

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-

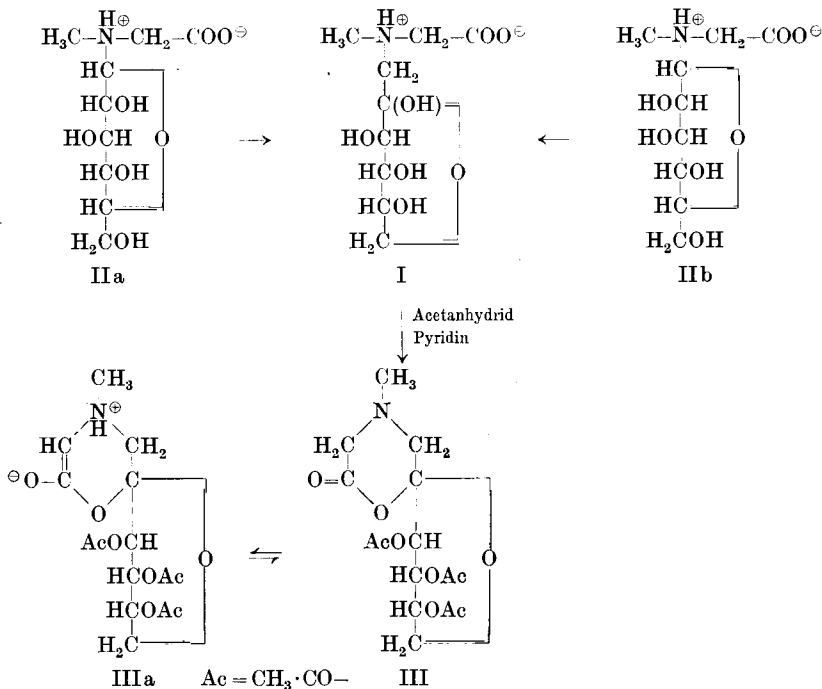
¹⁾ J. Amer. chem. Soc. **77**, 4795 [1955]; J. biol. Chemistry **215**, 111 [1955].

gen Jahren beschrieben wir *N*-Glykoside verschiedener Aminosäuren, die beim langsamen Eindampfen der wäßrigen Lösungen der Komponenten in Gegenwart von Natriumhydrogencarbonat entstehen²⁾. Diese Verbindungen zeichneten sich durch eine leichte Hydrolysierbarkeit in wäßriger neutraler, saurer oder schwach alkalischer Lösung aus. Die Untersuchung des Di-D-glucosyl-DL-lysins ergab, daß bei der Verseifung mit Wasser oder verdünnter Säure nur einer der beiden D-Glucosereste abgespalten werden kann, und daß der verbleibende D-Glucoserest an der ε-Aminogruppe des Lysins sitzt³⁾.

Im folgenden werden Verbindungen aus Monosacchariden und Sarkosin beschrieben, die gegen Wasser und wäßrige Säure beständig sind. Man erhält sie beim Erhitzen von Sarkosin mit überschüssiger D-Glucose, D-Mannose oder D-Galaktose in Dimethylformamid bei etwa 100°. Das Verfahren wurde zuerst bei der Darstellung von Kondensationsprodukten der Cellobiose mit Sarkosin bzw. Glykokoll erprobt⁴⁾.

Da die überschüssigen Hexosen durch Vergären mit Hefe entfernt werden können, sind die bisher nicht kristallinen, aber analysenrein erhaltenen Kondensationsprodukte gegen die Enzyme der Hefe stabil.

Für die Struktur der Verbindungen halten wir folgende Formeln für die besten:



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

3) F. Micheel u. A. Klemer, Chem. Ber. 89, 1238 [1956], vorstehend.

4) P. Ristič, Dissertat. Münster 1954.

Da I sowohl aus D-Glucose als aus D-Mannose in gleicher Ausbeute erhalten wird, dürften die primär entstandenen N-Glykoside (IIa bzw. IIb) durch eine Amadori-Umlagerung in I (1-Desoxy-1-N-sarkosyl-D-fructose) übergegangen sein. Für die Formulierung von I sprechen fernerhin folgende Gründe:

Methylenblau wird in der Kälte, wie durch Amadori-Produkte, reduziert, ebenso Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung oder o-Dinitrobenzol. Der Aminosäurerest wird, im Gegensatz zu den N-Glykosiden, durch verdünnte Säuren auch in der Wärme nicht abgespalten. Infolgedessen ist es nicht möglich, den Kohlenhydratrest nach der Orcinmethode⁵⁾ zu bestimmen. Es bilden sich dabei nur etwa 10% des zu erwartenden Farbstoffes, vermutlich infolge tiefergehender Zersetzung von I durch die anzuwendende starke Säure.

I reagiert nahezu neutral; durch überschüssiges Alkali tritt tiefergreifende Veränderung ein.

Eine weitere Stütze für die Formel I bildet die Acetylierung mit Acetanhydrid und Pyridin. Man erhält ein kristallines Triacetyl-lacton, dem die Formel III zukommen dürfte (3.4.5-Triacetyl-1-desoxy-1-N-sarkosyl-lacton-2-D-fructose). Für Formel III, deren pyranoider Ring als nicht bewiesen gelten kann, jedoch wahrscheinlich ist, sprechen außer der Bruttozusammensetzung folgende Eigenschaften: es liegen 3 Acetylgruppen vor; der Stoff ist neutral; gegenüber Alkali zeigt er die gleiche Empfindlichkeit wie I. Bemerkenswert ist der stark negative spezif. Drehwert von -176° (Chf.) (I dreht -50° in Wasser). Dies dürfte für ein von der β -D-Fructose abgeleitetes Lacton sprechen. Der Lactonring wird durch Wasser bei Gegenwart von Säure leicht aufgespalten. Dies steht in Übereinstimmung mit dem Verhalten der δ -Lactone. Mit 2.5 n HCl bei Zimmertemperatur werden auch die Acetylgruppen abgespalten, und das Verseifungsprodukt ist identisch mit I (Drehwert und papierchromatographische Analyse).

Da III in Wasser nur schwer löslich ist und darin fast neutral reagiert, hingegen in verdünnter Säure gut löslich ist, halten wir die tautomere Formel IIIa für die bessere. Mit Säuren bilden sich dann zunächst Salze von III, die anschließend hydrolysiert werden. Die Ausbeute von III ist recht gering. Dies ist verständlich, wenn man berücksichtigt, daß das glykosidische Hydroxyl des D-Fructoserestes in Konkurrenzreaktion zur Lactonisierung acetyliert wird und nach seiner Veresterung eine Lactonbildung nicht mehr möglich ist.

1-Desoxy-1-N-sarkosyl-D-fructose (I): 1 g Sarkosin und 10 g getrocknete, feingepulverte D-Glucose oder D-Mannose werden in 30 ccm Dimethylformamid suspendiert und unter kräftigem Rühren und Ausschluß von Luftfeuchtigkeit langsam auf 100° erhitzt. Im Verlaufe von 10 Min. tritt Lösung ein. Es wird noch $\frac{1}{2}$ Stde. erhitzt, dann abgekühlt und das Dimethylformamid i. Vak. abgedampft. Der zurückbleibende gelbe Sirup wird mehrere Male mit Methanol aufgenommen und das Lösungsmittel wieder i. Vak. abgedampft. Der trockene Sirup wird sodann in 700 ccm dest. Wasser und 50 ccm

⁵⁾ M. Sörensen u. G. Haugaard, *Biochem. Z.* **260**, 247 [1933].

Leitungswasser gelöst und unter Zusatz von ca. 1 g auf der Zentrifuge gut ausgewaschener Backerhefe und etwas sek.-Natriumphosphat bei 35° vergoren. Nach 5 Tagen konnte papierchromatographisch keine D-Glucose bzw. D-Mannose mehr nachgewiesen werden. Zur Entfernung der Hefe wird mit Aktivkohle behandelt, filtriert und die farblose Lösung i. Vak. bei 30° eingedampft. Zur Entfernung des Wassers wird der zurückbleibende Sirup zweimal mit Methanol aufgenommen und letzteres i. Vak. wieder abgedampft. Aus dem im Exsiccator getrockneten Rückstand wird mit warmem absol. Methanol das Umsetzungsprodukt extrahiert und durch Fällen mit Äther als amorphes, weißes Pulver erhalten. Das mehrmals aus absol. Methanol mit Äther umgefällte Produkt enthält noch papierchromatographisch nachweisbare Spuren von Sarkosin. Ausb. 2 g (ca. 70% d. Th.).

$[\alpha]_D^{20}$: -48° bis -51° (aus Glucose), -48° bis -49° (aus Mannose) (Wasser, $c = 1$).

Der Drehwert ändert sich, sowohl in 2.5 n HCl als in n NaHCO₃, bei Zimmertemperatur in mehreren Tagen nicht.

C₉H₁₇O₇N (251.2) Ber. C 43.02 H 6.82 N 5.58

Gef. C 42.81 H 5.96 N 5.41 (aus Glucose)

Gef. C 43.13 H 7.03 N 5.81 (aus Mannose)

Bildung von D-Glucosazon aus I: 250 mg I werden mit 6.5 ccm einer Lösung von 4 g Phenylhydrazin-hydrochlorid und 5.5 g Natriumacetat (·3H₂O) in 85-proz. Äthanol versetzt und die Lösung auf dem Dampfbad unter Rückfluß erhitzt. Nach ½ Stde. beginnt die Abscheidung des Osazons. Es wird weitere 15 Min. erhitzt. Nach vollständiger Kristallisation im Eisschrank wird abgeseugt und das Rohprodukt aus verd. Äthanol umkristallisiert. Ausb. 50-52% d. Th.; Schmp. und Misch.-Schmp. 204-205°.

3.4.5-Triacetyl-1-desoxy-1-N-sarkosyl-lacton-2-D-fructose (III): 2 g I (aus Glucose heritet) werden mit einem auf 0° gekühlten Gemisch von 13 ccm Acetanhydrid und 16 ccm absol. Pyridin unter Eiskühlung übergossen und im Eisschrank 10 Tage aufbewahrt (die Substanz löst sich im Verlaufe von einigen Stunden). Die Lösung wird sodann mit 25 ccm kaltem Chloroform verdünnt, unter Schütteln in einem Scheidetrichter auf Eis gegossen und die Chloroformlösung sofort 3mal mit Eiswasser ausgeschüttelt. Die gesammelten wäßrigen Lösungen werden einmal mit Chlf. und die vereinigten Chlf.-Auszüge 2mal mit Eiswasser ausgewaschen. Nach dem Trocknen mit CaCl₂ wird i. Vak. bei 25° Badtemp. das meiste Chlf. verdampft, der zurückbleibende Sirup mehrere Male mit reichlich absol. Äthanol zur Entfernung von Pyridin und Essigsäure aufgenommen und die Lösung wieder abgedampft. Der so gereinigte Sirup wird in 10-15 ccm warmem absol. Äthanol gelöst und mit etwas Aktivkohle behandelt. Im Eisschrank kristallisiert aus der Lösung das Acetat aus. Es ist nach 1-2maligem Umkristallisieren aus absol. Äthanol analysenrein. Größte bisher erzielte Ausbeute: 150 mg. Schmp. 198-199° (Zers.) (ab 190-192° färbt sich die Substanz gelb). $[\alpha]_D^{20}$: -176° ± 0.5° (Chlf., $c = 1$). Im Schmelzpunkts-Mikroskop beobachtet man ein langsames Sublimieren der Substanz ab ca. 140°; das isolierte Sublimat schmilzt etwa 2° höher (Zers.).

C₁₅H₂₁O₉N (359.3) Ber. C 50.13 H 5.89 N 3.90 Acetyl 35.94

Gef. C 50.66 H 6.11 N 4.07 Acetyl 38.89

Der zu hohe Acetylgehalt ist dadurch bedingt, daß das Acetat bei der Bestimmung außer Essigsäure noch andere flüchtige Säure abgibt. Das nicht-acetylierte I liefert nämlich unter den Bedingungen der Acetylbestimmung ca. 2-3% flüchtige Säure, als (H₃CO)-berechnet. Nach Abzug dieses Wertes stimmt der obige Acetylgehalt gut mit dem berechneten Wert überein. Das Acetat ist papierchromatographisch einheitlich.

Verseifung von III: 41 mg III werden in 3 ccm 2.5 n HCl gelöst (die Substanz ist darin sehr leicht löslich) und die Drehwertsänderung gemessen:

$[\alpha]_D^{20}$: -111.5° (n. 5 Min.) → -81° (n. 1 Stde.) → -56.5° (n. 5 Stdn.) → -39.5° (n. 24 Stdn., Endwert). Aus diesem Endwert berechnet sich für das entstandene I $[\alpha]_D^{20}$: -56°.

Zum gleichen Endwert kommt man, wenn das Acetat bei gleicher Säurekonzentration durch 3stdg. Erhitzen im Wasserbad bei 50-55° verseift wird. Der Drehwert von I ändert sich unter diesen Bedingungen nicht (siehe oben).

Zur papierchromatographischen Identifizierung des Verseifungsproduktes von III mit I wird die Lösung gefriergetrocknet und der erhaltene Sirup zur Entfernung der Säure zweimal mit Wasser aufgenommen und dieses wieder durch Gefrier Trocknung entfernt. Etwas Salzsäure wird, bedingt durch Salzbildung mit der Aminogruppe der Substanz, festgehalten. Eine 3-proz. wäßrige Lösung der Substanz wird für die papierchromatographische Identifizierung verwendet. Als Vergleichssubstanz dient eine mit wenig Salzsäure versetzte Lösung von I. Das Verseifungsprodukt von III ist papierchromatographisch einheitlich und sein R_F -Wert identisch mit dem von I.

184. Fritz Micheel und Wolfgang Lengsfeld: Über die Reaktionen des D-Glucosamins, II. Mitteil.¹⁾; Verbindungen von D-Glucosamin mit Aminosäuren

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

(Eingegangen am 6. Februar 1956)

1.3.4.6-Tetraacetyl-2-desoxy-2-amino- α -D-glucose-hydrobromid (1.3.4.6-Tetraacetyl- α -D-glucosamin-hydrobromid) (I) geht mit Thiocyanat in 2.3.4.6-Tetraacetyl-2-desoxy-2-amino- β -D-glucose-1-isothiocyant (II) über, wobei ein Oxazolinderivat als Zwischenstufe durchlaufen wird. II wird mit Ammoniak und Aminosäuren zu den entsprechenden Thioharnstoff-Derivaten umgesetzt. II läßt sich ferner zum Isothioharnstoff-Derivat äthylieren (X), und letzteres geht mit Aminosäuren in Guanidin-Derivate über. Im Gegensatz zum Thiocyanat entstehen mit Cyanat oder Phenylisocyanat aus I 2-Harnstoff-Derivate der 2-Desoxy-D-glucose. Sie lassen sich auch auf anderem Wege gewinnen und zeigen eine Reihe von ungewöhnlichen Umsetzungen.

In der I. Mitteilung¹⁾ wurden Umsetzungen des 1.3.4.6-Tetraacetyl- α -D-glucosamin-hydrobromids beschrieben, bei denen als Zwischenstufe Bildung eines Oxazolinringes zwischen der NH_2 -Gruppe am C^2 und der Hydroxylgruppe am C^1 auftritt. Wir zeigen an Hand der im folgenden aufgeführten Synthesen, daß etwas Analoges bei den Umsetzungen von I mit Thiocyanat (Rhodanid) und Cyanat (bzw. organischen Isocyanaten) stattfindet. Rhodanid- und Cyanatrest verhalten sich aber verschieden: aus I mit Silberthiocyanat in Acetonitril wird das 3.4.6-Triacetyl-N-acetyl-2-desoxy-2-amino- β -D-glucose-1-isothiocyant (II) (Formeln siehe Abbild. 1), aus I mit Silbercyanat unter den gleichen Bedingungen die 1.3.4.6-Tetraacetyl-2-desoxy-2-ureido- α -D-glucose (XII) (Formeln siehe Abbild. 2) erhalten. Zunächst dürfte sich in beiden Fällen unter Eliminierung des Brom-Ions das entsprechende Salz (Isothiocyanat bzw. Cyanat) bilden. Entsprechend der wesentlich größeren Reaktionsfähigkeit des Cyanatrestes geht dies Salz in üblicher Weise in das entsprechende Harnstoffderivat über, während das Isothiocyanat nicht mit der Aminogruppe reagiert, sondern in fast quantitativer Ausbeute II nach einem Reaktionsmechanismus bildet, den wir wie folgt über ein Zwischenprodukt mit Oxazolin-Struktur¹⁾ formulieren möchten:

¹⁾ I. Mittell.: F. Micheel, F.-P. van de Kamp u. H. Wulff, Chem. Ber. 88, 2011 [1955].