

1 ccm einer 0,5-proz. Phenol-Lösung unter Umschütteln hinzugegeben³⁾. Diese insgesamt 20 ccm Lösung werden zur vollen Entwicklung der Farbe 2 Stdn. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Man führt einen Blindversuch mit einer ganz analog zubereiteten Lösung aus, die statt der Anilin-Lösung dest. Wasser enthält.

Analyse einer Anilin-Lösung unbekannter Konzentration: Die Anilin-Lösung wird mit Essigsäure angesäuert und soll in 100 ccm etwa 0,2–2,5 mg Anilin enthalten. Je 10 ccm dieser Lösung werden mit Wasser auf 17 ccm verdünnt und weiter wie oben beschrieben verfahren. Man mißt unter Verwendung einer entsprechenden Cüvette, am besten mit Filter S 61, gegen eine Blind-Lösung, die Reagenzien in den gleichen Konzentrationen, aber kein Anilin enthält. Aus den Eichkurven (Abbild. 4) kann man unmittelbar die Anilinmenge ablesen. Die Fehlerrechnung, die hier im einzelnen nicht angegeben sei, ergibt einen mittleren Fehler von $\pm 1,5 \gamma$.

164. Fritz Micheel, Rolf Frier, Elisabeth Plate u. Alwin Hiller: Neue Darstellungsmethoden für 1-Amino-Zucker und einige ihrer N-Substitutionsprodukte

[Aus dem Chemischen Institut der Universität Münster (Westf.)]

(Eingegangen am 29. April 1952)

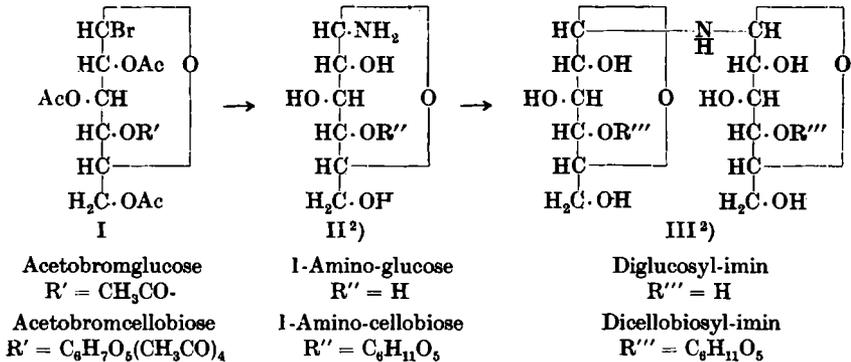
1-Amino-Derivate von *d*-Glucose, Cellobiose und Lactose wurden nach neuen Verfahren gewonnen, und zwar entweder durch Einwirkung von flüssigem Ammoniak auf die Acetobromverbindungen oder noch besser durch Einwirkung von alkoholischem Ammoniak auf die freien Zucker bei höherer Temperatur im geschlossenen Gefäß unter Druck. Es werden ferner einige Kondensationsprodukte der Cellobiose mit aliphatischen und aromatischen Aminen beschrieben.

Die 1-Amino-aldosen (Osimine) werden nach der Methode von C. A. Lobry de Bruyn und F. H. van Leent¹⁾ durch Umsetzung der freien Zucker mit alkoholischem Ammoniak in einer sich meist über mehrere Wochen hinziehenden Reaktion erhalten. Dieses Verfahren verläuft bei einigen Monosacchariden, wenn man von der langen Zeit, die es in Anspruch nimmt, absieht, befriedigend (Glucose, Xylose u. a.), versagt jedoch weitgehend bei anderen, z. B. bei der Lactose. Bei der Maltose gelang es uns nicht, die nach der Literatur in sehr geringer Ausbeute zu erhaltende 1-Amino-Verbindung zu gewinnen. Da für die Umsetzung mit Eiweißstoffen verschiedene 1-Amino-Derivate von Mono- und Oligosacchariden benötigt wurden, bestand die Aufgabe, ein einfaches, sicheres und vor allem schnell arbeitendes Verfahren zu deren Darstellung zu finden, das allgemeiner Anwendung fähig ist. Es zeigte sich, daß man unter geeigneten Bedingungen, ausgehend von den Acetohalogen-Verbindungen der Aldosen, zu ihren 1-Amino-Derivaten gelangen kann. Aber die Ausbeute ist auch hier von der Natur des Zuckers abhängig. Mit trockenem alkoholischem Ammoniak erhält man bei diesem Verfahren jedoch nicht die gewünschten Stoffe, sondern in einer Sekundärreaktion bilden

³⁾ Das Phenol ist ein reines Präparat des Handels.

¹⁾ Rec. Trav. chim. Pays-Bas 14, 98, 156 [1895].

sich die disaccharidartigen Dizucker-imine (III). Diese Reaktion tritt auch dann ein, wenn eine konzentrierte alkoholische Lösung des Acetohalogen-Zuckers tropfenweise zu eisgekühltem gesättigtem alkoholischem Ammoniak gegeben wird. Wie sich zeigen läßt, ist die Bildung des Imins (III) nicht auf die Umsetzung von II mit I, sondern auf die Abspaltung von Ammoniak aus 2 Molekülen II bei Gegenwart von ammoniakhaltigem Alkohol zurückzuführen (siehe unten). Das durch Verseifen gebildete Acetamid läßt sich



leicht abtrennen. Als Nebenprodukt wird im Falle der Glucose β -Methylglucosid erhalten. Die Reaktionsprodukte wurden in Substanz oder als Oktaacetat von III bzw. Tetraacetat des β -Methylglucosids identifiziert.

Die Gewinnung der 1-Amino-Zucker aus den Acetohalogen-Zuckern gelingt jedoch in guter Ausbeute, wenn man letztere in feingepulverter Form in flüssiges Ammoniak unter sorgfältigem Ausschluß von Feuchtigkeit einträgt. Das nach dem Abdampfen zurückbleibende Rohprodukt läßt sich durch Umkristallisieren vom Acetamid befreien oder kann durch Acetylieren mit Acetanhydrid-Pyridin als Acetat gewonnen werden. Auf diese Weise wird in bequemer Reaktion die bisher nicht bekannte 1-Amino-*d*-cellobiose gewonnen, während die Ausbeute bei der Darstellung der 1-Amino-*d*-glucose nach diesem Verfahren zu wünschen übrig läßt. Wird bei der Aufarbeitung nicht dafür gesorgt, daß der rohe 1-Amino-Zucker eine möglichst kurze Zeit mit Alkohol (der noch geringe Mengen von Ammoniak aus der Reaktion enthält) in Berührung bleibt, so bilden sich in kurzer Zeit unter Abspaltung von Ammoniak die Imine (II \rightarrow III), z. B. aus 1-Amino-cellobiose das Dicellobiosyl-imin.

Ein anderer Weg zur 1-Amino-cellobiose besteht darin, daß Cellobiose mit konz. alkoholischem Ammoniak umgesetzt wird; es ist erforderlich, bei dieser Reaktion im Druckgefäß auf 50–60° zu erwärmen. Obwohl die Cellobiose ihrerseits aus der Oktaacetyl-cellobiose des Cellulose-Abbaus dargestellt werden muß und die Ausbeute an reinem Amino-Derivat nicht wesentlich besser als beim vorigen Verfahren ist, so bietet dieser Weg doch den Vorteil, daß das Endprodukt schneller rein zu erhalten ist.

²⁾ Die obigen Formeln sollen nicht zum Ausdruck bringen, ob es sich bei den Produkten um α - oder β -Formen handelt, oder ob II in der Osimin-Form vorliegt.

An sich sollte man erwarten, daß schon die Oktaacetyl-cellobiose bei analoger Reaktion mit flüssigem Ammoniak zur 1-Amino-cellobiose führt, da die Acetoxy-Gruppe am C¹-Atom analog verseift wird, wie die übrigen, und anschließend Reaktion zum 1-Amino-Derivat eintreten muß. Es zeigte sich jedoch, daß bei Verwendung von Oktaacetyl-cellobiose die Ausbeuten an 1-Amino-Derivat viel schlechter als bei Verwendung von Acetobromcellobiose oder freier Cellobiose waren. Als Nebenprodukte bildeten sich 2 Isomere des Dicellobiosyl-imins, von dem insgesamt eine α,α -, eine α,β - und eine β,β -Form möglich sind. Die beiden Isomeren zeigten folgende Daten:

1: Schmp. etwa 220° (Zers.); $[\alpha]_D^{20}$: +4.5° (Wasser)

2: Schmp. etwa 180° (Zers.); $[\alpha]_D^{20}$: +30° (Wasser)

Bei der Umsetzung mit Acetobromcellobiose wurde nur das Isomere 1 gewonnen. Nach dem gleichen Verfahren kann die 1-Amino-lactose erhalten werden.

Es wurden weiterhin bisher nicht bekannte *N*-Substitutionsprodukte der 1-Amino-cellobiose (*N*-Glykoside) durch Kondensation der Cellobiose mit den betreffenden primären bzw. sekundären Aminen synthetisiert, und zwar die 1-Anilino-cellobiose, die 1-*p*-Toluidino-cellobiose, die 1-Äthylamino-cellobiose und die 1-Piperidino-cellobiose. Über ihre Darstellung und ihre Eigenschaften unterrichtet der Versuchsteil.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Bereitstellung von Mitteln.

Beschreibung der Versuche

1-Amino-cellobiose (F.)³⁾: 2 g Acetobromcellobiose werden fein gepulvert und unter Feuchtigkeitsausschluß in 120 ccm flüssiges Ammoniak eingetragen. Unter Umschütteln tritt Lösung ein. Das Ammoniak wird langsam verdampfen gelassen, der zurückbleibende Sirup in absol. Methanol gelöst und sofort mit absol. Äther ausgefällt. Sodann wird der Niederschlag zur Entfernung von Dicellobiosyl-imin mit absol. Methanol übergossen, durch Einleiten von trockenem Ammoniak in Lösung gebracht und i. Vak. stark eingengt. Das ausfallende Kristallinat wird abgesaugt und nach dem gleichen Verfahren bis zur Analysenreinheit umkristallisiert. Die reine 1-Amino-cellobiose ist bei dieser Arbeitsweise in Methanol-Ammoniak nur sehr schwer löslich. Ausb. 500 mg (50% d. Th.); Schmp. 180° (Zers.). $[\alpha]_D^{20}$: +20° (Wasser).

C₁₂H₂₃O₁₀N (341.3) Ber. C 42.2 H 6.8 N 4.1 Gef. C 40.8 H 6.52 N 4.1

Dicellobiosyl-imin (F.)³⁾: 3 g Acetobromcellobiose werden in 200 ccm flüssigem Ammoniak, wie im vorstehenden Versuche beschrieben, umgesetzt. Der nach dem Verdampfen des Ammoniaks erhaltene Sirup wird mehrfach in absol. Methanol aufgenommen und i. Vak. zur Trockne gedampft. Zuletzt wird in absol. Methanol gelöst und mit absol. Äther gefällt. Das so erhaltene Rohprodukt ist in Methanol unlöslich. Beim mehrmaligen Umkristallisieren aus Methanol-Ammoniak (siehe oben) erhält man das Dicellobiosyl-imin als farbloses Kristallinat in einer Ausbeute von 1 g (70% d. Th.); Schmp. 170° (Zers.). Das Produkt ist, nach dem Schmelzpunkt zu urteilen, nicht ganz rein (s. unten). $[\alpha]_D^{20}$: +4.5° (Wasser).

C₂₄H₄₃O₂₀N (665.6) Ber. C 43.3 H 6.5 N 2.1 Gef. C 43.0 H 7.1 N 2.1

1-Amino-cellobiose (P.)³⁾: 7 g Cellobiose werden in 70 ccm absol. Methanol, das mit trockenem Ammoniak bei Zimmertemperatur gesättigt ist (etwa 40 Gew.-% NH₃), in einem Bombenrohr bei 50° 72 Stdn. erhitzt. Beim Abkühlen auf -15 bis -20° kristalli-

³⁾ (F.) = Diplomarbeit R. Frier, Münster 1950; (P.) = Dissertat. E. Plate, Münster 1951; (H.) = Diplomarbeit A. Hiller, Münster 1950.

siert die 1-Amino-cellobiose fast vollständig aus und ist nach dem Absaugen und Auswaschen mit absol. Methanol meist analysenrein. Enthält das Produkt größere Mengen an Dicellobiosyl-imin, so kann es nach dem oben beschriebenen Verfahren gereinigt werden; Schmp. 180–182° (Zers.). $[\alpha]_D^{20}$: +20.0° (Wasser).

$C_{12}H_{23}O_{10}N$ (341.2) Ber. C 42.2 H 6.8 N 4.1 Gef. C 42.0 H 6.8 N 4.0

1-Amino-oktaacetyl-cellobiose (P.): 100 mg 1-Amino-cellobiose werden unter Eiskühlung mit einem Gemisch von 1 ccm Acetanhydrid und 2 ccm trockenem Pyridin übergossen und 48 Stdn. im Kühlschrank aufbewahrt ($t = 3-4^\circ$). Sodann wird die Lösung mit Chloroform aufgenommen, mehrmals mit Wasser und Soda-Lösung ausgewaschen, getrocknet und i. Vak. eingedampft. Der Rückstand wird durch Umkristallisieren aus Chloroform-Ligroin gereinigt; Ausb. 170 mg, Schmp. 188°. $[\alpha]_D^{20}$: -7.5° (Chlf.).

$C_{28}H_{39}O_{18}N$ (677.5) Ber. C 49.6 H 5.8 N 2.0 Gef. C 48.8 H 5.0 N 2.0

Umsetzung von Oktaacetyl-cellobiose mit Ammoniak-Methanol (P.): 6 g Oktaacetyl-cellobiose werden in 60 ccm 40-proz. methanol. Ammoniak-Lösung im Bombenrohr 120 Stdn. auf 50° erhitzt. Beim Abkühlen auf -15 bis -20° kristallisiert nur eine kleine Menge 1-Amino-cellobiose aus, die abgesaugt wird. Die restliche Lösung wird i. Vak. eingeeengt und zur Entfernung des Acetamids das Kohlenhydrat-Umsetzungsprodukt mit 40 ccm Essigester versetzt. Darauf wird noch mehrmals mit Methanol verrieben. Es bilden sich Kristalle, die vom Öl abgetrennt werden. Gesamtausb. an 1-Amino-cellobiose 300 mg (10% d. Th.). Aus dem restlichen Öle werden durch Umkristallisieren aus Methanol-Ammoniak, wie oben beschrieben, 750 mg Dicellobiosyl-imin gewonnen (25% d. Th.); Schmp. 209–210° (Zers.). $[\alpha]_D^{20}$: $+4.5^\circ$ (Wasser).

$C_{24}H_{43}O_{16}N$ (665.6) Ber. C 43.3 H 6.5 N 2.1 Gef. C 43.2 H 6.4 N 2.2

Aus der Mutterlauge wird eine isomere Verbindung vom Schmp. 180° (Zers.) in einer Ausbeute von 165 mg (5.5% d. Th.) erhalten. $[\alpha]_D^{20}$: $+30^\circ$ (Wasser).

Gef. C 42.5 H 7.2 N 2.1

1-Amino-lactose (P.): 4 g Lactose werden in analoger Weise, wie bei der Cellobiose beschrieben, mit 40-proz. methanol. Ammoniak-Lösung im Bombenrohr bei 50° umgesetzt und das Reaktionsprodukt aufgearbeitet. Beim Abkühlen erhält man 2 g und durch Einengen der Mutterlauge 1 g 1-Amino-lactose-hydrat (etwa 75% d. Th.), die sofort analysenrein sind. $[\alpha]_D^{20}$: $+38.5^\circ$ (Wasser).

$C_{12}H_{22}O_{10} \cdot H_2O$ (359.3) Ber. C 40.1 H 7.0 N 3.9 Gef. C 40.5 H 6.8 N 3.8

1-Anilino-cellobiose (H.)⁹⁾: 5 g Cellobiose werden in 20 ccm frisch dest. Anilin und 3 ccm Wasser unter starkem Rühren langsam im Glycerinbad auf 125° (Badtemperatur) erhitzt. In 50–60 Min. geht die Cellobiose in Lösung. Nach weiteren 10–15 Min. wird abgekühlt und mit Äther bis zur Trübung versetzt. Die bald einsetzende Kristallisation ist nach 3–4 tägigem Stehenlassen im Kühlschrank beendet; Ausb. 5.6 g (92% d. Th.). Es wird aus Methanol-Äther umkristallisiert. Reinstprodukt 4.5 g (74% d. Th.); Schmp. 133–135° (Zers.). $[\alpha]_D^{20}$: -62.3° (Wasser).

$C_{18}H_{27}O_{10}N$ (417.4) Ber. C 51.8 H 6.5 N 3.35 Gef. C 51.6 H 7.0 N 3.25

1-p-Toluidino-cellobiose (H.): 4 g Cellobiose werden mit 30 ccm 75-proz. Alkohol und 6 g p-Toluidin unter Rückfluß gekocht und die Temperatur des Heizbades langsam auf 135° gesteigert, wobei der Alkohol abdestilliert. Nach etwa 5 Stdn. wird abgekühlt, mit etwas Äther bis zur Trübung versetzt und im Kühlschrank für 3 Tage aufbewahrt. Das krist. Rohprodukt (4.2 g; 83% d. Th.) wird dreimal aus Methanol-Äther umkristallisiert; Ausb. 3.6 g (71% d. Th.), Schmp. 122–123° (Zers.). $[\alpha]_D^{20}$: -65.8° (Wasser).

$C_{19}H_{29}O_{10}N$ (431.4) Ber. C 52.9 H 6.8 N 3.2 Gef. C 52.7 H 6.7 N 3.1

1-Äthylamino-cellobiose (H.): 5 g getrocknete Cellobiose werden mit 10 g Äthylamin 1 Tag geschüttelt. Es wird mit dem gleichen Vol. Äther versetzt und einige Tage im Kühlschrank aufbewahrt. Der ausgefallene Sirup wird mit 50 ccm Äther bis zur beginnenden Kristallisation verrieben und diese im Kühlschrank beendet. Ausb.

5.1 g (95% d.Th.). Es wird aus heißem absol. Äthanol umkristallisiert. Ausb. 4.2 g (78% d.Th.); Schmp. 110—112° (Zers.). $[\alpha]_D^{20}$: -7.8° (Wasser).

$C_{14}H_{27}O_{10}N$ (369.4) Ber. C 45.5 H 7.4 N 3.8 Gef. C 46.1 H 7.9 N 3.7

1-Piperidino-cellobiose (H.): 5 g Cellobiose werden in 75 ccm absol. Äthanol und 40 ccm Piperidin 3 Stdn. unter starkem Rühren auf dem Wasserbade erhitzt. Dann wird i. Vak. auf die Hälfte eingedampft und das Reaktionsprodukt im Kühlschrank auskristallisieren gelassen. Ausb. 4 g (67% d.Th.), dreimal aus Methanol-Äther umkristallisiert 2.9 g (49% d.Th.); Schmp. 158—160° (Zers.). $[\alpha]_D^{20}$: +3.2° (Wasser).

$C_{17}H_{31}O_{10}N$ (409.4) Ber. C 49.9 H 7.6 N 3.4 Gef. C 50.3 H 7.7 N 3.5

165. Fritz Micheel und Franz-Peter van de Kamp: Die Umsetzung von Proteinen mit Aminosuckern

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

(Eingegangen am 29. April 1952)

Es werden Kondensationsprodukte von 1-Amino-*d*-glucose, 1-Amino-cellobiose und *d*-Glucosamin mit Proteinen dargestellt. Die colorimetrischen Methoden zur Bestimmung von Zuckern und Glucosamin in Proteinen werden einer eingehenden und kritischen Überprüfung unterzogen und die Fehlerquellen untersucht.

In einer kurzen Mitteilung¹⁾ wurde darüber berichtet, daß Proteine sich in wäßriger Lösung mit 1-Amino-*d*-glucose unter Aufnahme von Glucose-Resten umsetzen. Nach dem damaligen Stande der Untersuchungsmethodik ergaben sich gewisse Regelmäßigkeiten in der Kohlenhydrat-Aufnahme bei verschiedenen Proteinen, die im Zusammenhange mit deren Molekulargewichten zu stehen schienen.

Die Menge des aufgenommenen Kohlenhydrates wurde nach der Orcinmethode²⁾ bestimmt, und zwar gelangte ein Stufenphotometer (Leitz) zur Anwendung, das allein seinerzeit zur Verfügung stand. Da die erhaltenen Versuchsergebnisse bei Verwendung verschiedener 1-Amino-monosaccharide und -disaccharide³⁾ jedoch widerspruchsvoll waren, wurden die Untersuchungen mit dem inzwischen zur Verfügung stehenden Stufenphotometer nach Pulfrich-Zeiß (später auch mit photoelektrischem Vorsatzgerät) und dem Spektralphotometer der Firma Unicam (Cambridge) einer gründlichen kritischen Nachprüfung und Erweiterung unterzogen. Insbesondere mit letzterem Instrument gelang es durch Aufnahme der gesamten Absorptionskurven, ein klares und zuverlässiges Bild über die von den Proteinen aufgenommenen Kohlenhydratmengen zu gewinnen. Es zeigte sich, daß nicht nur der Kohlenhydratanteil der erhaltenen Kohlenhydrat-Eiweiß-Verbindungen mit Orcin eine charakteristische Absorption gibt, sondern daß auch die Hydrolysenprodukte der Eiweißstoffe eine gewisse, jedoch bei den einzelnen Versuchen nicht immer gleichartige Absorption im sichtbaren Gebiete geben. Diese lassen sich im Leitzschen Stufenphotometer auch bei Verwendung der Farbfilter nicht genügend von der Kohlenhydrat-Orcin-Färbung trennen. Besser geht dies mit dem Zeiß-Pulfrich-Photometer, wenn auch in recht mühevoller Weise, während es mit dem Unicam-Instrument

¹⁾ F. Micheel u. B. Herold, Naturwiss. **36**, 157 [1949].

²⁾ M. Sörensen u. G. Haugaard, Biochem. Ztschr. **260**, 247 [1933].

³⁾ E. Plate, Dissertat., Münster 1951, Diplomarbeiten T. Lüßling, Münster 1950, A. Hiller, Münster 1950, K. Schröder, Münster 1950, E. Neufeld, Münster 1951.