.

$C_8H_{19}O_6N_2S \cdot HJ$  (380.2) Ber. C 25.33 H 4.22 N 7.38 J 33.51  
Gef. C 25.34 H 4.47 N 7.43 J 33.47

*N.N'*-Bis-[*d*-glucosyl-guanyl]-*l*-cystin: 479 mg *l*-Cystin werden in 10 ccm „NaOH gelöst und 1.5 g *S*-Methyl-*N*-[*d*-glucosyl]-isothioharnstoff (III), in 15 ccm Wasser gelöst, hinzugegeben. Zur möglichst weitgehenden Entfernung des gebildeten Methylmercaptans wird durch die Reaktionslösung ein Luftstrom durchgesaugt, der anschließend zur Oxydation des Mercaptans über einen Kupfer-Kohle-Katalysator<sup>7)</sup> geleitet wird. Es wird dann einige Zeit auf 40° erhitzt und sodann i. Vak. eingedampft. Das zunächst amorphe Rohprodukt wird durch Umlösen aus wenig Wasser mit Methanol als Dinatriumsalz kristallin erhalten; Schmp. 220° (Zers.). Der Stoff ist das Natriumsalz des *N.N'*-Bis-[*d*-glucosyl-guanyl]-*l*-cystins und in Wasser löslich. Die Sakaguchi-Reaktion ist positiv, die Reaktion mit Phosphorwolframsäure (Folin) erst nach Zugabe von Sulfid.

$C_{20}H_{34}O_{14}N_6S_2Na_2$  (692.6) Ber. C 34.68 H 4.95 N 12.13 S 9.26  
Gef. C 34.52 H 5.68 N 12.09 S 9.62

Das Natriumsalz kann aus konz. wäbr. Lösung mit alkohol. Pikrinsäure-Lösung als krist. Pikrat vom Schmp. 148–149° erhalten werden. Durch Reduktion mit Schwefelwasserstoff kann aus der Cystin-Verbindung das entsprechende Thiol als Natriumsalz erhalten werden. Es gelang jedoch bisher nicht, aus den beiden Stoffen die zugehörigen Säuren in analysenreiner Form frei von Natrium zu gewinnen.

<sup>7)</sup> M. L. Wolfrom u. H. M. Hill, Journ. Amer. chem. Soc. **69**, 1539 [1947].