

Mit *S*-[2.3.4-Trichlor-phenyl]-thioglykolsäure¹⁵): Die Gußstahlbombe mit 5 g Säure¹⁰) vom Schmp. 147°, gelöst in 200 ccm HF, stellte man 5 Stdn. ins siedende Wasserbad. Der nach dem Abrauchen hinterbliebene Rückstand (3-Oxy-5.6.7-trichlorthionaphthen¹⁶) wurde in verd. Natronlauge aufgeschlämmt und mit einem Überschuß $K_3[Fe(CN)_6]$ oxydiert. Das schmutzige violette Reaktionsprodukt kochte man mit Methanol aus, um die Ausgangssäure abzutrennen. Die noch enthaltenen anorgan. Verunreinigungen blieben zurück, als das Rohprodukt nunmehr mit 50 ccm Nitrobenzol ausgekocht wurde. Im heißen Nitrobenzol lösten sich dabei 2.7 g des entspr. Thioindigos (5.5'.6.6'.7.7'-hexachlor-thioindigo); beim Erkalten kristallisierten 1.2 g wieder aus.

242. Kurt Heyns und Karl-Heinz Meinecke: Über Bildung und Darstellung von *d*-Glucosamin aus Fructose und Ammoniak

[Aus dem Chemischen Institut der Universität Hamburg]

(Eingegangen am 27. August 1953)

Bei der Umsetzung von Fructose mit wäßrigem Ammoniak sowie insbesondere auch mit wasserfreiem flüssigen Ammoniak entsteht *d*-Glucosamin. Die Identifizierung erfolgte durch das analytische und chromatographische Verhalten sowie durch Darstellung des nach Kupplung mit Phenylisocyanat und Ringschluß mit Essigsäure erhaltenen 1-Phenyl-4-[*d*-arabo-tetraoxybutyl]-imidazolons-(2) und durch Überführung in die *N*-Carbobenzoxy-Verbindung. Die biochemischen Zusammenhänge der Hexosamin-Bildung werden erörtert.

Die Aminozucker sind als Bausteine vieler bedeutungsvoller biologischer Strukturen wie der Insekten- und Pilzchitine, von Mucopolysacchariden und immunspezifischen Bakterienpolysacchariden, der Hyaluronsäure, der Mucoitin- und Chondroitinschwefelsäuren, des Heparins und eines neuerdings von R. Kuhn¹⁾ beschriebenen Bifidus-Faktors der Frauenmilch weit verbreitet, ohne daß man bisher hinreichend begründete Vorstellungen von der biochemischen Entstehung dieser Stoffgruppe entwickeln konnte. Auch aus Abbauprodukten, die die überraschend große chemische Instabilität des freien Glucosamins unter physiologischen Bedingungen zeigten, konnten K. Heyns, Ch.-M. Koch und W. Koch²⁾ keine schlüssigen Hinweise über eine etwaige Umkehrung derartiger Umwandlungen für den Hexosamin-Aufbau entnehmen. Aus diesen Untersuchungen wird jedoch verständlich, in welchem Ausmaß das Glucosamin-Molekül durch die in allen vorstehend aufgeführten Strukturen vorliegende *N*-Acetylierung stabilisiert wird.

Für die Aminozucker stehen zwei Aufbauwege chemisch und biochemisch im Vordergrund der gegebenen Möglichkeiten, und zwar einmal der Aufbau aus kleineren Kohlenstoffketten wie aus C_4 - und C_3 - oder aus C_3 - und C_2 -Anteilen, z. B. aus Triose und Serin, wobei dann immer die Aminogruppe aus einer α -Aminosäure in die 2-Stellung der C_6 -Kette gelangen würde. Anhaltspunkte für derartige Umsetzungen konnten wir nicht auffinden; auch war bisher die dann irgendwie doch noch als Zwischenprodukt zu erwartende Glucosaminsäure weder bei Aufbau- noch bei Abbauprodukten nachweisbar. Ein anderes wahrscheinlicheres Aufbauprinzip ist mit der Annahme gegeben, daß eine Aminogruppe in eine bereits vorhandene C_4 -Kette einer Hexose eingeführt wird.

Es ergab sich daraus die Frage, in welchem Umfang Carbonylgruppen in Verbindungen der Kohlenhydratreihe enzymatischen Transaminierungen zugänglich sind. Wir konnten feststellen, daß weder Glucosamin noch Glucosaminsäure mit α -Ketoglutaräure noch

¹⁵) C. 1929 II, 352 (Engl. Pat. 287 858). ¹⁶) C. 1927 I, 1227 (Amer. Pat. 1590 685).

¹⁾ Angew. Chem. 64, 493 [1952].

²⁾ Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., im Druck.

umgekehrt α -Ketogluconsäure, α -Ketogulonsäure, Sorbose, Fructose und Glucose mit *l*-Glutaminsäure einer Umaminierung unter den zwischen Ketosäuren und Aminosäuren üblichen Bedingungen unterliegt³⁾.

Es blieb nun noch die Möglichkeit einer Bildung der Amino Zucker entweder durch eine direkte enzymatische Aminierung von Hexosen oder durch Vermittlung eines Aminogruppen-Donators, wie er beispielsweise im Glutamin, Asparagin, Citrullin, Lysin u. a. vorliegen könnte. Bei der Durchführung entsprechender Ansätze machten wir die überraschende Feststellung, daß bei Einwirkung von Ammoniumchlorid auf Fructose i. Ggw. von Phosphat eine Substanz entsteht, die auf dem Papierchromatogramm sowohl beim Anfärben mit Ninhydrin als auch mit ammoniakalischer Silbernitratlösung das gleiche Verhalten wie Glucosamin zeigt⁴⁾. Die Umsetzung erfolgt sowohl bei p_H 7.2 als auch bei p_H 6.6 ohne Beteiligung von Organextrakten, jedoch nur i. Ggw. von Phosphat. Es ließ sich dann zeigen, daß die Umsetzung von Fructose bei Einwirkung von 10-proz. wäßrigen Ammoniak – also bei höheren p_H -Werten – auch ohne Phosphatzusatz erfolgt⁴⁾. In diesem Falle erhält man jedoch zugleich eine teilweise Epimerisierung der Fructose in andere Zucker in bekannter Weise⁵⁾, wobei insbesondere Glucose und Mannose entstehen. Da sich aus Glucose in ähnlicher Weise im alkalischen Bereich Fructose bildet, läßt sich eine Hexosamin-Entstehung auch bei Einwirkung von 10-proz. Ammoniak auf Glucose erreichen⁴⁾, nicht hingegen bei 48stdg. Behandlung von Glucose mit Ammoniumchlorid plus Phosphatzusatz bei p_H 7.2 in wäßriger Lösung^{4a)}. Dies Verhalten zeigt eindeutig, daß nur nach vorheriger Umwandlung des Aldozuckers in die Ketose eine Hexosamin-Bildung erfolgen kann⁶⁾. Sie gelangt jedoch über die Entstehung weniger Prozente nicht hinaus, da die leichte Zersetzlichkeit des freien Glucosamins in wäßrigen Lösungen²⁾ während seiner Bildung bereits in gewissem Umfang zum Abbau führt und damit eine Anreicherung über einen optimalen Anteil hinaus verhindert.

Um der leichten Zersetzlichkeit des Amino Zuckers Rechnung zu tragen, untersuchten wir weiterhin die Umsetzung der Fructose mit wasserfreiem flüssigen Ammoniak, worin sich die Zucker klar und höchstens unter ganz schwacher Gelbfärbung auflösen. Da das Analysenverfahren nach Elson und Morgan auch in der von uns benutzten Variante nach Schloss⁷⁾ auf Aminozucker durch Fructose (vor allem auch i. Ggw. von Phosphat) gestört wird,

³⁾ K. Heyns u. W. Koch, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 288, 272 [1951].

⁴⁾ Vergl. auch K. Heyns u. W. Koch, Z. Naturforsch. 7b, 486 [1952].

^{4a)} Es sei jedoch ausdrücklich erwähnt, daß wir im Falle der Umsetzung von Glucose das Glucosamin bisher nicht durch Isolierung und Derivat-Gewinnung eindeutig nachweisen konnten.

⁵⁾ C. A. Lobry de Bruyn u. W. A. van Ekenstein, Recueil trav. chim. Pays-Bas 14, 78, 156, 203 [1895]; Ber. dtsh. chem. Ges. 28, 3078 [1895]; vergl. auch L. Hough, J. Jones u. E. Richards, J. chem. Soc. [London] 1952, 3854.

⁶⁾ Einer neuerdings von Ch. E. Becker u. H. G. Day, J. biol. Chemistry 201, 795 [1953], erörterten biochemischen Glucosamin-Bildung über *d*-Glucoson als dabei auftretendem Zwischenprodukt vermögen wir nicht beizutreten.

⁷⁾ L. A. Elson u. W. Th. J. Morgan, Biochem. J. 27, 1824 [1933]; B. Schloss, Analytic. Chem. 28, 1321 [1951].

wurde nach dem Verdampfen des Ammoniaküberschusses eine Aufteilung des erhaltenen Rückstandes mittels Ionenaustauschers vorgenommen, was sich für die präparative Aufarbeitung gleichfalls als geeignet erwies. Bei Anwendung eines Kationenaustauschers wird der Aminozucker praktisch vollständig festgehalten, während die normalen Zucker hindurchlaufen. Nach Elution vom Austauscher erhielten wir nach der kolorimetrischen Bestimmung zunächst etwa 13–14 % Ausbeute an Aminozucker.

Die Papierchromatogramme der Reaktionslösungen und der Aminozucker-Eluate lassen nach dem Einsprühen mit Ninhydrin neben dem Fleck in Höhe des Glucosamins noch zwei wesentlich schwächere Flecke mit geringeren R_f -Werten erkennen. Die Lösungen nach Durchlaufen des Austauschers, welche die neutralen Zucker enthalten, zeigen außer der unveränderten Fructose eine Reihe weiterer Flecke im Papierchromatogramm an, von denen einer wieder der Glucose zuzuordnen ist. Ein Bilanzversuch zeigte (vergl. Versuchsteil), daß unter diesen Umständen noch etwa 60 % Fructose unverändert geblieben sind.

Bei der Untersuchung der Umsetzung von Fructose mit wasserfreiem Ammoniak unter verschiedenen Bedingungen im Autoklaven bei Variation von Druck, Temperatur, Konzentrationsverhältnissen und Reaktionsdauer zeigte sich, daß um 100° C die höchste Hexosaminausbeute um 35 % entsteht. Eine weitere Steigerung ist weder durch Zusätze von Natriumamid, von wasserentziehenden Mitteln wie Natriumhydroxyd oder extrem lange Einwirkungsdauer des Ammoniaks erreichbar. Läßt man jedoch die Umsetzung in flüssigem Ammoniak i. Ggw. von Ammoniumchlorid erfolgen, so steigt die Aminozuckerausbeute bei einem Mischungsverhältnis von Fructose : Ammoniumchlorid = 1:1 auf ähnliche Werte über 30 % an, ohne daß es erforderlich ist, die Reaktionstemperatur zu erhöhen, wodurch das Arbeitsverfahren wesentlich erleichtert wird.

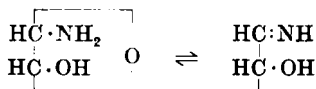
Erwähnt seien hier auch Umsetzungen von Fructose mit Ammoniumchlorid oder Alanin bei höheren Temperaturen im Schmelzbereich der Substanzgemische unterhalb der Zersetzungspunkte, z. B. bei 75–85°. Über diese Untersuchungen, bei denen gleichfalls Glucosamin nachweisbar ist, wird an anderer Stelle berichtet. Auf den engen Zusammenhang der Umsetzungen zwischen den Carbonylgruppen von Kohlenhydraten und freien Aminogruppen proteinogener Herkunft mit den ernährungsphysiologisch so bedeutungsvollen „Bräunungsreaktionen“ von der Art der Maillard-Reaktion sei hier lediglich hingewiesen⁸⁾. Die von uns festgestellte Hexosaminbildung aus Ketosen und Ammoniak sowie die leichte Zersetzlichkeit dieser Körperklasse²⁾ dürfte eine wichtige Grundreaktion hierbei darstellen.

Die Umsetzung von Hexosen mit Ammoniak zu Aminozuckern ist, wie an anderer Stelle⁴⁾ auseinandergesetzt, mehrdeutig und ermöglicht im Falle der Umsetzung der Fructose mit Ammoniak neben der Bildung von Glucosamin und Mannosamin^{8a)} auch noch die Entstehung von Keto-Ammoniak-Verbindungen — etwa in der Art, wie aus *d*-Glucose und

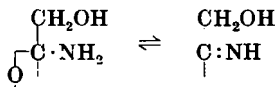
⁸⁾ Vergl. die zusammenfassende Übersicht mit ausführlicher Literaturzitierung von J. P. Danehy u. W. W. Pigman, *Advances of Food Research* **3**, 241 [1951], ferner *Annu. Rev. Biochem.* **20**, 317 [1951].

^{8a)} Nachdem E. Fischer u. H. Leuchs (*Ber. deutsch. chem. Ges.* **36**, 24 [1903]) bei der Hexosamin-Synthese aus *d*-Arabinose über die Cyanhydrin-Reaktion lediglich Glucosamin erhalten konnten, ist dessen Bildung gegenüber dem epimeren Mannosamin sterisch offenbar stark begünstigt.

Ammoniak über den Aldehyd-Ammoniak „Glucosylamin“ entstehen kann —, die entweder cyclisch mit einer NH_2 -Gruppe am C^1 oder auch als Imine formuliert werden⁹⁾.



Aus Glucose soll mit flüssigem Ammoniak nach Muskat¹⁰⁾ Glucosylamin in glatter Reaktion entstehen, dessen *N*-Acetyl-Derivat¹¹⁾ nach den Ergebnissen der Perjodat-Spaltung nach C. Niemann und J. T. Hays Pyranose-Struktur¹²⁾ besitzt. Bei der Einwirkung von Ammoniak auf Fructose müßte man entsprechend mit der primären Entstehung von „Fructosylamin“ rechnen¹³⁾:



Nach unseren Feststellungen ist ein derartiges Fructosylamin bisher noch niemals erhalten oder beschrieben worden, so daß sich die Fructose in dieser Hinsicht offenbar völlig anders verhält als Glucose. In dem stark sauren Aminozuckereluat, wie es vom Ionenaustauscher bei unserem Aufarbeitungsgang abgetrennt wird, könnte eine derartige Keto-Ammoniak-Verbindung schon deshalb nicht vorliegen, da sich diese empfindlichen Substanzen bereits mit verdünnten Säuren unter Ammoniak-Rückbildung spalten¹¹⁾. Das papierchromatographische Erscheinungsbild der Aminozucker wird also durch Verbindungen vom Typ des Glucosyl- oder Fructosylamins nicht gestört.

Zur eindeutigen Identifizierung des bei der Umsetzung von Fructose mit Ammoniak gebildeten und über Austauschere abgetrennten Aminozuckers wurden Derivate hergestellt und mit entsprechenden Verbindungen verglichen, die aus *d*-Glucosamin aus Hummerschalen hergestellt worden waren. Durch Umsetzung mit Phenylisocyanat gelangt man über das entsprechende Harnstoff-Derivat nach Behandeln mit Essigsäure unter Ringschluß zum 1-Phenyl-4-[*d*-arabo-tetraoxybutyl]-imidazol-(2)¹⁴⁾, das aus beiden Präparaten mit völlig übereinstimmenden Eigenschaften erhalten wurde. Aus Isoglucosamin müßte ein entsprechendes Imidazol-(2) mit dem Phenylrest in 3-Stellung entstehen; ferner würde eine Keto-Ammoniakverbindung andersartig reagieren, so daß derartige Verbindungen ausgeschaltet sind. Andererseits geben *d*-Glucosamin und sein Epimeres, das *d*-Mannosamin, das gleiche 1-Phenyl-4-[*d*-arabo-tetraoxybutyl]-imidazol-(2), so daß ein weiteres Derivat zur Unterscheidung zwischen diesen beiden Aminozuckern herangezogen werden mußte. Hierzu erwies sich die *N*-Carbobenzoxy-Verbindung als geeignet¹⁵⁾. Sie konnte

⁹⁾ C. A. Lobry de Bruyn u. A. P. N. Franchimont, *Recueil Trav. chim. Pays-Bas* **12**, 286 [1893].

¹⁰⁾ J. E. Muskat, *J. Amer. chem. Soc.* **56**, 693 [1934]; vergl. jedoch W. Wayne u. H. Adkins, *J. Amer. chem. Soc.* **62**, 3314 [1940].

¹¹⁾ P. Brigl u. H. Keppler, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **180**, 38 [1929].

¹²⁾ *J. Amer. chem. Soc.* **62**, 2960 [1940].

¹³⁾ „Fructosamin“ hingegen ist die Bezeichnung für 1-Desoxy-1-amino-fructose: $\text{H}_2\text{N} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CO} \cdot \text{CHOH}$., gleich „Isoglucosamin“. Über *N*-Aryl-*d*-fructosylamine vergl. C. P. Barry u. J. Honeyman, *J. chem. Soc. [London]* **1952**, 4147.

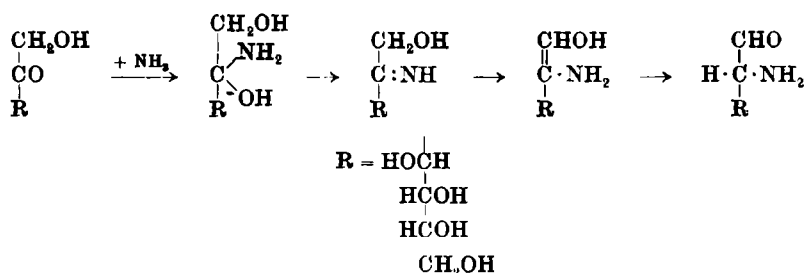
¹⁴⁾ H. Steudel, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **84**, 370 [1901/1902].

¹⁵⁾ E. Chargaff u. M. Bovarnick, *J. biol. Chemistry* **118**, 421 [1937].

eindeutig als Derivat des *d*-Glucosamins mit dem entsprechenden Vergleichspräparat identifiziert werden. Eine Monocarbobenzoxy-Verbindung mit einer anderen optischen Drehung wurde nicht isoliert. Es erscheint daher unwahrscheinlich, daß *d*-Mannosamin bei der Umsetzung von *d*-Fructose mit Ammoniak neben *d*-Glucosamin in größerer Menge entsteht (vergl. ^{8a}). Die Hydrierung des *N*-Carbobenzoxy-*d*-glucosamins mit Palladium-Katalysator in 2 *n* Salzsäure ergab Glucosamin, das durch die optische Drehung eindeutig nachgewiesen werden konnte.

Bei der Aufarbeitung des Reaktionsproduktes, das nach der Umsetzung mit Carbobenzoxychlorid erhalten worden war, wurde eine weitere Verbindung abgetrennt, die wir nach Analyse und Molekulargewicht sowie auf Grund der Tatsache, daß die saure Hydrolyse gleichfalls Glucosamin liefert, als ein Dicarbenzoxy-Derivat des Glucosaminylamins (1-Desoxy-1-amino-glucosamins) auffassen.

Was den Reaktionsmechanismus der Glucosamin-Bildung aus Fructose und Ammoniak betrifft, so wäre folgender, durch in der offenen Form geschriebene Formeln erläuteter Verlauf zu erörtern:



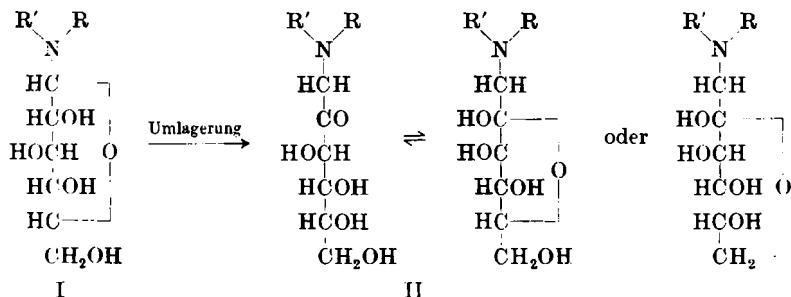
Hiernach würde zunächst nach Ammoniak-Anlagerung an die Carbonylgruppe das oben erwähnte Fructosylamin entstehen, das anschließend Wasser abspaltet und ein Imin bildet, welches dann mit dem benachbarten primären Alkohol am Kohlenstoffatom 1 in Beziehung tritt und über prototrope Umlagerungsvorgänge gewissermaßen intramolekular zum Amin hydriert wird, wodurch am C¹ eine Aldehydgruppe entsteht und wobei offen ist, ob Furanose- oder Pyranose-Strukturen beteiligt sind. Es liegt hier eine gewisse Analogie zum Verlauf der Amadori-Umlagerung vor, die eine Isomerisierung von *N*-substituierten Glucosylaminen („*N*-Glucosiden“) zu Derivaten von 1-Desoxy-1-amino-2-ketosen (Isoglucosaminen) umfaßt.

M. Amadori erhielt aus *d*-Glucose und einem primären Arylamin ein labiles und ein stabiles isomeres Reaktionsprodukt¹⁶). R. Kuhn und Mitarbb.¹⁷) sowie K. Zeile und

¹⁶) Atti Reale Accad. naz. Lincei, Rend. [6] 2, 337 [1925], 9, 68, 226 [1929], 13, 72, 195 [1931].

¹⁷) R. Kuhn u. A. Dansi, Ber. dtsh. chem. Ges. 69, 1745 [1936]; R. Kuhn u. F. Weygand, Ber. dtsh. chem. Ges. 70, 769 [1937]; R. Kuhn u. L. Birkofer, Ber. dtsh. chem. Ges. 71, 621 [1938]; F. Weygand, Ber. dtsh. chem. Ges. 73, 1259 [1940].

W. Kruckenberg¹⁸⁾ stellten fest, daß das eine Isomere das *N*-Glucosid (I, R = Aryl, R' = H) und das andere ein Derivat der 1-Desoxy-1-amino-2-ketose (II) darstellt:



Nachdem die Umlagerung zunächst an das Vorliegen von *N*-Aryl-substituierten (Glucosylaminen gebunden schien, konnten Hodge und Rist¹⁹⁾ Bedingungen angeben, unter denen auch sekundäre Amine und aliphatisch substituierte Amine am C¹ der Glucose eine Umlagerung in Ketose-Derivate ermöglichen.

Während die Darstellung *N*-substituierter Glucosylamine aus Aldose und jeweiligem Amin in guten Ausbeuten meist leicht durchführbar ist, verläuft die Darstellung von analogen *N*-substituierten Fructosylaminen schwieriger oder gar nicht²⁰⁾. Erst kürzlich konnten Barry und Honeyman¹³⁾ Bedingungen auffinden, unter denen *N*-Aryl-*d*-fructosylamine aus Fructose und Arylamin (z. B. Anilin) erhältlich sind²¹⁾, von denen jedoch eine Umlagerung in *N*-substituierte Aldosamin-Derivate nicht bekannt ist. Während also die Umsetzung von Fructose mit Ammoniak zum Aldosamin führt, entsteht andererseits aus Glucose und Ammoniak ein Glucosylamin, das der Umlagerung in eine Ketose nicht unterliegt. Wie sich Fructose unter der Einwirkung von einfachen Aminen verhält, wird zur Zeit weiterhin geprüft.

Möglicherweise müssen zum Verständnis der Reaktion Fructose + NH₃ ⇌ Glucosamin + H₂O in flüssigem Ammoniak auch noch andere Gesichtspunkte einbezogen werden als die Umwandlungen bei der Amadori-Umlagerung, und zwar Gleichgewichtsbetrachtungen. Setzt man nämlich freies *d*-Glucosamin mit einem Überschuß an flüssigem Ammoniak bei Zusatz einer Spur Wasser um, so sind nach Aufarbeitung und Abtrennung des Glucosamins durch Ionenaustauscher papierchromatographisch mindestens 4 Substanzflecke beim Ansprühen mit ammoniakalischer Silbernitratlösung zu erkennen, von denen sich der größte der Fructose und ein anderer der Glucose zuordnen läßt. Jedenfalls verläuft die Umwandlung unter diesen Bedingungen anders als bei der raschen Zersetzung von Glucosamin in wäßrigen Lösungen, bei der Fructose nicht nachweisbar ist²⁾.

Über die Frage, inwieweit eine Glucosaminbildung aus Fructose und Ammonium-Ionen oder durch Vermittlung anderer NH₂-Gruppen-Donatoren biochemisch abläuft, geben unsere Versuche keine Auskunft. Im Organismus wird das bei physiologischen p_H-Werten besonders i. Ggw. von Phosphat aerob und anaerob sehr labile Glucosamin durch *N*-Acetylierung stabilisiert und zugleich aus Bildungsgleichgewichten entfernt. T. C. Choú und M. Soodak konnten zeigen, daß Glucosamin durch Taubenleberextrakte i. Ggw. von Coenzym A und einer Transacetylase aus *Clostridium Kluveri* in *N*-Acetylglucosamin übergeführt wird²²⁾.

¹⁸⁾ K. Zeile u. W. Kruckenberg, Ber. dtsh. chem. Ges. 75, 1127 [1942].

¹⁹⁾ J. E. Hodge u. C. E. Rist, J. Amer. chem. Soc. 74, 1494 [1952], 75, 316 [1953].

²⁰⁾ Vergl. F. Weygand, W. Perkow u. P. Kuhner, Chem. Ber. 84, 594 [1951].

²¹⁾ Vergl. auch B. Helferich u. W. Portz, Chem. Ber. 86, 604 [1953].

²²⁾ T. C. Chou u. M. Soodak, J. biol. Chemistry 196, 105 [1952].

In einer Reihe weiterer Versuche überprüften wir das Verhalten einer Anzahl anderer Zucker und Zuckerabkömmlinge in Analogie zur beschriebenen Umsetzung der Fructose mit Ammoniak. Die Auswertung der mit Ninhydrin einerseits und in anderen Ansätzen mit Kohlenhydrat-Reagenzien eingesprühten Papierchromatogramme ergab, daß Sorbose, Glucose, Mannose, Arabinose, Xylose, Glucuronsäure und Ascorbinsäure sich mit flüssigem Ammoniak unter Bildung eines oder mehrerer Reaktionsprodukte umsetzen. Im Falle der Sorbose entstehen drei verschiedene NH_2 -haltige (Ninhydrin-positive) Substanzen, bei der Ascorbinsäure mehrere. Ein Teil der Flecke ist wahrscheinlich den entsprechenden Aldehyd- oder Keto-Ammoniak-Verbindungen zuzuordnen. Saccharose und Inulin reagieren nicht mit Ammoniak. Untersuchungen über die Natur der in den vorstehenden Fällen erhältlichen Umsetzungsprodukte sind im Gange.

Beschreibung der Versuche

Umsetzung von Fructose mit flüssigem Ammoniak unter verschiedenen Bedingungen

Über Natriumhydroxyd getrocknetes Ammoniak-Gas wurde in mit Aceton-Kohlensäure gekühlten Fällen kondensiert und anschließend in das Reaktionsgefäß übergetrieben. Im allgemeinen wurden für 200 mg Fructose zwischen 10 und 60 ccm flüssiges Ammoniak verwendet. Unter Ausschluß von Feuchtigkeit ließ man das Ammoniak nach der Einwirkung langsam bei Zimmertemperatur abdampfen. Man erhielt je nach der Reinheit des verwendeten Fructosepräparates einen farblosen bis gelbbraunen Sirup. Um das Ammoniak möglichst weitgehend zu entfernen, wurde der Kolben evakuiert und anschließend 24 Stdn. in einem Vakuum-Exsiccator über Phosphorpentoxyd aufbewahrt und der Sirup in 10 ccm Wasser gelöst. Die alkalische Lösung wurde neutralisiert oder noch besser mit verd. Salzsäure schwach angesäuert auf eine Säule gebracht, die mit einer wäßrigen Anquellung von 6 g des sauren Kationenaustauschers Lewatit S 100²³) (etwa 15 ccm Volumen) gefüllt war. Es erfolgte dabei eine Trennung der neutralen Zucker vom Glucosamin, das vom Austauscher gebunden wurde. Durch Waschen mit etwa 500 ccm Wasser bei einer Tropfgeschwindigkeit von 20 Tropfen/Min. wurden alle neutralen Substanzen aus der Säule entfernt. Anschließend ließ sich der Aminozucker mit etwa 250 ccm Salzsäure eluieren. Das Eluat wurde neutralisiert und auf 1000 ccm verdünnt. Die quantitative Bestimmung des Glucosamins erfolgte nach dem von Schloss modifizierten Verfahren von Elson und Morgan⁷).

Aus 0.20 g Fructose entstanden 0.032 g Glucosamin-Hydrochlorid (Tafel 1, a). Gab man zur Fructose nur so viel Ammoniak, daß der Zucker gerade gelöst wurde, und ließ

Tafel 1. Umsetzung von Fructose mit flüssigem Ammoniak

Nr.	Fructose-Einwaage in g	flüssiges Ammoniak in ccm	entstandenes Glucosamin-HCl in g	Ausbeute %	Besondere Bedingungen
a	0.1999	50	0.0318	14	
b	0.2128	10	0.0245	10	wenig NH_3 , kurze Reaktionszeit
c	0.1963	50	0.0230	10	5 Tage NH_3 -Einwirkung
d	0.2030	50	0.0280	12	Zusatz von NaOH, Lösung 20 Stdn. in Dewar aufbewahrt
e	0.2036	25	0.0253	11	20 Stdn. bei 20°
f	0.2042	25	0.0325	14	6 Stdn. bei 50°
g	0.2032	25	0.0765	34	6 Stdn. bei 100°
h	0.1941	25	0.0180	8	6 Stdn. bei 125°

²³) Den Farbenfabriken Bayer, Leverkusen, sind wir für Überlassung der Ionenaustauscher dankbar.

man das Ammoniak sofort abdampfen, so sank die Ausbeute (Tafel 1, b). Ebenso verminderte sie sich bei verlängerter Ammoniakwirkung (Tafel 1, c).

Die Umsetzungen bei erhöhter Temperatur und unter Druck wurden in einem 25-cm-Autoklaven durchgeführt (Tafel 1, e, f, g, h), ebenso diejenigen i. Ggw. von Ammoniumchlorid (Tafel 2). Man füllte flüssiges Ammoniak in den bereits vorgekühlten Autoklaven zur eingewogenen Fructose und brachte ihn langsam auf die jeweilige Temperatur. Nach 6 Stdn. ließ man erkalten und arbeitete das Reaktionsprodukt wie oben angegeben auf (Ausb. s. Tafel 1).

Tafel 2. Umsetzung von Fructose mit flüssigem Ammoniak in Gegenwart von Ammoniumchlorid

Nr.	Fructose, Einwaage in g	NH ₄ Cl, Einwaage in g	Mol- Verhältnis Fructose: NH ₄ Cl	fl. NH ₃ in ccm	entstandenes Glucosamin- HCl in g	Aus- beute %
i	0.1820	0.0536	1 : 1	80	0.0707	33
k	0.1818	0.1071	1 : 2	80	0.0516	24
l	0.1796	0.2755	1 : 5	80	0.0622	29
m	0.1799	0.5385	1 : 10	80	0.0655	31
n	0.1805	0.0543	1 : 1	25	0.0128	6

(6 Stdn. bei 100°)

Wurde im Versuch i das Ammoniumchlorid durch Ammoniumacetat ersetzt, so erhielten wir Glucosamin in einer Ausbeute von 20%.

Die analytische Aufarbeitung der Ansätze erfolgte jeweils in der nachstehend für den Versuch a der Tafel 1 ausgeführten Weise:

2000 mg Fructose wurden im Überschuß flüssigen Ammoniaks gelöst, das Ammoniak nach Stehenlassen über Nacht abgedampft und der Kolbeninhalt anschließend 20 Stdn. im Vakuum-Exsiccator über Diphosphorpentoxyd gehalten. Der Rückstand wurde mit 100 ccm Wasser aufgenommen (Reaktionslösung). 10 ccm hiervon wurden auf eine Säule von Lewatit S 100 (15 ccm, etwa 6–8 g Harz) gegeben, mit 500 ccm dest. Wasser gewaschen (Durchlauflüssigkeit). Die Säule wurde dann mit 250 ccm 2 n Salzsäure eluiert (Aminozucker-Eluat) und das Eluat auf 500 ccm aufgefüllt. In den 3 Flüssigkeiten, Reaktionslösung, Durchlauf-Flüssigkeit und Aminozucker-Eluat, wurden analytische Bestimmungen nach üblichen Methoden von Gesamtstickstoff, NH₃-Stickstoff, Reduktion nach Willstätter-Schudel auf Aldehydzucker und nach Bertrand auf Gesamtreduktion sowie Glucosamin nach Elson und Morgan durchgeführt. Folgende Werte wurden ermittelt und auf die jeweiligen Gesamt mengen umgerechnet:

	Reaktions- lösung	Durchlauf- Flüssigkeit	Amino- zucker-Eluat
1. Gesamt-N (Kjeldahl)	147 mg	12 mg	61 mg
2. NH ₃ -N	45 "	0 "	26 "
3. gebundener N (Diff. 1–2)	102 "	12 "	35 "
4. Reduktion nach Bertrand, ber. auf C ₆ - Ketose	2045 "	1350 "	—
5. Reduktion nach Willstätter-Schudel ber. auf C ₆ -Aldose	1124 "	69 "	—
6. Differenz 4–5	921 "	1281 "	—
7. Glucosamin	—	—	264 "
Glucosamin-HCl	—	—	318 "

Da Fructose unter den Bedingungen der Bestimmung nach Willstätter-Schudel²⁴) einen Reduktionswert von 1.7% ergibt, wurde dieser Betrag von dem gefundenen Wert abgezogen, um einen korrigierten Fructosewert zu erhalten. In der Reaktionslösung und der Durchlauf-Flüssigkeit lassen sich Glucosamin-Bestimmungen nicht durchführen, da sie von Fructose gestört werden; die im Aminozucker-Eluat ermittelte Glucosaminmenge entspricht einem Mindestwert, da die Zersetzlichkeit des Glucosamins zu berücksichtigen ist. In dem hier analysierten Versuch wurden 13–15% Glucosamin ermittelt; der höhere Wert für gebundenen Stickstoff weist darauf hin, daß offensichtlich größere Mengen vorgelegen haben. Aus den Werten ergibt sich der jeweilige Anteil an vorhandenem gebundenen Stickstoff (Zeile 3) aus der Differenz der Werte für den Gesamtstickstoff und des bei der Vorbehandlung nicht restlos entfernten Ammoniaks. Aus der Differenz der Zeilen 4 und 5 ergibt sich die Menge der nicht umgesetzten Fructose mit einiger durch die Analysenmethode bedingter Streuung zwischen 1000 und 1300 mg, entspr. 50–65% der eingesetzten Fructose.

Die präparative Aufarbeitung von Reaktionslösungen mit hohen Glucosaminanteilen, wie nach Tafel 1, Versuch g, oder Tafel 2, Versuch i, folgt zunächst der angegebenen Arbeitsweise mit dem Ionenaustauscher. Es ist jedoch vorteilhaft, bei der Auftrennung am Austauscher wesentlich rascher zu arbeiten, ohne Rücksicht auf quantitative Adsorption und quantitatives Auswaschen. Weiterhin ist zu beachten, daß nach dem Abdampfen des Ammoniaks immer im sauren Bereich gearbeitet wird. Die Isolierung des Glucosamins als Hydrochlorid erfolgt im übrigen in gleicher Weise, wie es von der Abtrennung aus Chitinhydrolysaten her bekannt ist (vergl. z. B. die von Hudson und Dale²⁵) angegebene Arbeitsweise). Zwischen 60 und 70% des entstandenen Aminozuckers lassen sich gewinnen. Die Entfernung restlicher Beimengungen von Ammoniumchlorid und Natriumchlorid ist verlustreich, so daß zur Analyse nachstehende Derivate herangezogen wurden. Das isolierte, hinreichend aus Wasser umkristallisierte *d*-Glucosamin-Hydrochlorid zeigte folgende Drehung: Anfangswert $[\alpha]_D^{20}$: +89.1°, nach 18 Stdn. $[\alpha]_D^{20}$: +70.7° (Vergleichswerte: *d*-Glucosamin-Hydrochlorid aus Hummerschalen $[\alpha]_D^{25}$: +89.7°, nach 18 Stdn. $[\alpha]_D^{25}$: +71.0°).

$C_6H_{13}NO_5 \cdot HCl$ (215.64) Ber. C 33.42 H 6.54 N 6.50 Gef. C 33.30 H 6.72 N 6.47

Isolierung des mit Phenylisocyanat erhaltenen Derivates des Glucosamins: 20 g Fructose wurden mit 300 g flüssigem Ammoniak, wie voranstehend beschrieben, umgesetzt und entsprechend aufgearbeitet. Das Aminozucker-Eluat wurde weitgehend i. Vak. eingengt. Nach kurzem Stehenlassen im Eisschrank kristallisierten aus der dunkelgefärbten Lösung mehrere g eines Produktes aus, das 72% Hexosamin (nach Elson und Morgan) enthielt. Die Verunreinigungen bestanden im wesentlichen aus Natriumchlorid (aus dem Austauscher) und Ammoniumchlorid. 2 g des abgetrennten Kristallisats wurden nun nach einer Abwandlung der Vorschrift von Stuedel¹⁴) in 20 cm Wasser unter Zusatz von 10 cm *n* Kalilauge gelöst und unter Kühlung mit Eis teilweise mit 1.1 cm Phenylisocyanat in 10 cm Dioxan geschüttelt und zum Harnstoff-Derivat umgesetzt. Das ausgeschiedene Reaktionsprodukt wurde abgesaugt, in 50-proz. Essigsäure heiß gelöst und 2 Stdn. auf dem Wasserbad erwärmt. Nach dem Abkühlen wurde von dem als Nebenprodukt angefallenen Diphenylharnstoff abfiltriert; das Derivat kristallisierte aus dem Filtrat im Eisschrank. Zur Reinigung war es erforderlich, mehrfach aus heißem Alkohol umzukristallisieren. 1.3 g des bei 210° schmelzenden 1-Phenyl-4-[*d*-arabotetraoxybutyl]-imidazolons-(2) wurden erhalten. Den gleichen Schmelzpunkt zeigt die aus *d*-Glucosamin aus Hummerschalen erhaltene Verbindung; Misch-Schmp. 208°.

$C_{13}H_{16}O_5N_2$ (256.3) Ber. C 55.68 H 5.76 N 10.00 Gef. C 55.42 H 5.70 N 10.13

Drehung des isolierten Derivates in wäßriger Lösung im 3-dm-Rohr: $[\alpha]_D^{20}$: +86.8°.

Die Drehung des Vergleichspräparates aus Hummerschalen-Glucosamin betrug $[\alpha]_D^{20}$: +86.8.

Der von Stuedel¹⁴) angegebene Wert +76.9° ist zu berichtigen.

²⁴) F. Auerbach u. E. Bodländer, *Angew. Chem.* **36**, 602 [1923].

²⁵) C. S. Hudson u. S. H. Dale, *J. Amer. chem. Soc.* **38**, 1431 [1916].

Isolierung der *N*-Carbobenzoxy-Derivate des *d*-Glucosamins: 18 g Fructose wurden i. Ggw. von 5.3 g Ammoniumchlorid mit 500 ccm flüssigem Ammoniak umgesetzt (vergl. Tafel 2, Bedingungen des Versuchs i). Sobald das Ammoniak durch Evakuieren weitgehend entfernt worden war, wurde die Lösung neutralisiert, auf 250 ccm verdünnt und ohne weitere Vorbehandlung nach Chargaff und Bovarnick¹⁵⁾ unter Zusatz von 42 g Natriumhydrogencarbonat und Schütteln anteilweise mit 55 g Carbobenzoxychlorid versetzt. Die Abscheidung des Kupplungsproduktes begann nach 1½ Stdn. Der Niederschlag wurde nach Stehenlassen über Nacht im Eisschrank abfiltriert und mit insgesamt 600 ccm Chloroform geschüttelt und gewaschen, um den durch eine Nebenreaktion aus Ammoniumchlorid reichlich entstandenen Carbaminsäurebenzylester herauszulösen. Beim Umkristallisieren des ungelösten Anteils aus 30-proz. Methanol erfolgte eine Aufteilung in zwei verschiedene Produkte. Es schied sich zunächst eine schwerlösliche Substanz (2.3 g) in glänzenden Blättchen ab, die bei 216° schmolz. Beim Kochen mit 2 *n* Salzsäure ging diese Substanz nach und nach in Lösung und ergab auf dem Papierchromatogramm einen Glucosaminfleck sowohl mit Ninhydrin als auch mit ammoniakal. Silbernitratlösung. Aus der Analyse ergab sich die Bruttoformel eines *N,N'*-Dicarbobenzoxy-1-amino-1-desoxy-glucosamins.

$C_{22}H_{28}N_2O_8$ (446.4) Ber. C 59.18 H 5.87 N 6.28 Gef. C 59.12 H 6.10 N 6.05

Mol.-Gew. nach Rast (Campher) 452; die optische Drehung erwies sich als nahe beim Nullwert; $[\alpha]_D^{20}$: +2° (in Pyridin $c=5.07$).

Die beim Einengen erhaltene leichter lösliche Verbindung wurde durch mehrmaliges Umkristallisieren aus 30-proz. Methanol und Wasser gereinigt. Ausb. 6.0 g *N*-Carbobenzoxy-*d*-glucosamin; Schmp. und Misch-Schmp. mit dem aus *d*-Glucosamin aus Hummerschalen erhaltenen Derivat (Schmp. 214°): 214°.

$C_{14}H_{19}O_7N$ (313.3) Ber. C 53.66 H 6.12 N 4.47 Gef. C 53.55 H 6.22 N 4.51

Drehung des isolierten Derivates in trockenem Pyridin im 1-dm-Mikrorohr: $[\alpha]_D^{20}$ (Anfangswert): +62.5°, nach 24 Stdn.: +74.9°. Die Drehung des Vergleichs-Präparates *N*-Carbobenzoxy-*d*-glucosamin beträgt: $[\alpha]_D^{20}$ (Anfangswert): +62.8°, nach 24 Stdn.: +75.4°.

Hydrierung des *N*-Carbobenzoxy-*d*-glucosamins zum *d*-Glucosamin: 0.3651 g *N*-Carbobenzoxy-*d*-glucosamin wurden i. Ggw. von 0.3679 g Palladium-Katalysator auf Kohle (10% Pd.) in 25 ccm 2 *n* Salzsäure 6½ Stdn. bei 40° hydriert; nach dem Abfiltrieren und Einengen der Lösung schieden sich 113 mg reines Glucosamin-Hydrochlorid ab. Die Bestimmung nach Elson und Morgan ergab 0.2472 mg Glucosamin-Hydrochlorid entspr. 98% Ausbeute.

$C_6H_{13}O_5N \cdot HCl$ (215.6) Ber. C 33.42 H 6.54 N 6.50 Gef. C 33.35 H 6.65 N 6.55

Anfangswert der Drehung: $[\alpha]_D^{20}$: 89.4°, nach 18 Stdn.: $[\alpha]_D^{20}$ 70.9°.

Die im allgemeinen Teil in ihren Ergebnissen erwähnten zahlreichen papierchromatographischen Untersuchungen erfolgten in der früher beschriebenen Weise²⁶⁾.

²⁶⁾ K. Heyns u. G. Anders, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 287, 1 [1951]; K. Heyns u. W. Walter, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 287, 15 [1951].