

Aus der Analyse folgt, daß neben dem Mercaptan wieder Dodecylen vorlag.

Dodecan-5-sulfonat: Die Bereitung erfolgte entsprechend wie die der isomeren Verbindungen.

Dodecan-5-sulfochlorid: Die Umsetzung von Dodecan-5-sulfonat mit Phosphorpentachlorid ergab ein Sulfochlorid folgender Zusammensetzung:

Sulfochloridchlor	Gesamtchlor	C-gebundenes Chlor
8.35%	10.7%	2.35%

Auch das Dodecan-5-sulfochlorid konnte durch Destillation bei 10^{-5} Torr ziemlich rein erhalten werden.

Die Arbeiten wurden in den Jahren 1944–1945 durchgeführt.

182. Fritz Micheel und Almuth Klemer: *D-Glucosederivate von Proteinen*

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

(Eingegangen am 6. Februar 1956)

Proteine lassen sich in wäßriger Lösung (mit oder ohne Gegenwart von Natriumhydrogencarbonat) mit *D*-Glucose oder α - (bzw. β -)-*D*-Glucose-1-phosphorsäure kondensieren. Nur ein geringer Teil des aufgenommenen Kohlenhydrats wird durch verd. Säuren abgespalten. Auf Grund des Verhaltens des Lysins unter analogen Bedingungen muß angenommen werden, daß die nicht hydrolysierbaren *D*-Glucoseresste an die ϵ -Aminogruppen der Proteine gebunden sind.

In einer früheren Mitteilung¹⁾ wurde die Darstellung von Verbindungen der *D*-Glucose mit Aminosäuren durch direkte Kondensation der Komponenten beschrieben. Das Lysin reagiert je nach den Arbeitsbedingungen mit einer oder beiden Aminogruppen. Die Glucosylderivate der α -Aminosäuren werden durch wäßrige Säure wieder leicht in die Komponenten gespalten. Unterwirft man jedoch das Di-glucosyl-DL-lysin der Hydrolyse mit verd. wäßriger Säure, so wird nur ein Glucoseresst abgespalten²⁾. Wir halten es mit Rücksicht auf das Verhalten der Glucosederivate der α -Mono-aminosäuren aus Analogiegründen für sehr wahrscheinlich, daß im Lysinderivat nur der an der α -Aminogruppe sitzende Rest abgespalten wird. Ein unabhängiger Beweis dafür konnte jedoch noch nicht erbracht werden. Es gelang uns bisher nicht, das Monoglucosyl-lysin analysenrein zu erhalten. Der zweite Glucosylrest widersteht also der Hydrolyse durch Säuren. Diesen Befunden liegen polarimetrische Messungen an wäßrigen sauren Lösungen des Diglucosyl-lysin zugrunde.—Bei der fraktionierten Fällung des Rohproduktes werden verschieden stark negativ drehende Fraktionen gleicher Zusammensetzung erhalten. Da wir vom DL-Lysin ausgingen, ist dies auf die Bildung diastereomerer Formen zurückzuführen. Es handelt sich um die α - bzw. β -*D*-Glucosederivate des *D*- und des *L*-Lysins. Bei der Hydrolyse dreier Fraktionen ($[\alpha]_D$: -34° ; -26° ; -19.4°) mit Wasser oder verdünnter Säure werden Endwerte von $[\alpha]_D$: -4.8° bzw. $\pm 0^\circ$ bzw. $+3.8^\circ$ erhalten. Ein Diglucosyl-lysin, das aus zwei *D*-Glucose-

¹⁾ F. Micheel u. A. Klemer, Chem. Ber. 85, 1083 [1952].

²⁾ Dissertat. A. Klemer, Münster 1952.

resten und einem D-Lysinrest aufgebaut ist, müßte bei vollständiger Hydrolyse einen Enddrehwert von $[\alpha]_D : +42.6^\circ$ zeigen, während das Diastereomere aus zwei D-Glucoseresten und einem L-Lysinrest $[\alpha]_D : +33.6^\circ$ nach vollständiger Hydrolyse zeigen müßte. Da jedoch die obigen Enddrehwerte erhalten wurden, handelt es sich beim Monoglucosyl-lysine um ein Gemisch der diastereomeren Mono-D-glucosyl-D- bzw. -L-lysine. Dies wird durch die Elementaranalyse bestätigt.

Wir haben diese Methode der Kondensation von Zuckern mit Aminosäuren auch auf Proteine übertragen, in der Erwartung, daß insbesondere die ϵ -Aminogruppen der Lysinreste in Proteinen Anlaß zur Bildung von Kohlenhydrat-Eiweißverbindungen geben würden. Dies ist nun in der Tat der Fall. Die Reaktion von Casein mit freien Zuckern in hochkonzentrierter Lösung bei höherer Temperatur, die meist zu braun gefärbten Stoffen führt, ist in letzter Zeit verschiedentlich bearbeitet worden³⁾. Vielfach werden die Komponenten lediglich mit einem Feuchtigkeitsgehalt von 40–70% in fester Form erhitzt. Wir möchten annehmen, daß unsere im folgenden beschriebenen Glucose-Proteinverbindungen Vorläufer der so erhaltenen Stoffe sind. Werden Lösungen von Albumin (aus Pferdeserum) oder Gelatine in Wasser bei Gegenwart von Natriumhydrogencarbonat mit Glucose langsam bei Zimmertemperatur i. Vak. eingedampft und sodann im Exsiccator völlig getrocknet, so findet man, daß diese Präparate nach dem Wiederauflösen und einer mehrtägigen Dialyse einen erhöhten Kohlenhydratgehalt besitzen. Ein kleiner Teil des aufgenommenen Kohlenhydrats wird bei p_H 3.5 in Wasser und Dialyse bei diesem p_H -Werte abgespalten. Dieser Anteil verhält sich also so, wie die Glucosereste an den α -ständigen Aminogruppen der Aminosäuren. Der größere Teil des aufgenommenen Kohlenhydrats widersteht der sauren Dialyse, verhält sich also wie der Glucoserest an der ϵ -Aminogruppe des Lysins. Diese Analogie im Verhalten läßt den Schluß zu, daß es sich bei den Verbindungen der Proteine um Glucosereste handelt, die an ϵ -Aminogruppen von Lysinresten gebunden sind.

Wie in anderem Zusammenhange berichtet werden wird, läßt sich zeigen, daß in den so erhaltenen Glucose-Proteinverbindungen aus der Proteinkomponente im Falle der Gelatine Bruchstücke abgespalten werden⁴⁾. Dies ist offenbar auf die Zunahme des p_H -Wertes bis über 8, bedingt durch CO_2 -Abspaltung aus dem Natriumhydrogencarbonat während des Prozesses, zurückzuführen. Man kann die Kondensation von Glucose mit den genannten Proteinen in gleicher Weise auch ohne Zusatz von Natriumhydrogencarbonat ausführen. Die aufgenommene Glucosemenge ist dann etwas geringer. Auch hier ist ein kleiner Anteil des aufgenommenen Kohlenhydrats gegen verdünnte Säure labil, der Rest jedoch stabil. Es lassen sich noch keine Aussagen darüber machen, ob der höhere Kohlenhydratgehalt der bei Gegenwart von Hydrogencarbonat hergestellten Produkte auf eine Verkleinerung des Molekulargewichts der Proteinkomponente zurückgeführt werden kann. Darüber wird später berichtet.

Analoge Versuche wurden mit α - und β -D-Glucose-1-phosphat (bei Gegenwart von Natriumhydrogencarbonat) ausgeführt. Die Phosphorsäure-ester

³⁾ C. H. Lea u. R. S. Hannan, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **4**, 518 [1950]; C. H. Lea, R. S. Hannan u. D. N. Rhodes, *ebenda* **7**, 366 [1951], und frühere Arbeiten.

⁴⁾ Dissertat. A. Heesing, Münster 1955.

werden unter diesen Bedingungen nicht hydrolysiert. Eine Übersicht über die Zusammensetzung der Reaktionsprodukte von Proteinen und Kohlenhydraten gibt Tafel 1.

Tafel 1. Kohlenhydratgehalt in % (Mittelwerte)^{*)} der Umsetzungsprodukte von Gelatine (Gel) und Pferde-Serumalbumin⁵⁾ (Ser-Alb) mit Glucose (1. u. 2.) oder α - und β -D-Glucose-1-phosphat (3.) in Gegenwart (1. u. 3.) oder in Abwesenheit (2.) von Natriumhydrogencarbonat

Protein	Ausgangstoff	Reaktionsprodukte	
		neutrale Dialyse	Dialyse bei p_H 3.5
1. Gel		2.0	1.4
Ser-Alb		1.7	1.4
2. Gel	0.65	1.3	1.1
Ser-Alb	0.07	1.4	1.0
3. Gel		1.5	1.0
Ser-Alb		1.5	1.1

^{*)} Bestimmt nach M. Sörensen u. G. Haugaard⁶⁾. Diese Werte erfassen das *N*-glykosidisch gebundene Kohlenhydrat. Da jedoch die Kondensationsprodukte außerdem die für Amadori-Produkte charakteristische Farb-reaktion mit *o*-Dinitrobenzol geben, dürften noch weitere Zuckerreste gebunden sein, die nach der obigen Methode nur zu einem sehr geringen Teil erfaßt werden.

Beschreibung der Versuche

Das Natriumsalz des *N,N'*-Di-glucosyl-DL-lysins wird, wie früher¹⁾ beschrieben, dargestellt und in Fraktionen gleicher analytischer Zusammensetzung durch Fällen der methanolischen Lösung der Verbindung mit Alkohol, Alkohol-Äther-Gemisch und Äther zerlegt (siehe i. c.¹⁾). Die zuerst ausgefallene Fraktion hat den am stärksten negativen Drehwert.

Frakt. I $[\alpha]_D^{18}$: -34.5° (*W.*, *c* = 1)

Frakt. II $[\alpha]_D^{18}$: -26.5° (*W.*, *c* = 1)

Frakt. III $[\alpha]_D^{18}$: -19.4° (*W.*, *c* = 1)

Frakt. II zeigt nach nochmaligem Umfällen: $[\alpha]_D^{18}$: -30.5° (*W.*).

Hydrolyse der Frakt. I, II und III in Wasser

Temp.	Zeit (in Stdn.)	$[\alpha]_D$ Frakt. I <i>c</i> = 1.2	$[\alpha]_D$ Frakt. II <i>c</i> = 1.57	$[\alpha]_D$ Frakt. III <i>c</i> = 1.09
18°	0 ¹⁰	-34.0°	-26.0°	-19.4°
18°	20	-22.8°	-16.5°	-10.0°
18°	44	-14.0°	-10.0°	-3.1°
18°	69	-8.0°	-2.8°	$+3.6^\circ$
18°	94	-5.0°	● 0.0°	$+3.8^\circ$
18°	140	-4.8°	● 0.0°	$+3.8^\circ$

Hydrolyse der Frakt. II und III in verdünnter Säure

Je 20 mg von Frakt. II und III werden in einem 2-cm-Kolben in ca. 1 cm Wasser gelöst, durch Zugabe von 3 Tropfen konz. Salzsäure angesäuert und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

¹⁾ Präparat der Behringwerke, Marburg.

⁶⁾ Biochem. Z. 260, 247 [1933].

Temp.	Frakt. II		Frakt. III	
	Zeit in Stdn.	$[\alpha]_D$	Zeit in Stdn.	$[\alpha]_D$
18°	0 ¹⁵	-10.0°	0 ¹⁵	-1.0°
18°	1 ²⁰	- 6.8°	8 ²⁰	+3.0°
18°	7 ⁴⁵	- 3.0°	22	+3.8°
18°	22	+ 0.0°		

Mono-D-glucosyl-DL-lysin: Eine Lösung von 320 mg Di-D-glucosyl-DL-lysin (als Natriumsalz) in 15 ccm Wasser wird 3 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Anschließend wird gut ausgewaschene Bäckerhefe hinzugegeben und 4 Tage im Brutschrank bei 33° vergoren. Nach Zugabe von etwas Kohle wird zentrifugiert, das Filtrat i. Vak. bei 35° Badtemperatur zur Trockene gedampft und der Rückstand im Exsiccator über P₂O₅ getrocknet. Das getrocknete Produkt wird auf der Schüttelmaschine mit absol. Methanol extrahiert, aus dieser Lösung mit Äther das Mono-D-glucosyl-DL-lysin (als Natriumsalz) gefällt und durch Umfällen aus Methanol mit Äther gereinigt.



Der Kohlenhydratgehalt dieses Produktes läßt sich nach der Methode von M. Sörensen und G. Haugaard⁶⁾ (Orcin/H₂SO₄) nicht quantitativ bestimmen⁷⁾. Auch das Di-D-glucosyl-DL-lysin zeigt dabei einen viel zu geringen Kohlenhydratgehalt. Mit Ehrlichs Reagens wird eine Färbung erhalten, die aber nicht stärker ist als die von einem Gemisch entsprechender Mengen von Lysin und Glucose erhaltene. Der positive Ausfall der Reaktion mit *o*-Dinitrobenzol macht es wahrscheinlich, daß der Zuckerrest nach Art der Amadori-Produkte gebunden ist.

Kondensation von D-Glucose bzw. D-Glucose-1-phosphorsäure mit Proteinen

a) bei Gegenwart von NaHCO₃: Das Eiweiß (Pferde-Serumalbumin oder Gelatine) (bis zu 1.5 g) wird mit verschieden großem Überschuß an D-Glucose (s. Tafel 2) bei Gegenwart von Natriumhydrogencarbonat (bis zu 3.5 g) in 35–50 ccm Wasser im Brutschrank bei 30–35° gelöst. Der *p*_H-Wert der Lösung steigt dabei von 7.8 auf etwa 8.4. Die Lösungen werden dann langsam im Exsiccator über Kaliumhydroxyd und zum Schluß über P₂O₅ eingedampft (Dauer 6–16 Tage). Das trockene, gelbe Produkt wird bei 30° in Wasser gelöst und anschließend im rotierenden Cellophanschlauch gegen dest. Wasser dialysiert. Der Schlauchinhalt wird geteilt (A und B). Lösung B wird 6 Tage im rotierenden Cellophanschlauch gegen verd. Salz- oder Essigsäure und anschließend zur Entfernung der Säure 2 Tage gegen dest. Wasser dialysiert.

Lösung A wird unmittelbar, Lösung B nach der Dialyse i. Vak. zur Trockene gedampft. im Exsiccator völlig getrocknet und der Kohlenhydratgehalt der farblosen Produkte nach der Methode von Sörensen und Haugaard⁶⁾ bestimmt.

b) ohne Zusatz von NaHCO₃: Die Mengenverhältnisse von Eiweiß und Glucose sind die gleichen wie oben. Das Eiweiß wird im Brutschrank gelöst und nach Zugabe der D-Glucose die Lösung i. Vak. bei 30° Badtemp. unter Zugabe von Octylalkohol eingeeengt. Anschließend wird das Produkt im Laufe von 5 Tagen im Vak.-Exsiccator getrocknet und, wie vorher beschrieben, aufgearbeitet. Zusammenfassung der Mengenverhältnisse in Tafel 2.

⁷⁾ Siehe die folgende Mittel.: A. Klemer u. F. Micheel, Chem. Ber. 89, 1242 [1956].

Tafel 2. Übersicht über die Versuchsergebnisse

Bei den Versuchen 8 und 9 wurde β -D-Glucose-1-phosphat, bei Versuch 10 α -D-Glucose-1-phosphat, bei den übrigen Versuchen wurde D-Glucose verwendet. Gel = Gelatine, Kohlenhydratgehalt 0.65%, Ser-Alb = Pferde-Serumalbumin, Kohlenhydratgehalt 0.07%

Vers.- Nr.	Kohlen- hydrat g	Eiweißstoff g	Natrium- hydrogen- carbonat g	Dauer des Eindampfens in Tagen	Kohlenhydratgehalt in %	
					vor der sauren Dialyse	nach der sauren Dialyse
1	3.6	1 Gel	0.18	12	1.8	1.3
2	7	1.5 Gel	3.5	16	2.1	1.2
3	7	1.5 Gel	3.5	18	2.1	1.1
4	15	1.5 Gel	3.5	11	1.9	1.7
5	15	1.5 Gel	3.5	Produkt ist leicht gelb gefärbt	1.9	1.7
				11		
6	5	0.6 Ser-Alb	2	6	1.8	1.5
7	10	0.7 Ser-Alb	2	8	1.7	1.3
8	5	0.6 Gel	5	18	1.5	1.0
9	2.4	0.6 Gel	2.2	9	1.4	1.0
10	5	0.6 Ser-Alb	5	16	1.5	1.1
11	7	1 Gel		7	1.3	1.1
12	10	0.7 Ser-Alb		8	1.5	1.0
13	10	0.7 Ser-Alb		13	1.3	0.9
14	10	1 Ser-Alb		6	1.6	1.1

183. Almuth Klemer und Fritz Micheel: Kohlenhydrat-Aminosäure-Verbindungen

[Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Münster (Westf.)]
(Eingegangen am 6. Februar 1956)

D-Glucose und D-Mannose lassen sich mit Sarkosin in Dimethylformamid bei 100° zu dem gleichen Stoffe I kondensieren, der wahrscheinlich durch eine Amadori-Umlagerung entstanden ist. Beim Acetylieren erhält man daraus das kristalline Triacetat eines Lactons (III). Dies geht bei der sauren Verseifung wieder in I über.

Kürzlich erschienene Mitteilungen von A. Abrams, P. H. Lowy und H. Borsook¹⁾ veranlassen uns, über einige seit längerer Zeit vorliegende Teilergebnisse auf diesem Gebiete, insbesondere über eine kristalline 3.4.5-Triacetyl-1-desoxy-1-N-sarkosyl-lacton-2-D-fructose zu berichten. Vor eini-

¹⁾ J. Amer. chem. Soc. **77**, 4795 [1955]; J. biol. Chemistry **215**, 111 [1955].