

LAWRENCE ROSEN, JAMES W. WOODS und WARD PIGMAN

Reaktionen von Kohlenhydraten mit stickstoffhaltigen Substanzen, IV¹⁾

AMADORI-UMLAGERUNG IN PYRIDIN

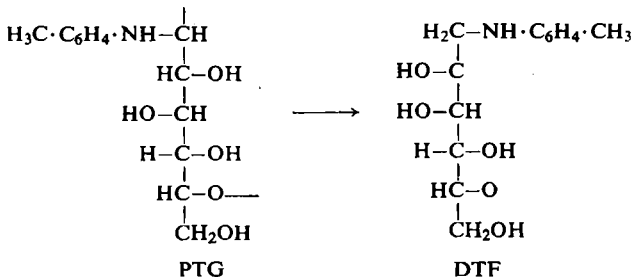
Aus dem Department of Biochemistry, University of Alabama
Medical Center, Birmingham 3, Alabama, USA

(Eingegangen am 2. Februar 1957)

Herrn Professor Dr. B. Helferich zum 70. Geburtstag

1-Desoxy-1-*p*-toluidino-D-fructose (DTF) kann mit 2,6-Dichlorphenol-indo-phenol in alkalischer Lösung unter optimalen Bedingungen mit einer Genauigkeit von etwa $\pm 5\%$ titriert werden. Die unter verschiedenen Reaktionsbedingungen durch Amadori-Umlagerung aus *p*-Toluidin-D-glucosid (PTG) erhaltenen Ausbeuten an DTF wurden mit dieser Methode bestimmt. – Die Amadori-Umlagerung ist von der Basizität der Aminkomponente abhängig und gelingt mit schwach basischen Aminen unter den üblichen Bedingungen nur schlecht. Für PTG erwies sich eine homogene Lösung in Pyridin-Eisessig am günstigsten. Die Umlagerung unterliegt vermutlich einer allgemeinen Säure-Basen-Katalyse; Sekundärreaktionen, die zur Zersetzung des DTF führen, werden durch Pyridiniumchlorid – oder höher aggregierte Salze –, nicht aber durch undissoziierte Essigsäure katalysiert. In salzsaurer Pyridinlösung wird daher die maximal zu erzielende Ausbeute durch das Verhältnis von Bildungs- und Zersetzungsgeschwindigkeit des DTF bestimmt.

Aus D-Glucose entsteht durch Kondensation mit *p*-Toluidin *p*-Toluidin-D-glucosid (PTG). Dessen säurekatalysierte Isomerisierung zu 1-Desoxy-1-*p*-toluidino-D-fructose (DTF) ist ein Beispiel der Amadori-Umlagerung²⁾.



(Die Ringstrukturen wurden willkürlich gewählt)

M. AMADORI³⁾ nahm an, daß beide Isomere Derivate der D-Glucose sind. R. KUHN und F. WEYGAND⁴⁾ zeigten jedoch, daß in saurer Lösung als Endprodukt ein Derivat

¹⁾ III. Mitteil.: W. PIGMAN und K. C. JOHNSON, J. Amer. chem. Soc. **75**, 3464 [1953].

²⁾ Zusammenstellung: J. E. HODGE, Advances Carbohydrate Chem. **10**, 169 [1955]; vgl. ferner I. c.¹⁷⁾, S. 422.

³⁾ Atti Reale Accad. naz. Lincei, Rend. **13**, 72 [1931]; dort frühere Literatur.

⁴⁾ Ber. dtsh. chem. Ges. **70**, 769 [1937].

der D-Fructose entsteht. Es ist dies eine für N-Glykoside allgemeingültige Reaktion⁵⁾. Auch für die „umgekehrte Amadori-Umlagerung“, bei der unsubstituierte⁶⁾ oder N-substituierte D-Fructosylamine^{7,8)} zu den entsprechenden D-Glucosamin-Derivaten isomerisieren, sind Beispiele bekannt. Die jeweiligen Bedingungen, die zur Umlagerung führen, sind in starkem Maße von der Aminkomponente abhängig.

Zur eingehenden Untersuchung der Reaktionsbedingungen und des Mechanismus der Umlagerung sind zwei experimentelle Voraussetzungen erforderlich: Die Reaktion muß in homogener Phase⁹⁾ durchgeführt werden, und es muß eine geeignete analytische Methode zur Verfügung stehen.

BESTIMMUNG VON DTF MIT TILLMANS REAGENS (TR)

Alkalische Lösungen^{5,10)} von 1-Amino-1-desoxy-2-ketosen reduzieren 2,6-Dichlorphenol-indophenol¹¹⁾. Das Fortschreiten der Reduktion kann an der Entfärbung der tiefblauen Lösung verfolgt werden. Die Reaktion verläuft nicht stöchiometrisch¹⁰⁾. Es gelang jedoch, einen befriedigenden Endpunkt zu finden, der eine DTF-Bestimmung im Bereich von 0.4–2.0 mg erlaubt. Dabei beträgt die durchschnittliche Genauigkeit von Doppelbestimmungen ca. $\pm 5\%$.

TR ist nicht spezifisch für N-substituierte 1-Amino-1-desoxy-ketosen; es wird allgemein durch Substanzen mit Reduktoncharakter reduziert^{12,13)}. Die mögliche Anwesenheit störender Stoffe wurde nicht ausgeschlossen. Doch stimmen die Ausbeuten an isoliertem Material mit den durch Titration bestimmten gut überein (Tab. 1). Außerdem reduziert die Reaktionsmischung TR nur in alkalischer, nicht aber in saurer Lösung, während manche Reduktone TR auch im sauren p_H -Bereich reduzieren¹²⁾. Andere störende Substanzen sind höchstens in kleinen Konzentrationen vorhanden.

Tab. 1. Vergleich der durch Titration und Isolierung bestimmten Ausbeuten an DTF

Reaktionspartner*)	% Ausbeute	
	Titration	Isolierung***)
PTG, <i>p</i> -Toluidin**)	35	26
PTG	31	21
PTG	27	22
PTG	25	22
DTF, <i>p</i> -Toluidin**)	87	83
DTF	83	86

*) 0.15 *m* PTG- oder DTF-Lösung; 0.0026 *n* HCl; 30 Min. bei 100°.

***) Um die von WEYGAND¹⁵⁾ angegebenen molaren Verhältnisse zu wahren, wurde ein Überschuß von *p*-Toluidin (0.05 *m*) angewandt. Andere Versuche wurden ohne überschüssiges *p*-Toluidin durchgeführt.

****) Es sind Rohausbeuten angegeben. Beim Umkristallisieren entstanden keine größeren Verluste und auch keine wesentliche Änderung der physikalischen Eigenschaften.

5) J. E. HODGE und C. E. RIST, J. Amer. chem. Soc. **75**, 316 [1953].

6) K. HEYNS und K. MEINECKE, Chem. Ber. **86**, 1453 [1953].

7) J. G. ERICKSON, J. Amer. chem. Soc. **77**, 2839 [1955].

8) J. F. CARSON, J. Amer. chem. Soc. **77**, 1881, 5957 [1955].

9) Die Originalarbeit von AMADORI³⁾ beschreibt die Amadori-Umlagerung in homogener alkohol. Lösung ohne Zugabe eines sauren Katalysators. Dies wurde von KUHN und BIRKOFER¹⁰⁾ wiederholt.

10) R. KUHN und L. BIRKOFER, Ber. dtsh. chem. Ges. **71**, 621 [1938].

11) J. TILLMANS, P. HIRSCH und W. HIRSCH, Z. Unters. Lebensmittel **63**, 1 [1932].

12) F. PETUELY und U. KÜNSSBERG, Mh. Chem. **83**, 80 [1952].

13) H. V. EULER, H. HASSELQUIST und G. HANSHOFF, Ark. Kemi **6**, 471 [1953].

Bei der von H. v. EULER¹³⁾ beschriebenen Methode zur Bestimmung des DTF reduziert D-Fructose TR schneller als D-Glucose. Unter den von uns gewählten Bedingungen besitzen weder D-Glucose noch PTG eine wesentliche Reduktionswirkung gegenüber TR. Somit ist es unwahrscheinlich, daß deren mögliche Umlagerungsprodukte, wie D-Glucoson (oder sein Iminoanaloges) oder Reduktone^{13,14)} die Bestimmung des DTF wesentlich beeinflussen. Allein D-Fructose könnte stören, tritt aber bei der Reaktion nicht auf.

Bei der Titration des DTF in An- und Abwesenheit der verschiedenen Reaktionspartner, Lösungsmittel und bekannter Substanzen, die möglicherweise im Verlaufe der Umlagerung gebildet werden, war keine merkliche Veränderung des Farbstoffverbrauches festzustellen.

UMLAGERUNG VON PTG ZU DTF UNTER HETEROGENEN BEDINGUNGEN

Zur Reaktion wurden die Komponenten auf dem Wasserbad verschmolzen. Die Ausbeuten wurden durch Titration bestimmt und mit den durch Isolierung des DTF nach WEYGAND¹⁵⁾ erhaltenen verglichen (Tab. 1).

Die Kondensation von D-Glucose mit einer Reihe primärer Arylamine führte, in Gegenwart von wenig Salzsäure, in guten Ausbeuten zu den entsprechenden Amadori-Produkten (Tab. 2). Unter diesen an die Methode von WEYGAND¹⁵⁾ angelehnten Standardbedingungen beträgt die Ausbeute an DTF 60--70% und ist mit den von anderen Autoren¹⁵⁾ gefundenen Ausbeuten vergleichbar. Bei *p*-substituierten Aminen steigt die Ausbeute parallel mit der Zunahme der Basizität des Amins an. Diese Abhängigkeit von der Basenstärke des verwendeten Amins steht in Übereinstimmung mit früheren Befunden¹⁶⁾, wonach die Kondensation verschiedener Aldosen mit der sehr schwachen Base *p*-Nitroanilin nur bis zur Stufe des *p*-Nitroanilin-*N*-glykosids führt, während unter denselben Bedingungen stärker basische, primäre Arylamine leicht der Amadori-Umlagerung unterliegen.

Tab. 2. Amadori-Umlagerung von D-Glucose und einigen Aminen unter heterogenen Bedingungen nach WEYGAND, mit Salzsäure als Katalysator

Amin	Ausbeute (%)*)
<i>p</i> -Toluidin	67**)
Anilin	55
<i>p</i> -Bromanilin	34
<i>p</i> -Chloranilin	33
<i>p</i> -Nitroanilin	0***)
<i>N</i> -Methylanilin	0
Diphenylamin	0****)
Di- <i>n</i> -butylamin	0*****)

*) Durch Titration bestimmt.

***) Isolierung ergab 70%.

****) Die Verschmelzung der Komponenten wurde abweichend von den Standardbedingungen durchgeführt.

*****) 83% unverändertes Diphenylamin zurückgewonnen.

*****) 76% unveränderte D-Glucose wiedergewonnen.

14) F. PETUELY und U. KÜNSSLER, Mh. Chem. **84**, 116 [1953].

15) F. WEYGAND, Ber. dtsh. chem. Ges. **73**, 1259 [1940]; S. BAYNE und W. H. HOLMS, J. chem. Soc. [London] **1952**, 3247.

16) F. WEYGAND, W. PERKOW und P. KUHNER, Chem. Ber. **84**, 594 [1951].

Wird D-Glucose und ein Amin anstatt des als Zwischenprodukt gebildeten *N*-Glucosids umgesetzt, so ist die Menge des erhaltenen D-Fructose-Derivats von zwei einander folgenden Reaktionsschritten abhängig: 1. Bildung des intermediären *N*-Glucosids und 2. dessen Umlagerung zum Amadori-Produkt. Bei festgelegter Reaktionszeit könnte eine durch verschiedene Basizität der angewandten Amine¹⁷⁾ bedingte, unterschiedliche Bildungsgeschwindigkeit der *N*-Glucoside die Ausbeute der Umlagerungsreaktion beeinflussen. Es wurden aber mit PTG, wie mit D-Glucose und *p*-Toluidin, unter verschiedensten Bedingungen vergleichbare Ausbeuten erhalten.

Die Ergebnisse könnten auch, falls sich die einzelnen 1-Desoxy-D-fructose-Derivate in ihrem Reduktionsvermögen unterscheiden, verfälscht werden. Doch reduziert 1-*p*-Anisidino-1-desoxy-D-fructose TR in gleichem Maße wie DTF (106%).

Es wurde nicht versucht, außer DTF andere Amadori-Umlagerungsprodukte zu isolieren. WEYGAND¹⁵⁾ gelang die Isolierung der 1-Anilino-1-desoxy-D-fructose als Phenyl-D-mannamin (das er durch Hydrierung erhielt) in einer Gesamtausbeute von 12%; auch die direkte Isolierung der 1-Anilino-1-desoxy-D-fructose wurde beschrieben¹⁸⁾; *p*-Bromanilin-D-glucosid wurde hier erstmalig dargestellt.

Sekundäre Amine reagierten nicht zu Amadori-Produkten. Da reichlich Ausgangsmaterial zurückgewonnen wurde (Tab. 2), ist dies sicher z. T. auf eine erschwerte Bildung der intermediären *N,N*-disubstituierten Glucoside zurückzuführen. Wird Essigsäure in hohen Konzentrationen als Katalysator verwandt, so kann das Amadori-Produkt aus D-Glucose und Methylanilin oder Di-*n*-butylamin mit einer Ausbeute von 50–60% erhalten werden¹⁹⁾. Die Kondensation von Diphenylamin mit D-Glucose wird infolge der schwachen Basizität des Reaktionspartners nur schwer zu erreichen sein¹⁷⁾.

UMLAGERUNG VON PTG ZU DTF IN PYRIDIN

Die Umlagerung des PTG wurde, entsprechend der Methode von WEYGAND, durch Verdünnen mit Methanol und Erhitzen auf 100° versucht. Bei Zugabe von Salzsäure als Katalysator konnte selbst bei verlängerter Reaktionszeit nur 1% DTF durch Titration nachgewiesen werden (Tab. 3). Auch in reinem Pyridin entstand sehr wenig

Tab. 3. Ausbeute*) an DTF aus PTG**) in Pyridin und Methanol bei 100°

	Zusammensetzung des Lösungsmittels (Vol. %)				
	0	25	50	75	100
Pyridin	0	25	50	75	100
Methanol	100	75	50	25	0
<hr/>					
Min. bei 100°	Ausbeute (%)				
30	1	—	10	14	19
120	1	19	30	37	37
240	1	37	42	48	—

*) Durch Titration mit TR bestimmt.

**) 0.074*m* PTG-Lösung; 0.0013*n* HCl.

¹⁷⁾ L. ROSEN, The Carbohydrates, 412 (W. PIGMAN, Ed., Academic Press, New York, 1957).

¹⁸⁾ Y. INOUE und K. ONODERA, persönliche Mitteil. an HODGE, ref. I.c.³⁾, S. 176.

¹⁹⁾ J. E. HODGE und B. E. FISHER, unveröffentlichte Arbeiten, ref. I.c.³⁾, S. 177.

DTF (Tab. 4). Erst in Gegenwart von Salzsäure und Pyridin trat die Umlagerung ein (Tab. 3).

Der Einfluß der Salzsäure auf die Umlagerungsreaktion wurde nun systematisch untersucht. Es ergab sich, daß bei einer Reaktionsdauer von 30 Min. die Ausbeuten in einem weiten Konzentrationsbereich — 0.002 *n* bis 0.14 *n* HCl — etwa 30% betragen (Tab. 4). Bei den höchsten Säurekonzentrationen scheint die maximale Ausbeute schon nach 5 Min. erreicht zu werden.

Tab. 4. Umlagerung von PTG (0.097 *m*) in DTF in saurer Pyridinlösung bei 100°

Reaktionsdauer (Min.)	10	30	120	240	360
	<i>Säure</i>		<i>Ausbeute (%)</i>		
keine		< 1		< 1	
0.00061 <i>n</i> HCl		8			
0.00090 <i>n</i> HCl		12			
0.0018 <i>n</i> HCl	12	27			22
0.0048 <i>n</i> HCl		27			
0.0097 <i>n</i> HCl	10	30	20		20
0.0135 <i>n</i> HCl		29			
0.097 <i>n</i> HCl	10*)	7	3	< 2	< 2
0.00377 <i>n</i> Essigsäure		< 1	< 1		
0.0377 <i>n</i> Essigsäure		3	11	22	
0.377 <i>n</i> Essigsäure		25	53	58	
0.754 <i>n</i> Essigsäure		40	57		

*) Nach 5 Min. 13%.

Die unter verschiedenen Reaktionsbedingungen erzielten variablen Ausbeuten sind offensichtlich die Resultate dreier Reaktionsschritte, deren jeder wieder zu weiteren Nebenreaktionen führen kann: 1) Zersetzung der PTG zu von DTF verschiedenen Produkten; 2) Umlagerung des PTG zu DTF; 3) Zersetzung des DTF. Die Zeitabhängigkeit der Reaktion 3) konnte durch Titration mit TR verfolgt werden (Tab. 5), da die Zersetzungsprodukte nicht oder nur wenig reduzierend wirken, wie aus der guten Übereinstimmung der durch Titration berechneten und durch Isolierung bestimmten Ausbeuten hervorgeht.

Tab. 5. Verlust an DTF beim Erhitzen auf 100° in saurer, 0.097 *m* Pyridinlösung

<i>Säure</i>	<i>Verluste an DTF (%) nach</i>	
	30 Min.	120 Min.
0.0018 <i>n</i> HCl	8	24
0.0097 <i>n</i> HCl	26	63
0.097 <i>n</i> HCl	64	95
0.0377 <i>n</i> Essigsäure	10	21
0.377 <i>n</i> Essigsäure	4	22
0.754 <i>n</i> Essigsäure	7	29
ohne Säurezusatz	6	15

Die Tabellen 4 und 5 zeigen weiter, daß mit steigender Salzsäurekonzentration die Geschwindigkeit der Umlagerung wie auch die Zersetzungsgeschwindigkeit des DTF

wächst. Die in jedem Zeitpunkt vorhandene Menge an DTF wird somit durch das Verhältnis dieser beiden Konkurrenzreaktionen bestimmt.

Eine Verbesserung der Ausbeuten brachte die Verwendung von Essigsäure als Katalysator. Auch in diesem Fall wird durch erhöhte Säurekonzentration die Umlagerungsgeschwindigkeit erhöht (Tab. 4), während bemerkenswerterweise selbst eine 20fache Vermehrung der Essigsäure die Zersetzung des DTF nicht merklich beeinflusst. In essigsäurem Pyridin unterscheiden sich die Verluste an DTF nicht sehr erheblich von denen in reiner Pyridinlösung (Tab. 5).

Die erhöhten Ausbeuten bei Verwendung von Essigsäure als Katalysator, im Vergleich zu den Versuchen mit Salzsäure, sind vermutlich auf eine starke Erniedrigung der Zersetzungsgeschwindigkeit des DTF zurückzuführen. Dieser Effekt der Essigsäure ist überraschend, falls beide Reaktionen einer allgemeinen Säurekatalyse unterliegen.

Nun ist aber aus Leitfähigkeitsmessungen bekannt, daß selbst sehr starke Säuren in Pyridinlösung nur wenig dissoziiert sind, wobei anorganische Säuren eine wesentlich höhere Leitfähigkeit aufweisen als organische²⁰. Weiter fand E. J. COREY²¹, daß im IR-Spektrum einer Lösung von Essigsäure in Pyridin die Acetatbande nicht auftritt. Es ergibt sich daraus als plausible Erklärung der experimentellen Befunde, daß Salzsäure vorzugsweise als Pyridiniumchlorid (oder dessen Aggregate), Essigsäure aber als undissoziierte Säure die Amadori-Umlagerung katalysiert. Das Pyridiniumchlorid beschleunigt ebenso wirksam die Bildung wie die Zersetzung des DTF. Undissoziierte Essigsäure dagegen ist ein schwacher Katalysator für die Umlagerung des PTG in DTF und beeinflusst auch relativ geringer die Zersetzung des Isomerisierungsproduktes.

Die angeführten Ergebnisse machen es wahrscheinlich, daß in der Umlagerung des PTG ein Fall einer allgemeinen Säure-Basen-Katalyse vorliegt. Im Gegensatz zur Reaktivität in saurer Pyridinlösung findet in saurem Methanol keine Reaktion statt, was die Notwendigkeit eines basischen Katalysators vermuten läßt. Die Zersetzung des DTF erfordert als Katalysator eine starke Säure; Essigsäure katalysiert diese Nebenreaktion nicht. Eine zusätzliche Stütze erfahren diese Überlegungen durch die Untersuchung der katalytischen Wirksamkeit einer Reihe schwacher Säuren und ihrer Salze in methanolischer Lösung. Über diese Arbeiten wird später berichtet.

Diese Arbeit wurde durch eine Stiftung der NATIONAL SCIENCE FOUNDATION, USA, und der NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, USA (A-216-C2) unterstützt.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Reduktion von TR durch DTF in alkalischer Lösung

Etwa 30 mg des Natriumsalzes von 2,6-Dichlorphenol-indophenol (Eastman Kodak, White Label) (TR) werden in 500 ccm destilliertem Wasser gelöst und die Farblösung bei 5–8° aufbewahrt.

²⁰) M. M. DAVIES, Trans. Faraday Soc. **31**, 1561 [1935].

²¹) J. Amer. chem. Soc. **75**, 1172 [1953]. Vgl. auch G. M. BARROW, J. Amer. chem. Soc. **78**, 5802 [1956].

Zur Titration vermischt man in einem Reagensglas mit seitlichem Ansatz (20×2.5 cm) 1 ccm der ursprünglichen oder einen aliquoten Teil der verdünnten Reaktionslösung mit 10 ccm Natronlauge. Die Lauge muß so viel Natriumhydroxyd enthalten, daß nach Neutralisation der freien Säure ein Überschuß von 0.9 mÄquiv. besteht. Das Reagensglas wird mit einem doppelt durchbohrten Stopfen verschlossen, durch dessen eine Öffnung Naturgas²²⁾ durch die Lösung geleitet wird, während die andere zur Aufnahme einer Bürette dient. Aus der Bürette gibt man nun die Farbstofflösung rasch in Portionen von 0.50 ccm zu und beobachtet die zur Entfärbung erforderliche Zeit. Der Endpunkt ist dann erreicht, wenn zur Entfärbung eines 0.50-ccm-Anteils 50 oder mehr Sek. benötigt werden; die letzten 0.50 ccm Farbstofflösung werden in den Titer miteinbezogen. Die Farbstofflösung wird vor und nach jeder Titration gegen DTF eingestellt. Für 1 ccm der verdünnten Reaktionsmischung werden im allgemeinen 7–15 ccm TR verbraucht.

Im Verlauf unserer Untersuchungen sank der Titer der TR-Lösung von anfangs 1.00 ccm, was etwa 0.10 mg DTF entspricht, auf 0.048–0.067 mg pro ccm Reagens. Diese Verdünnung erhöhte die Genauigkeit bei Doppelbestimmungen auf ca $\pm 4\%$.

Gelegentlich wichen Doppelbestimmungen um 10% vom Durchschnittswert ab. In manchen Fällen, wenn die Reaktionslösung dunkel gefärbt war, wurde zur Erkennung des Endpunktes mit Wasser verdünnt.

Zur Ausführung einer Analyse werden 5 bis 8 Min. benötigt. Jeweils 10 mg einiger Testsubstanzen, die möglicherweise Zwischenprodukte der Reaktion sind, verbrauchen nicht mehr als 1.0 ccm TR (Titerwert: 1.0 ccm = 0.091 mg DTF). Dagegen sind 10 mg D-Fructose in An- oder Abwesenheit von Toluidin (8 mg) 0.2 mg, und dieselbe Menge D-Glucose weniger als 0.1 mg DTF äquivalent. Jedoch konnte in den papierchromatographisch untersuchten Reaktionsmischungen, bei einer Nachweisgrenze von 1 mg/ccm, keine Fructose gefunden werden.

Läßt man die Lösung nach Beendigung der Reaktion einige Zeit stehen, so wird das Reduktionsvermögen nicht signifikant verändert.

Bildung von DTF unter heterogenen Bedingungen¹⁵⁾

a) 13.9 mMol wasserfreie D-Glucose werden in einem Becherglas mit 18.7 mMol Amin gemischt und nach Zugabe von 0.75 ccm 0.33 *n* HCl (oder 0.70 *n* Essigsäure) 30 Min. im siedenden Wasserbad unter Rühren erhitzt. Die dunkelgefärbte Mischung läßt man auf Zimmertemperatur abkühlen und zerreibt dann mit 10 ccm Äthanol. Nach 24stdg. Aufbewahren bei 22–24° wird in Methanol gelöst, auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt und ein 1 ccm aliquoter Teil mit TR titriert.

b) 13.9 mMol PTG werden in gleicher Weise umgesetzt. Jedoch fügt man hierbei, um das gleiche molare Verhältnis wie in a) aufrechtzuerhalten, 4.9 mMol Toluidin und 0.25 ccm Wasser zu.

Im allgemeinen wird das Reaktionsgemisch nach 8–10 Min. zunächst homogen und dann fest. Bei verlängerter Erhitzungszeit färbt sich die wieder zunehmend beweglich werdende Mischung dunkel. Mit Anilin als Aminkomponente bleibt die Mischung stets flüssig; mit *N*-Methylanilin tritt keine Schwarzfärbung wie mit anderen Aminen auf, sondern es trennt sich eine dunkelbraune ölige Oberphase von einer gelbgrünen Unterphase ab; mit *p*-Nitroanilin kommt die Mischung selbst nach 30 Min. Erhitzen nicht zum Schmelzen.

²²⁾ Das Gas enthielt 93.6 Mol% Methan, der Rest bestand hauptsächlich aus Stickstoff, Äthan, Propan und Kohlendioxyd (0.6 Mol%).

Isolierung von DTF: Nach Titration eines aliquoten Teils wird die homogene methanolische Lösung (340 ccm) i. Vak. eingedampft, der dunkelgefärbte Rückstand dreimal mit 5 ccm kaltem Wasser, dreimal mit kaltem Methanol und wiederholt mit Äther-Äthanol (2:3) bis zur Entfernung alles dunkelgefärbten Materials gewaschen. Man erhält so 2.31 g (62% d. Th.) DTF vom Zers.-P. 148–150°. $[\alpha]_D^{24}$: – 22.6° (konstant) ($c = 0.4$, in Methanol). Die organischen Waschflüssigkeiten werden vereinigt, eingedampft und der Rückstand nach dreimaligem Verreiben mit 3 ccm kaltem Methanol wie oben aufgearbeitet. Ausb. 0.32 g (8% d. Th.). Zers.-P. 149–151°. $[\alpha]_D^{24}$: – 22.6° (konstant) ($c = 0.4$, in Methanol). 250 mg der vereinigten Rohprodukte ergeben nach Umkristallisieren aus Äthanol 191 mg (76%) DTF als fast farblose Flocken. Zers.-P. 151–153°; $[\alpha]_D^{23}$: – 24.6° (konstant) ($c = 0.4$, in Methanol).

Bildung von DTF in Pyridinlösung

Aus durch Kochen über Kaliumhydroxyd unter Rückfluß gereinigtem Pyridin und Salzsäure (oder Eisessig) wird eine Lösung bekannten Säuregehaltes hergestellt. Von dieser Standardlösung werden in der Regel 5 ccm im Reagensglas mit 5 ccm einer 0.194 *m* Lösung von PTG (oder DTF) in Pyridin vermischt. Wenn Salzsäure verwandt wird, enthält die so bereitete Mischung 0.8% Wasser. Die mit einem Kork verschlossenen Gläser werden im siedenden Wasserbad erhitzt und nach den jeweils angegebenen Zeiten mit Eiswasser gekühlt. Danach entnimmt man einen aliquoten Teil, verdünnt mit Wasser und titriert 1 ccm mit TR.

War das Lösungsmittel Methanol oder ein Methanol-Pyridin-Gemisch, so wurden aliquote Teile der Reaktionsmischung getrennt im geschlossenen Reagenzglas wie oben behandelt. Es wurde stets über Magnesium getrocknetes Methanol verwandt.

Isolierung von DTF: Nach Entnahme eines aliquoten Teils zur Titration werden insgesamt 36 ccm Pyridinlösung — die 385 mg DTF enthalten — i. Vak. bei Raumtemperatur eingedampft. Der teerige, in 10 ccm Methanol aufgenommene Rückstand wird mit Äther bis zur beginnenden Trübung versetzt und 12 Stdn. bei 5° stehengelassen. Der dabei ausfallende hellbraune Niederschlag wird zunächst mit Methanol-Äther (1:2) und dann mit Äther gewaschen. Man erhält 216 mg (15% d. Th.) eines fast farblosen Produktes, das TR entfärbt. Zers.-P. 147–150°. Die mit der Mutterlauge vereinigten Waschflüssigkeiten ergeben nach Eindampfen bei 0.5 Torr, Zerreiben des Rückstandes mit Methanol und Waschen mit Äther weitere 96 mg vom Zers.-P. 147–150°. Die Gesamtausbeute beträgt somit 80% der aus den Titrationsdaten berechneten. 150 mg der vereinigten DTF-Fractionen werden 3mal mit kaltem Aceton und dann zweimal mit 2 ccm kaltem Methanol gewaschen. Von den so gereinigten 129 mg farblosem DTF, Zers.-P. 149–151°, $[\alpha]_D^{24}$: – 24.1° (8 Min. konstant) ($c = 0.35$, in Methanol), werden 100 mg aus Äthanol umkristallisiert. Ausb. 53 mg; Zers.-P. 152–153°, $[\alpha]_D^{24}$: – 23.8° (8 Min. konstant) ($c = 0.34$, in Methanol). Weitere 18 mg DTF erhält man durch Versetzen der Mutterlauge mit Äther.

Zur Darstellung von *p*-Toluidin-*D*-glucosid wurde eine 0.7 *m* methanol. *D*-Glucose-Lösung mit einem Überschuß von *p*-Toluidin (30%) unter Rückfluß erhitzt. Zers.-P. 118–120°; $[\alpha]_D^{23}$: – 94° bis – 100°, 10 Min. → – 45° (konstant) ($c = 2.5$, in Methanol). Diese Daten stehen in Einklang mit den von J. C. IRVINE und R. GILMOUR²³⁾, J. HONEYMAN und A. R. TATCHELL²⁴⁾ und BAYNE und HOLMS¹⁵⁾ angegebenen.

l-Desoxy-*p*-toluidino-*D*-fructose wurde nach F. WEYGAND¹⁵⁾ dargestellt. Zers.-P. 152 bis 153°; $[\alpha]_D^{23}$: – 24.2° ($c = 1.0$, in Methanol). BAYNE und HOLMS¹⁵⁾ geben $[\alpha]_D^{17}$: – 23.0° → 10.0° (Methanol) an.

²³⁾ J. chem. Soc. [London] 95, 1545 [1909].

²⁴⁾ J. chem. Soc. [London] 1950, 967.

p-Bromanilin-*D*-glucosid: Eine äthanol. Lösung von wasserfreier *D*-Glucose (0.5 *m*) und *p*-Bromanilin (1.0 *m*) wird unter Rückfluß gekocht. Nach 3 Stdn. wird die Lösung homogen, und man erhitzt dann noch eine weitere Stde. Beim Eindampfen im Vakuum bei 25–40° erhält man zunächst einen dicken Sirup, der zu einem farblosen, in Äthanol und Methanol löslichen, in Äther unlöslichen Produkt erstarrt. Dieses wird mit Äther gewaschen und aus Methanol umkristallisiert. Farblose Nadeln vom Zers.-P. 154–155°; $[\alpha]_{\text{D}}^{23}$: –64.4° (48 Stdn. konstant) ($c = 0.6$ und 1.0, in wasserfreiem Methanol; nach 6 Tagen bei 37° → –61°); $[\alpha]_{\text{D}}^{23}$: +26.4° (24 Stdn. konstant) ($c = 0.46$, in 0.35 *n* HCl); bei vollständiger Hydrolyse zu *D*-Glucose und *p*-Bromanilin wäre $[\alpha]_{\text{D}}$: +28.3°.

$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_5\text{NBr} \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ (343.2) Ber. C 42.00 H 5.00 Br 23.29
Gef. C 42.74, 42.77 H 5.08, 5.11 Br 23.04, 23.06

RUDOLF WEIDENHAGEN

unter Mitwirkung von ELISABETH PRESSLER und SILVIA LORENZ

ÜBER DIE AKTIVITÄTSBESTIMMUNG VON FRUCTOSIDASE-PRÄPARATEN, ZUGLEICH EIN BEITRAG ZUR FRAGE DER ÜBERTRAGUNGSWIRKUNG DER CARBOHYDRASEN

Aus dem Zentrallaboratorium der Südd. Zucker AG., Neuoffstein (Pfalz)
(Eingegangen am 31. Januar 1957)

Herrn Professor Helferich zum 70. Geburtstag

Das reinste Fructosidasepräparat, an dem bisher transfructosidatische Wirkung nachgewiesen werden konnte, ist vom Fructosidasewert 100. Die gleiche Eigenschaft wurde für eine β -*h*-Fructosidase aus Hefe vom dreifachen Reinheitsgrad auf papierchromatographischem Wege aufgezeigt. Die transferierende Wirkung der Glykosidasen ist damit weiter gesichert.

Die Auffindung der Gruppenübertragung im Bereich der Carbohydrasen hat die Frage akut werden lassen, ob die Transglykosidierung den einzelnen Glykosidasen selbst zuzuschreiben ist und somit ein wesentliches Merkmal ihrer Wirkung darstellt, oder ob spezifische Transglykosidasen existieren, die mit den spaltenden Enzymen noch vergesellschaftet sind und demnach von ihnen abtrennbar sein müssen. Die übertragende Wirkung der Carbohydrasen ist bei der rohrzuckerspaltenden β -*h*-Fructosidase durch papierchromatographische Analyse der Spaltansätze entdeckt worden¹⁾. Dieses Enzym ist gleichzeitig besonders leicht in hoher Reinheit darstellbar und damit zur Entscheidung der oben gestellten Frage prädestiniert. Von ED. H. FISCHER und Mitarbb.²⁾ ist zu diesem Zwecke ein Fructosidasepräparat von einer nach ihrer Meinung bisher unerreichten Reinheit hergestellt und auf seine transfructosidatische Wirkung geprüft worden. Die Bildung von drei nichtreduzierenden Trisacchariden durch Über-

¹⁾ J. S. D. BACON und J. EDELMAN, Arch. Biochemistry **28**, 467 [1950]; P. H. BLANCHARD und N. ALBON, ebenda **29**, 220 [1950].

²⁾ ED. H. FISCHER und L. KOHTÈS, Helv. chim. Acta **34**, 1123 [1951]; ED. H. FISCHER, L. KOHTÈS und J. FELLIG, ebenda **34**, 1132 [1951].