

# CHEMISCHE BERICHTE

Fortsetzung der  
BERICHTE DER DEUTSCHEN CHEMISCHEN  
GESELLSCHAFT

91. Jahrg. Nr. 8

S. 1567—1800

FRIEDRICH WEYGAND, HELMUT SIMON  
und JOHANN FRIEDRICH KLEBE

## Über den Reaktionsmechanismus der Osazonbildung in der Zuckerreihe

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Technischen Universität Berlin,  
Berlin-Charlottenburg

(Eingegangen am 5. April 1958)

Die Phenylsazonbildung aus Glucose-[1-T] und Glucose-[1-D,T] wurde untersucht. Auf Grund des Isotopieeffektes, der bei der Osazonbildung aus 1-Desoxy-1-*p*-toluidino-fructose-[1-T] bestimmt wurde, ergibt sich, daß aus dem Nichtauftreten eines Verlustes an Radioaktivität bei der Osazonbildung aus Glucose-[1-T] nicht auf die Abwesenheit einer Amadori-Umlagerung geschlossen werden kann. Bei der Osazonbildung aus Glucose-[1-D,T] ist der Isotopieeffekt wesentlich kleiner. In diesem Falle ist daher bei der Osazonbildung ein Verlust an Radioaktivität zu erwarten, wenn eine Amadori-Umlagerung stattfindet. Ein solcher Verlust wurde gefunden. — Wurde die Osazonbildung mit nichtmarkierter Glucose in tritiummarkiertem Wasser ausgeführt, so trat ein starker Einbau von Tritium auf. Dies ist ebenfalls nur durch eine Amadori-Umlagerung zu erklären. Aus Messungen der Tritiumaktivität im Osazon nach dessen fraktionierter Abtrennung bei der Osazonbildung ergibt sich, daß Weg B von WEYGAND neben einem konkurrierenden Mechanismus gültig ist.

Von EMIL FISCHER<sup>1)</sup> wurde 1884 die Osazonbildung der  $\alpha$ -Hydroxycarbonylverbindungen entdeckt. Da das Phenylhydrazon der Glucose ein Zwischenprodukt bei der Osazonbildung dargestellt, und da ferner von den drei zur Reaktion benötigten Molekeln Phenylhydrazin eines in Anilin und Ammoniak umgewandelt wird<sup>2)</sup>, deutete E. FISCHER<sup>3)</sup> den Reaktionsverlauf so, daß die sek. Alkoholgruppierung an C-2 durch das Phenylhydrazin dehydriert wird, worauf die dadurch entstehende Carbonylgruppe mit einem dritten Mol. Phenylhydrazin reagiert. Die Annahme der Dehydrierung einer Alkoholgruppe durch Phenylhydrazin bereitete jedoch dem Verständnis Schwierigkeiten, da bekanntlich Phenylhydrazin sogar von Titantrichlorid

<sup>1)</sup> Ber. dtsh. chem. Ges. 17, 579 [1884]; 20, 821 [1887].

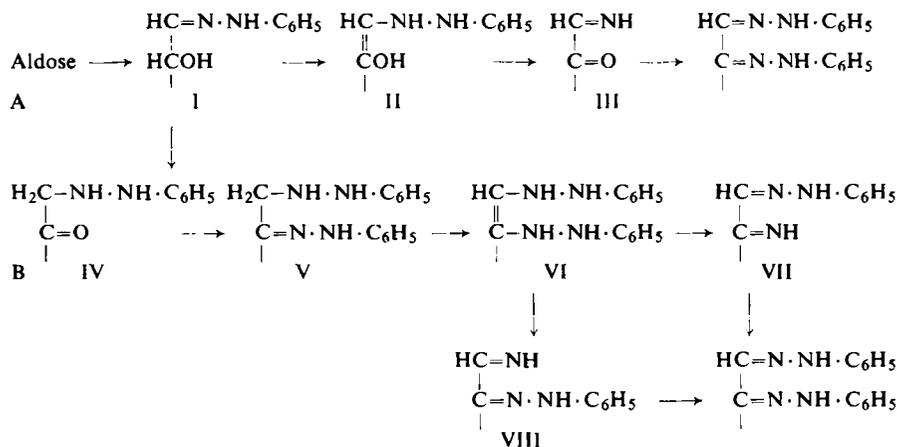
<sup>2)</sup> Analytisch genau bestimmt von E. KNECHT und F. P. THOMPSON, J. chem. Soc. [London] 125, 222 [1924]; B. GLASSMANN und ROCHWARGER-WALBE, Ber. dtsh. chem. Ges. 61, 1444 [1928].

<sup>3)</sup> Ber. dtsh. chem. Ges. 20, 881 [1887]; 23, 2118 [1890].

nicht angegriffen wird. J. KENNER und E. C. KNIGHT<sup>4)</sup> wiesen darauf hin, daß nicht das Phenylhydrazin selbst, sondern dessen Kation die oxydierende Wirkung ausübt.

KNECHT und THOMPSON<sup>2)</sup> stellten später fest, daß die Glucosazonausbeute auf 84 % ansteigt, wenn die Reaktion in Gegenwart von Anilin in 20-proz. Essigsäure durchgeführt wird, während nach E. FISCHER nur etwa 60 % erhalten werden.

1940 entwickelte F. WEYGAND<sup>5)</sup> gänzlich andere Vorstellungen über den Verlauf der Osazonbildung und begründete sie experimentell. Es wurde festgestellt, daß die Amadori-Umlagerungsprodukte, die aus Aldosen und verschiedenen aromatischen Aminen erhältlich sind, wesentlich höhere Osazonausbeuten geben als die Aldosen selbst. Es ist dabei nicht nötig, die Amadori-Umlagerungsprodukte zu isolieren. Für die angenommene Oxydoreduktion sind entsprechende Beispiele bekannt. Ganz analog kann die entscheidende Stufe bei der Osazonbildung aus Glucose und Phenylhydrazin eine intramolekulare Oxydoreduktion darstellen. An Stelle des Mechanismus von E. FISCHER schlug WEYGAND<sup>5)</sup> zwei andere Mechanismen A und B vor:



Dieser Annahme WEYGANDS schlossen sich später eine ganze Reihe anderer Forscher an<sup>6-10)</sup>. Erst als 1951 E. A. BRAUDE und W. F. FORBES<sup>11)</sup> die oxydierende Wirkung des 2,4-Dinitrophenylhydrazins bemerkten, wurde die FISCHERSche Reaktionsweise in der Abänderung von KENNER und KNIGHT wieder positiv kommentiert<sup>12)</sup>. V. C. BARRY und P. W. D. MITCHELL<sup>13)</sup> nehmen zuerst eine Amadori-Umlagerung und sodann eine Dehydrierung durch Sauerstoff oder durch das Phenylhydrazin-

4) Ber. dtsch. chem. Ges. **69**, 341 [1936]. 5) Ber. dtsch. chem. Ges. **73**, 1284 [1940].

6) P. RUGGLI und P. ZELLER, *Helv. chim. Acta* **28**, 747 [1945].

7) H. S. ISBELL, *Annu. Rev. Biochem.* **12**, 205 [1943].

8) W. THEILACKER und P. TRÖSTER, *Liebigs Ann. Chem.* **572**, 144 [1951].

9) V. WOLF, *Chem. Ber.* **86**, 840 [1953].

10) H. BEYER, G. HENSEKE und W. LIEBENOW, *Chem. Ber.* **86**, 10 [1953].

11) *J. chem. Soc. [London]* **1951**, 1762. Über die Bildung von Dinitroanilin wird in dieser Arbeit nichts berichtet!

12) G. J. BLOINK und K. H. PAUSACKER, *J. chem. Soc. [London]* **1952**, 661. Auch diese Autoren nehmen beim Benzoin eine Struktur analog V an, über deren Entstehungsweise sie sich nicht äußern.

13) *Nature [London]* **175**, 220 [1955].



kiertem *p*-Nitrophenylhydrazin zum Benzoin-osazon um. Sie vermochten Bedingungen zu finden, unter denen der oben erwähnte Arylhydrazinaustausch nicht stattfindet.

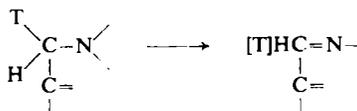
Bei Gültigkeit der Theorie nach E. FISCHER oder der Abänderung nach BRAUDE sollte der gesamte  $^{15}\text{N}$  im gebildeten Osazon zu finden sein. Träfe jedoch Weg A zu, so müßte der gesamte  $^{15}\text{N}$  vollständig im Ammoniak auftreten. Bei Gültigkeit von Weg B schließlich errechnet sich eine  $^{15}\text{N}$ -Verteilung, die mit den Versuchsergebnissen übereinstimmt (vgl. Tab. 1).

Tab. 1. Theoret. und experimentell gefundene  $^{15}\text{N}$ -Verteilung für die Benzoin-osazon-Bildung nach SCHEMJAKIN und MAJMIND<sup>16)</sup>

	Nach E. Fischer	Nach Weygand A	Nach Weygand B	1. Versuch	2. Versuch	Gefunden Mittelwert
Ammoniak	0.38	39.6	20.0 <sup>*)</sup>	21.3	20.0	20.7
Osazon	6.91 <sup>**)</sup>	0.38	3.65 <sup>***)</sup>	4.08	3.77	3.92
	$^*) 20.0 = \frac{39.6 + 0.38}{2}$ $^{**}) 6.91 = \frac{39.6 + 0.38 \cdot 5}{6}$ $^{***}) 3.65 = \frac{1}{2} \cdot \left( \frac{39.6 + 0.38 \cdot 5}{6} + 0.38 \right)$					

Wir versuchten nun auf folgende Weise eine Entscheidung zu treffen: Unterwirft man eine an C-1 mit Tritium markierte Glucose der Osazonbildung, so sollte eine Unterscheidung zwischen Weg A und B möglich sein, da bei Weg B der Übergang V  $\rightarrow$  VI mit einem 50-proz. Aktivitätsverlust verbunden sein sollte, falls kein Isotopieeffekt auftritt. Weiterhin prüften wir, ob bei der Osazonbildung aus nichtmarkierter Glucose in tritiumhaltigem Wasser Tritium an C-1 des Osazons auftritt, was bei Gültigkeit der Reaktionsweise nach E. FISCHER nicht der Fall sein darf.

Eine besondere Schwierigkeit war in dem eventuell auftretenden sehr hohen Isotopieeffekt des Tritiums zu erwarten. Nach J. BIGELEISEN<sup>17)</sup> kann der intramolekulare Isotopieeffekt maximal  $k_{\text{H}}/k_{\text{T}} = 60$  sein, d. h. daß bei dem Übergang



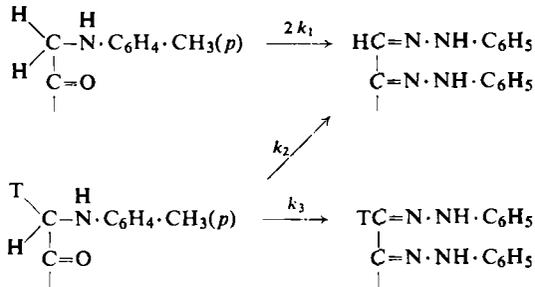
die wesentlich schwächere C-H-Bindung viel rascher reagiert, worauf sich die molare Radioaktivität der Glucose nicht genügend von der des Osazons unterscheidet. Versuche zu dieser Frage hatten das folgende Ergebnis: Das Osazon, das aus Glucose-[1-T] hergestellt wurde, hatte praktisch die gleiche Radioaktivität wie die verwandte Glucose (Tab. 2, Versuch 1). Das gleiche Ergebnis wurde von F. FRIEDBERG und L. KAPLAN<sup>18)</sup>, während unsere Arbeiten im Gange waren, veröffentlicht. Sie schlossen aus dem Nichtauftreten eines Verlustes an Radioaktivität, daß zumindest Weg B bei der Glucosazonbildung nicht gültig sei. Diese Schlußfolgerung trifft aber nur zu, wenn bewiesen wird, daß der bei der Reaktion auftretende Isotopieeffekt nicht so groß ist, daß überhaupt kein deutlicher Tritiumverlust auftreten kann.

Um die bei dieser Reaktion zu erwartenden *Isotopieeffekte* zu bestimmen, untersuchten wir die *Osazonbildung* von *1-Desoxy-1-p-toluidino-D-fructose-[1-T]* (= *p*-

<sup>17)</sup> Science [New York] **110**, 14 [1949].

<sup>18)</sup> J. Amer. chem. Soc. **79**, 2600 [1957].

Tolyl-D-isoglucosamin-[1-T]. In diesem Falle sind drei Isotopieeffekte (*IE*) zu erwarten.



Durch den sog. *intramolekularen IE*  $k_3/k_2$  wird angegeben, um wieviel mal schneller die C—H-Bindung gespalten wird als die C—T-Bindung. Die geringere Spaltungsgeschwindigkeit einer C—T-Bindung hat zur Folge, daß die nichtmarkierten Molekeln schneller reagieren als die markierten. Falls die Lösung der C—H-Bindung in der Reaktionsfolge der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, tritt ein *intermolekularer* oder *kinetischer* Isotopieeffekt auf (*kIE*). Er ist bei der hier betrachteten Reaktion gegeben durch das Verhältnis  $(2k_1)/(k_2+k_3)$ . Der dritte zu erwartende Isotopieeffekt, der sog. *sekundäre* Isotopieeffekt kommt dadurch zustande, daß bei einem C-Atom, das ein H und ein T bindet, die C—H-Bindung ebenfalls stärker wird. Er ist gegeben durch  $k_3/k_1$ .

Zunächst versuchten wir, den kinetischen Isotopieeffekt in üblicher Weise nach der von BIGELEISEN<sup>17)</sup> angegebenen Formel zu bestimmen.

$$\frac{k_2 + k_3}{2k_1} = \frac{\log(N_1/N_2)}{\log(1-f)} + 1$$

Diese Formel gilt für einen beliebigen, jedoch nicht 100-proz. Umsatz. Hierbei ist  $N_1$  = molare Radioaktivität des nach der Reaktion nicht umgesetzten Ausgangsproduktes,

$N_2$  = molare Radioaktivität des Ausgangsproduktes vor der Reaktion,

$f$  = umgesetzter Bruchteil (Molzahl Endprodukt/Molzahl des eingesetzten Ausgangsproduktes).

Der intramolekulare Isotopieeffekt läßt sich aus der Kombination dieser Gleichung mit der Formel für den sek. Isotopieeffekt berechnen, dessen Bestimmung aus dem Verhältnis der molaren Radioaktivitäten des Endproduktes und des Ausgangsmaterials bei einem gegen Null gehenden Umsatz möglich ist<sup>17)</sup>.

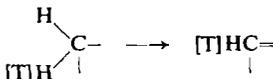
$$\frac{k_3}{2k_1} = \frac{N_3}{N_2} \quad (\text{Umsatz} \rightarrow 0)$$

$N_3$  = molare Radioaktivität des Reaktionsproduktes.

Wurden nun für den umgesetzten Bruchteil  $f$  nach etwa 30-proz. Umsätzen die entstandenen Molzahlen an Osazon in Rechnung gesetzt, so ergaben sich für den kinetischen Isotopieeffekt völlig unmögliche Werte, die viel zu hoch lagen (bis gegen 15). Der kinetische Isotopieeffekt sollte in diesem Fall den Wert 2 nicht weit überschreiten.

Wir versuchten daraufhin, der Berechnung von  $f$  nach einem 30-proz. Umsatz (bez. auf das gebildete Osazon) die Menge der nicht umgesetzten 1-Desoxy-1-*p*-toluidino-*D*-fructose-[1-T] zugrunde zu legen, die durch eine Verdünnungsanalyse zu 28% der Ausgangsmenge bestimmt wurde. Dadurch ergibt sich, daß etwa 40% der Ausgangsmenge in Zwischenstufen vorlagen. Es ergab sich nun ein kinetischer Isotopieeffekt von 1.32, der erfahrungsgemäß für eine solche Reaktion viel zu niedrig ist.

Der Wert von  $f$  mußte also zwischen 30 und 72% für den Übergang

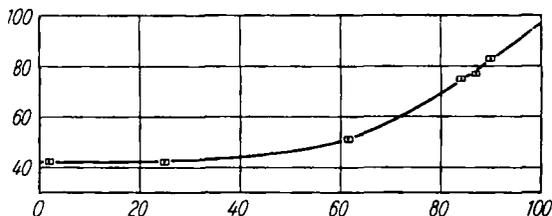


liegen, und aus den vorliegenden Befunden mußte auf das Vorhandensein beträchtlicher Mengen sowohl eines Zwischenproduktes mit 2 H-Atomen an C-1 als auch eines mit 1 H-Atom an C-1 geschlossen werden. Denn wäre nur ein  $\text{H}_2\text{C}$ -1-Körper Zwischenprodukt, so würde  $f$  durch die gebildete Menge Osazon bestimmt sein; jedoch müßte die Radioaktivität  $N_1$  des nicht umgesetzten Ausgangsproduktes niedriger sein, um einen wahrscheinlichen Wert für  $kIE$  zu geben. Wäre nur ein HC-1-Körper Zwischenprodukt, so würde  $f$  umgekehrt durch die Molzahl des nicht umgesetzten Ausgangsproduktes bestimmt sein und  $N_1$  müßte einen höheren Wert haben.

Inzwischen war es möglich, *D*-Fructoson-1-phenylhydrazon<sup>19)</sup> als ein Zwischenprodukt in Substanz kristallin zu isolieren.

Da sich also auf diese Weise der kinetische Isotopieeffekt und damit auch der intramolekulare Isotopieeffekt nicht bestimmen ließen, versuchten wir das Ziel zu erreichen, indem wir den Einfluß des  $kIE$  eliminierten: Da der  $kIE$  nur das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten von markierten und nichtmarkierten Molekülen wiedergibt, ist er auf die Isotopenzusammensetzung der Reaktionsprodukte nicht von Einfluß, falls die Umsetzung zu 100% erfolgt.

Wie sich herausstellte, war es nicht möglich, von 1-Desoxy-1-*p*-toluidino-*D*-fructose ausgehend das Osazon in 100-proz. Ausbeute zu erhalten. Um trotzdem zu einer Aussage über den intramolekularen Isotopieeffekt zu kommen, bestimmten wir experimentell die Isotopieeffektkurve, d. h. die Abhängigkeit der molaren Radioaktivität des Osazons vom Umsatz und extrapolierten die Kurve (Abbild. 1). Daraus ergibt sich



Abbild. 1. Radioaktivität des Glucosephenylosazons in Abhängigkeit vom Umsatz  
Abszisse: % Umsatz zum Osazon. Ordinate: Osazonradioaktivität, bezogen auf Ausgangsaktivität von 1-Desoxy-1-*p*-toluidino-*D*-fructose-[1-T]

<sup>19)</sup> Ausgeführt von Herrn H. G. ROSENBAUER. Hierüber wird später berichtet werden. Bezüglich *D*-Fructoson-1-phenylhydrazon vgl. G. HENSEKE und M. WINTER, Chem. Ber. 89, 956 [1956].

ein intramolekularer Isotopieeffekt von  $32 \pm 5^*$ ). Der sekundäre Isotopieeffekt wurde aus einem 3-proz. Umsatz von 1-Desoxy-1-*p*-toluidino-D-fructose-[1-T] zu Osazon zu  $0.860 \pm 0.008$  bestimmt. Daraus läßt sich der kinetische Isotopieeffekt zu  $2.25 \pm 0.04$  berechnen.

Die Werte des intramolekularen und des kinetischen Isotopieeffektes lassen sich unabhängig von der Extrapolation der Isotopieeffektcurve auch aus dem 3-proz. Umsatz unter der gut erfüllten Voraussetzung berechnen, daß bis zu einem Umsatz von 3% die Konzentration-Zeit-Kurven, wie sie sich für Reaktionen erster oder zweiter Ordnung ergeben, noch linear verlaufen. Vom Ausgangsmaterial sei das Verhältnis von markierten zu der Gesamtzahl der Molekeln  $N_a/(N_i + N_a)$ , wobei im Falle der Tritiummarkierung  $N_a \ll N_i$ . Die Radioaktivität des Reaktionsproduktes nach einem *n*-proz. Umsatz ( $n \rightarrow 0$ ) ergibt sich daraus, daß  $(n \cdot N_i)/100$  nichtradioaktive Molekeln reagiert haben, aber nur  $(n \cdot N_a)/(kIE \cdot 100)$  radioaktive Molekeln.

Die Anzahl der aus den radioaktiven Molekeln des Ausgangsmaterials dabei entstehenden radioaktiven Molekeln des Reaktionsproduktes wird nur vom intramolekularen *IE* bestimmt, d. h., von den markierten Molekeln, die reagiert haben, ist der Bruchteil  $N_a/(kIE \cdot iIE)$  abzuziehen, der nichtradioaktives Osazon ergibt. Bei der von uns betrachteten Reaktion ist das Verhältnis von radioaktiven zu nichtradioaktiven Osazonmolekeln bei einem gegen Null gehenden Umsatz gegeben durch den Ausdruck

$$\frac{\frac{n \cdot N_a}{kIE} - \frac{n \cdot N_a}{kIE \cdot (iIE + 1)}}{n \cdot N_i}$$

Im Falle des 3-proz. Umsatzes zeigt das Osazon  $42.8 \pm 0.4\%$  der molaren Radioaktivität der 1-Desoxy-1-*p*-toluidino-D-fructose-[1-T]. Daraus ergibt sich für den intramolekularen *IE* ein Wert von  $32 \pm 8$  und für den kinetischen *IE* ein Wert von  $2.25 \pm 0.05$ . Die Werte stimmen gut mit den durch die Extrapolation der Isotopieeffektcurve gewonnenen überein.

Aus dem großen intramolekularen Isotopieeffekt folgt, daß das Nichtauftreten eines Verlustes an Radioaktivität bei der Osazonbildung aus Glucose-[1-T] nicht gegen die Amadori-Umlagerung spricht, da man annehmen kann, daß die Amadori-Umlagerung die die Ausbeute bestimmende Stufe darstellt, und der Umsatz von II oder IV zum Osazon mit 100-proz. Ausbeute erfolgen dürfte und somit kein intermolekularer *IE* mehr bemerkbar ist.

\*) Wie sich aus einer einfachen Überlegung ergibt, ist der Verlust an Radioaktivität in einem Reaktionsprodukt, bei dessen Bildung die Ablösung eines Tritiumatoms und eines am gleichen Kohlenstoffatom gebundenen H-Atoms miteinander konkurrieren, durch folgende Beziehung mit dem intramolekularen Isotopieeffekt verknüpft:

$$\text{intramol. IE} = \frac{100}{\% \text{ Verlust}} - 1$$

Aus Abbild. 1 ergibt sich für einen 100-proz. Umsatz ein Verlust von 3% der 1-Desoxy-1-*p*-toluidino-D-fructose-[1-T]-Aktivität im Osazon, demgemäß

$$\text{intramol. IE} = \frac{100}{3} - 1 = 32.$$

Der Fehler wurde aus dem möglichen Fehler der Extrapolation geschätzt.

Um die bei der Reaktion auftretenden großen Isotopieeffekte zu umgehen, verwendeten wir nunmehr *Glucose-[1-D, T]*, da nach BIGELEISEN die maximal möglichen Werte für  $k_H:k_D:k_T = 60:18:1$  sein können. Für das Verhältnis  $k_D:k_T$  ergibt sich daraus ein Wert von 3.3. Durch Reduktion von D-Gluconsäure- $\delta$ -lacton in  $D_2O + H_2O-[T]$  erhielten wir eine Glucose, die an C-1 91% D und etwa 9% H enthielt. Der Tritiumgehalt ist prozentual vernachlässigbar.

Bei der Osazonbildung aus dieser Glucose trat nun ein molarer Radioaktivitätsverlust von 10% auf (Tab. 2, Versuch 2).

Durch Oxydation der Glucose mit Brom in bariumbenzoatgepufferter Lösung nach C. S. HUDSON und H. S. ISBELL<sup>20)</sup> wurde festgestellt, daß die Tritiumaktivität, die in der Glucose nicht an C-1 fixiert war, 0.3% betrug.

Erfolgte die Osazonbildung nur nach Weg B, so sollte ein Verlust an Radioaktivität von etwa 30% auftreten. Die Frage, ob beide Wege (A und B) ablaufen oder ob statt A ein anderer konkurrierender Mechanismus in Frage kommt oder ob der Verlust an Radioaktivität durch ein Gleichgewicht  $II \rightleftharpoons IV$  bedingt ist, läßt sich hier noch nicht entscheiden.

Bei der *Glucosazonbildung mit nichtmarkierter Glucose in tritiummarkiertem Deuteriooxyd* fanden wir, daß 48% der Radioaktivität des Wassers, bezogen auf 1 Wasserstoffatom des Wassermoleküls, im Osazon auftrat (Tab. 2, Versuch 3).

Tab. 2. Übersicht über die im Text beschriebenen Versuche und ihre Ergebnisse

Vers.	Reaktion	Radioaktivität des Reaktions- produktes in Imp./Min. $\mu$ Mol	Prozentsatz der Radioaktivität des Reakt.-Prod. von derjenigen des Ausgangs- materials	Radioaktivität des Ausgangs- produktes in Imp./Min. $\mu$ Mol
1	Glucose-[1-T] $\rightarrow$ Osazon-[1-T]	195.3	98.9	197.8
2	Glucose-[1-D,T] $\rightarrow$ Osazon-[1-D, T]	3295	90.3	3649
3	Glucose $\xrightarrow{[D_2O-[T]]}$ Osazon-[1-D, T]	237	48.7	972
4	Glucose-[1-D,T] $\rightarrow$ 1-Phenyl- 4-phenylhydrazono-pyrazolon-(5)	541	101.0	536
5	Glucose $\xrightarrow{[D_2O-[T]]}$ DTF-[1-D, T] <sup>*)</sup>	395	81.3	972
6	DTF-[1-T] 2 Min. in methanol. NaOH bei 20°	1806	54.0	3337
7	DTF-[1-T] 45 Min. bei $p_H$ 5 bei 100° in wäßr. Dioxan	1203	92.5	1300
8	Glucose-[1-D,T] $\xrightarrow{[D_2O] + p\text{-Toluidin}}$ Osazon	2483	68.0	3649

\*) DTF = 1-Desoxy-1-*p*-toluidino-D-fructose

Um festzustellen, ob auch hier das Tritium nur an C-1 fixiert wurde, bauten wir das Glucosazon zum 1-Phenyl-4-phenylhydrazono-pyrazolon-(5) ab<sup>21)</sup>. In diesem Ab-

<sup>20)</sup> J. Amer. chem. Soc. **51**, 2225 [1929].

<sup>21)</sup> P. KARRER und K. PFÄHLER, Helv. chim. Acta **17**, 766 [1934]; E. CHARGAFF und B. MAGASANIK, J. Amer. chem. Soc. **69**, 1459 [1947].

bauprodukt ist von allen ursprünglich am Zuckergerüst befindlichen stabilen C—H-Bindungen nur der am C-1 gebundene Wasserstoff erhalten. Da die molare Radioaktivität des Osazons mit der des Abbauproduktes innerhalb eines Prozentes übereinstimmte, war bewiesen, daß sich das gesamte eingetretene Tritium an C-1 befindet (Tab. 2, Versuch 4).

Weiter war zu prüfen, ob die im Osazon auftretende Radioaktivität nicht durch einen nachträglichen Austausch des Osazons mit dem tritiumhaltigen Wasser zustande kommt. Daher führten wir einen Versuch unter den Bedingungen aus, bei denen ein Austausch der Arylhydrazinreste im Glucosazon (Transosazonierung) beobachtet wurde<sup>15</sup>). Es zeigte sich, daß beim Erwärmen von gewöhnlichem Glucosazon in schwach angesäuertem tritiumhaltigem wäßrigem Dioxan kein Tritium in C—H-Bindungen aufgenommen wird.

Zum Vergleich stellten wir fest, wieviel Tritium bei der Amadori-Umlagerung  $\text{Glucose} \rightarrow 1\text{-Desoxy-1-}p\text{-toluidino-D-fructose}$  in  $\text{D}_2\text{O-[T]}$  in letzteres eintritt. Die molare Radioaktivität der 1-Desoxy-1-*p*-toluidino-D-fructose betrug 81% des Reaktionswassers, bezogen auf 1 Wasserstoffatom des Wassers (Tab. 2, Versuch 5).

Durch kinetische Untersuchungen sollte noch bestimmt werden, wo bei der Osazonbildung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt liegt. Es wurden daher Reaktionsansätze eine gewisse Zeit erhitzt, sodann rasch abgekühlt, worauf das ausgefallene Osazon abfiltriert wurde. Weiteres Erhitzen und Abkühlen ergab weitere Fraktionen.

Im Falle der Osazonbildung aus  $\text{Glucose-[1-T]}$  in  $\text{H}_2\text{O}$  (Tab. 3a) zeigte die Radioaktivität im Osazon kaum eine Abhängigkeit von dem prozentualen Umsatz. Das

Tab. 3. Fraktionierte Osazonbildung

Fraktion Nr.	Proz. Anteil an der gebildeten Gesamtmenge Osazon	Radioaktivität des Osazons in Imp./Min. $\mu\text{Mol}$	Proz. der Radioaktivität vom Ausgangsmaterial
a) Aus $\text{Glucose-[1-T]}$ in $\text{H}_2\text{O}$			
1	17.4	194.9	98.6
2	19.0	194.7	98.5
3	20.3	196.6	99.4
4	16.1	193.8	98.0
5	27.2	193.4	97.8
Gesamtausbeute an Osazon 58% d. Th. (Rohausbeute)			
b) Aus $\text{Glucose-[1-T]}$ in $\text{D}_2\text{O}$			
1	13.1	190.4	96.3
2	8.8	190.4	96.3
3	19.9	192.1	97.3
4	22.4	188.0	95.0
5	12.2	184.8	93.4
6	23.6	175.7	88.8
Gesamtausbeute an Osazon 55% d. Th. (Rohausbeute)			
Radioaktivität der $\text{Glucose-[1-T]}$ : 197.8 Imp./Min. $\mu\text{Mol}$			

zeigt, daß der reaktionsbestimmende Schritt nicht die Lösung einer C—H-Bindung darstellt, soweit Weg B beschritten wird. Wie die Versuche mit  $\text{Glucose-[1-D, T]}$

bereits ergaben, tritt hier bei der Osazonbildung ein deutlicher Radioaktivitätsverlust auf. Dies mußte sich auch wieder bei der fraktionierten Osazonbildung von Glucose-[1-T] in D<sub>2</sub>O zeigen, da dann die ursprünglich mit Tritium markierten Molekeln, soweit sie die Stufe IV erreichen, an C-1 Deuterium und Tritium gebunden haben. Aus Tab. 3 b geht hervor, daß hier Verluste an Aktivität auftreten, die um so größer sind, je weiter der Umsatz zum Osazon erfolgt ist.

Auch zu diesen kinetischen Versuchen stellten wir die Gegenprobe an, d. h. wir bestimmten die Radioaktivität aufeinander folgender Osazonfraktionen aus gewöhnlicher Glucose in D<sub>2</sub>O-[T]. Aus Tab. 4 ergibt sich, daß die Radioaktivität ständig ansteigt, was den steigenden Tritiumverlusten bei den fraktionierten Osazonfällungen aus Glucose-[1-T] in D<sub>2</sub>O entspricht.

Tab. 4. Fraktionierte Osazonbildung

Fraktion Nr.	Proz. Anteil an der gebildeten Gesamtmenge Osazon	Radioaktivität des Osazons in Imp./Min. µMol
a) Aus nichtmarkierter Glucose in D <sub>2</sub> O-[T]		
1	14.8 (nach 4.7 Min.)	62
2	40.8	221
3	22.2	441
4	22.2	795
Gesamtausbeute an Osazon 54 % d. Th. (Rohausbeute)		
b) Unter Zusatz von Anilin-acetat (4 Moll.)		
1	26.7 (nach 4.0 Min.)	460
2	63.3	nicht bestimmt
3	10.0	1580
Gesamtausbeute an Osazon 60 % d. Th. (Rohausbeute)		

Um den Einfluß von aromatischen Aminen, die die Osazonbildung begünstigen, auf den Tritiumeinbau zu untersuchen, setzten wir in einem weiteren Versuch bereits zu Beginn 4 Moll. Anilin-acetat zu. Wie Tab. 4 b zeigt, nimmt auch hier die Radioaktivität vom Anfang zum Ende der Osazonbildung zu.

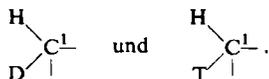
Um festzustellen, ob die Ergebnisse, die in den Tabellen 3 b und 4 niedergelegt sind, durch ein Gleichgewicht  $\text{II} \rightleftharpoons \text{IV}$  bedingt sind, stellten wir den Radioaktivitätsverlust von 1-Desoxy-1-*p*-toluidino-D-fructose-[1-T] in 0.2 *n* methanol. Natronlauge bei Zimmertemperatur fest. Bereits nach 2 Min. erfolgte ein 44-proz. Verlust, d. h., es findet ein sehr rascher Austausch statt (Tab. 2, Versuch 6). Wir haben sodann geprüft, ob ein Verlust an Tritiumaktivität auch unter den *p*<sub>H</sub>-Bedingungen der Osazonbildung auftritt. Zu diesem Zweck erhitzten wir 1-Desoxy-1-*p*-toluidino-D-fructose-[1-T] in einer auf *p*<sub>H</sub> 5 eingestellten wäßrigen Dioxanlösung. Es zeigte sich, daß erst nach 45 Min. ein Verlust von 7% auftrat (Tab. 2, Versuch 7). Da die Osazonbildung aus 1-Desoxy-1-*p*-toluidino-D-fructose bereits nach 10 Min. praktisch abgeschlossen ist und das Osazon ausfällt, ist der Verlust durch Austausch bei der Osazonbildung vernachlässigbar.

## DISKUSSION

Die Tatsache, daß bei der Glucosazonbildung aus nichtmarkierter Glucose in tritiummarkiertem Wasser Tritium in dem Osazon auftritt, und daß bei der Osazonbildung aus C-1-tritiummarkierter Glucose Radioaktivität austritt, sobald durch Verwendung von Glucose-[1-D, T] der Isotopieeffekt erniedrigt ist, kann durch den von FISCHER angegebenen Mechanismus auch in seinen Abänderungen nicht erklärt werden. Es ist auszuschließen, daß bei der Bildung des Phenylhydrazons der Glucose Tritium an C-1 des Zuckers gebunden wird. Dies wurde mit Deuterium bereits von Y. J. TOPPER und D. STETTEN<sup>22)</sup> im Falle der Mannose experimentell festgestellt. Sie fanden auch schon den Einbau von Deuterium bei der Glucosazonbildung. Wie wir beobachteten, nimmt fertiggebildetes Glucosazon unter den Osazonbildungsbedingungen kein Tritium aus dem Wasser auf, d. h. der Einbau von Tritium bzw. Deuterium bei der Osazonbildung beruht nicht auf einem nachträglichen Austausch.

Auch bei der Dehydrierung des Phenylhydrazons kann keine neue C—H-Bindung geschaffen werden. Weiterhin sollte das Dehydrierungsprodukt nach FISCHER, das Glucoson-1-phenylhydrazon, ohne Aufnahme oder Abspaltung von Tritium zum Osazon weiter reagieren. Tautomere Gleichgewichte, an denen eine C—H-Bindung beteiligt ist, können nicht auftreten.

Die beobachteten Ergebnisse lassen sich erklären, wenn Zwischenstufe IV, Mechanismus B, bei der Glucosazonbildung durchlaufen wird. Zu einer Abschätzung, in welchem Umfange dies geschieht, kann man durch folgende Überlegung kommen. Nach Versuch 3, Tab. 2, entstehen, da von nichtmarkierter Glucose ausgegangen wurde, vom Zwischenprodukt IV zwei Arten von Molekeln,



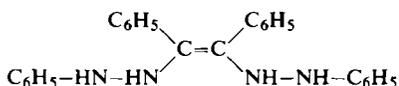
Bei der nachfolgenden Osazonbildung tritt wegen des hohen Isotopieeffektes kein nennenswerter Tritiumverlust mehr auf. Folglich ist die eingetretene Tritiummenge ein Maß für den Prozentsatz, in dem IV auftritt, d. h. etwa 45–50% der Glucosazonbildung führen über IV. Nach Versuch 2, Tab. 2, kann man abschätzen, daß etwa 30% der Glucosazonbildung über IV erfolgt<sup>\*)</sup>. Dieser Wert dürfte jedoch mit einer größeren Unsicherheit behaftet sein als der vorhergehende. Die Versuche, über die berichtet wurde, sagen jedoch nichts über den anderen Mechanismus aus, der außerdem abläuft. Auf Grund der prinzipiellen Gleichheit von Weg A und B — intramolekulare Oxydoreduktion — kommt jedoch dem Weg A größere Wahrscheinlichkeit zu als dem von FISCHER vorgeschlagenen.

Wie bereits erwähnt wurde, haben SCHEMJAKIN und MAJMIND<sup>16)</sup> nachgewiesen, daß bei der Osazonbildung des Benzoinns nur Weg B beschrritten wird.

<sup>22)</sup> J. biol. Chemistry **189**, 191 [1951].

<sup>\*)</sup> Falls bei der Reaktion kein Isotopieeffekt auftreten würde, würde bei einem 50-proz. Verlust an Radioaktivität Zwischenprodukt IV zu 100% durchlaufen. Auf Grund des gefundenen intramolekularen Isotopieeffektes  $k_{\text{H}}/k_{\text{T}} = k_3/k_2$  ist für  $k_{\text{D}}/k_{\text{T}}$  bei dieser Reaktion ein Wert von etwa 1.6 zu erwarten. Folglich sind die bei Versuch 2, Tab. 2, gefundenen 10% Verlust mit 2 · 1.6 zu multiplizieren.

Als Ursache für den zunehmenden Einbau bzw. zunehmenden Verlust von Tritium bei der fraktionierten Osazonbildung (vgl. Tab. 3b, 4a und 4b) ist ein Austausch im Rahmen eines Gleichgewichts  $\text{II} \rightleftharpoons \text{IV}$  nach den Versuchen 7 und 8, Tab. 2, unwahrscheinlich. Es ist daher anzunehmen, daß der Mechanismus B von IV aus etwas langsamer abläuft als der konkurrierende Mechanismus. Dies kann evtl. auch durch die Annahme einer direkten Reaktion der Zwischenstufe bei der Amadori-Umlagerung  $\text{II} \rightarrow \text{VI}$



erklärt werden. Falls man diese Annahme macht, kann auch beim Benzoin die nebenstehende Zwischenstufe auf zwei Wegen erreicht werden. Dies steht nicht im Widerspruch zu den experimentellen Ergebnissen von SCHEMJAKIN und MAJMIND<sup>16)</sup> und kann damit der Grund sein, daß beim Benzoin ein einheitlicher Mechanismus abzu-  
laufen scheint.

Es ist unwahrscheinlich, daß der Weg B, d. h. das Auftreten eines Produktes mit zwei H-Atomen an C-1 durch das bei der Osazonbildung auftretende Anilin bedingt ist, da angenommen werden kann, daß bis zur Bildung nennenswerter Anilinemengen keine freie Glucose mehr vorhanden ist.

Es mag zunächst auffallen, daß bei der Osazonbildung der Glucose nicht mehr die Lösung einer C-H-Bindung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, soweit Mechanismus B abläuft, sondern offensichtlich in vorhergehenden Reaktionsschritten liegt.

Die Beschleunigung der Glucosazonbildung und die erhöhten Ausbeuten, die sich durch Zusatz von aromatischen Aminen, wie Anilin, ergeben, kann nun durch Beschleunigung der bei der normalen Osazonbildung auftretenden langsamsten Stufe, der Amadori-Umlagerung, erklärt werden. Da der Verlust an Tritiumaktivität bei der Osazonbildung aus Glucose-[1-D, T] in D<sub>2</sub>O bei anfänglichem *p*-Toluidinzusatz mit 32% (Tab. 2, Vers. 8) sehr groß ist, kann geschlossen werden, daß sehr rasch 1-Desoxy-1-*p*-toluidino-D-fructose gebildet wird, die dann zu Osazon reagiert. Da jedoch bei dem Versuch die Osazonausbeute nicht bestimmt wurde, kann man nicht sagen, wie weit der Verlust durch den intermolekularen Isotopieeffekt verursacht wird. (Nach einer Schätzung sind nur 20% durch Tritiumabspaltung aus einem H<sub>2</sub>C-1-Körper bedingt.)

Wie durch Vergleich der Tabellen 4a und 4b zu ersehen ist, beschleunigt der Anilinzusatz die Osazonbildung sehr stark. Auch ist der anfängliche Tritiumeinbau wesentlich stärker und nimmt dann weniger stark zu. Macht man die Annahme, daß die letzten 10% Osazon aus Tab. 4b gänzlich über einen H<sub>2</sub>C-1-Körper gelaufen sind – d. h., maximaler T-Einbau –, so ergibt sich, daß von den zunächst gefaßten 26,7% nur  $\frac{2}{7}$  über einen H<sub>2</sub>C-1-Körper entstanden sind. In 4 Min. sind somit 19% Osazon über einen HC-1-Körper gebildet worden. Wenn man die Reaktionsdauer bei Vers. 1, Tab. 4b, auf 4,7 Min. linear extrapoliert, kommt man zu dem Ergebnis, daß die Bildungsgeschwindigkeit von Osazon über einen HC-1-Körper durch Anilin um das 1,5fache gesteigert wird.

Das Anilin bewirkt danach die Beschleunigung der Osazonbildung sowohl über einen H<sub>2</sub>C-1- wie auch einen HC-1-Körper (Weg B bzw. A). Man kann daraus die

Schlußfolgerung ziehen, daß das Anilin beide Wege beschleunigt, die auch ohne seine Anwesenheit ablaufen. Es ist unwahrscheinlich, daß das Anilin eine schneller ablaufende Osazonbildung über einen Mechanismus bewirkt, der ohne seine Anwesenheit gar nicht auftritt.

Die Untersuchungen werden fortgesetzt.

### BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Alle Radioaktivitätsangaben in den Tab. 2–4 sind Mittelwerte aus mehreren Messungen und mit einem Fehler von  $\pm 0.5\%$  behaftet. Nachstehend bedeuten  $H = {}^1H$ ,  $D = {}^2H$  und  $T = {}^3H$ .

Im folgenden wird zunächst die Darstellung der Glucose-[1-D, T] und ihrer Umwandlungsprodukte beschrieben. Die Gewinnung der Glucose-[1-T] erfolgte entsprechend, nur mit dem Unterschied, daß als Reduktionswasser tritiumhaltiges  $H_2O$  verwandt wurde und vor der Isolierung der Glucose-[1-T] aus dem Reaktionsgemisch die dreifache Menge nichtradioaktiver Glucose zugesetzt wurde.

Die Umwandlungsprodukte der Glucose-[1-T] wurden in gleicher Weise wie die entsprechenden deuteriumhaltigen gewonnen, wobei  $H_2O$  statt  $D_2O$  als Lösungsmittel diente und die Vorkehrungen zum Austausch von H gegen D entfielen.

1. *D-Glucose-[1-D, T] aus D-Gluconsäure- $\delta$ -lacton*<sup>23)</sup>: 1.6 g Natriumoxalat und 1.4 g wasserfreie Oxalsäure (Gehalt des Gesamtwasserstoffs an H nach Austausch mit  $D_2O$  etwa 15%) wurden in 39 ccm 99.8-proz. *Deuteriumoxyd* + 1 ccm  $H_2O$ , tritiumhaltig (Aktivität 25 mC) bei 0° soweit wie möglich gelöst. Dazu wurden 356 mg (2 mMol) *D-Gluconsäure- $\delta$ -lacton* gegeben und unmittelbar darauf 4.6 g 5-proz. Natriumamalgam in Plättchen. Bis zum völligen Verbrauch des Amalgams – etwa 1 Stde. – wurde kräftig gerührt, worauf das Reduktionswasser abdestilliert und für die weiteren Reduktionsansätze verwandt wurde.

Der Destillationsrückstand wurde mit 50 ccm 75-proz. Methanol bei 40–50° ausgezogen. Nachdem 19 weitere Reduktionsansätze gleicher Art mit derselben Extraktionslösung eluiert worden waren, wurde diese zum Sirup eingeeengt, der Rückstand in 50 ccm Wasser aufgenommen und zur Ausfällung von Oxalsäure mit 1.5 g Calciumcarbonat 30 Min. bei 100° behandelt. Nach Filtration wurde erneut zum Sirup eingedampft und dieser darauf mit 100 ccm Methanol 10 Stdn. bei Siedetemperatur extrahiert. Nachdem der Rückstand nochmals mit 50 ccm Methanol 5 Stdn. extrahiert worden war, ergaben die vereinigten Filtrate nach dem Eindampfen etwa 6 g Glucosesirup.

Die Reingewinnung der D-Glucose-[1-D, T] erfolgte über das *p*-Nitranilin-*N*- $\beta$ -D-glucosid<sup>24)</sup>. Der Glucosesirup wurde mit 6 g *p*-Nitranilin und 0.093 ccm konz. Salzsäure in 60 ccm Methanol in der Wärme gelöst und 30 Min. auf dem Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen kristallisierten etwa 3 g des *N*-Glucosids aus. Nach dem Absaugen wurde das Filtrat auf 30 ccm eingeeengt, worauf eine weitere Menge auskristallisierte. Nach mehrmaligem weiterem Einengen und Kristallisieren lagen 6.5 g an rohem Glucosid vor, die nach Umkristallisieren aus Methanol 5.9 g reines Produkt ergaben. Zur Spaltung des *p*-Nitranilin-*N*-glucosids wurde es mit 60 ccm Wasser und 0.6 ccm Eisessig 30 Min. unter Rückfluß erhitzt. Nach Absaugen des z. T. ausgefallenen Nitranilins wurde die wäßr. Lösung im Schacherl-

<sup>23)</sup> Vgl. H. S. ISBELL, J. V. KARABINOS, H. L. FRUSH, N. B. HOLT, A. SCHWEBEL und T. T. GALKOWSKI, J. Res. nat. Bur. Standards **48**, 163 [1952]; s. a. F. WEYGAND und H. SIMON, in Methoden der organ. Chemie (Houben-Weyl), Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1955, Bd. 4/2, S. 676.

<sup>24)</sup> F. WEYGAND, W. PERKOW und P. KUHNER, Chem. Ber. **84**, 594 [1951].

Extraktor 6 Stdn. mit Essigester eluiert, sodann auf 20 ccm eingeengt und mit Aktivkohle kurz aufgekocht. Das farblose Filtrat wurde nach Einengen zum Sirup in 5 ccm Methanol in der Wärme gelöst, worauf nach Animpfen die Kristallisation der *Glucose-[1-D,T]* sofort einsetzte. Ausb. 2.7 g (37.5 % d. Th., bez. auf das eingesetzte Glucolacton). 0.2 g dieser Menge wurden durch Ausschütteln des zur Extraktion verwendeten Essigesters mit Wasser und erneutes Extrahieren von Nitranilin mit Essigester erhalten.

Der Gehalt des an C-1 der Glucose gebundenen Gesamtwasserstoffs an H betrug etwa 9 %.

2. *Calciumgluconat aus D-Glucose-[1-D,T]*: 0.084 ccm Brom (1.7 mMol) wurden zu einer eiskalten Lösung von 250 mg (1.4 mMol) *Glucose-[1-D,T]* und 0.83 g Bariumbenzoat in 10.5 ccm Wasser gegeben. Nach 24stdg. Aufbewahren im Dunkeln war das Brom zum größten Teil verbraucht. Der Überschub wurde mit einem Luftstrom ausgetrieben, die Ba-Ionen als Bariumsulfat gefällt, die Bromwasserstoffsäure durch Behandlung mit 1 g Bleicarbonat, darauf mit 1 g Silberbenzoat gebunden. Nach Filtration wurden Silber und Blei mit Schwefelwasserstoff gefällt und nach Einengen des Filtrats auf 5 ccm der Rest von Benzoesäure durch Ausschütteln mit Chloroform entfernt. Die resultierende Lösung von Glucensäure war farblos und reduzierte Fehlingsche Lösung nicht. Nach Neutralisation mit Calciumcarbonat wurde auf 1 ccm eingeengt und das *Calciumgluconat* durch Zugabe der 3fachen Menge Methanol ausgefällt. Umkristallisiert wurde durch Lösen in 1 ccm Wasser, Aufkochen mit wenig Aktivkohle und Zusatz von 1 ccm Methanol. Ausb. 240 mg (80 % d. Th.).

3. *1-Desoxy-1-p-toluidino-D-fructose-[1-T]* aus *D-Glucose-[1-T]*: 1.4 g *D-Glucose-[1-T]* wurden mit 1.12 g *p-Toluidin*, 0.35 ccm H<sub>2</sub>O und 0.07 ccm 2*n* Essigsäure versetzt. Das Gemisch wurde 30 Min. auf siedendem Wasserbad gehalten, darauf mit 1.4 ccm Methanol versetzt und einige Stdn. im Eisschrank aufbewahrt. Nach Aufschlännen mit Methanol/Äther (1:3) wurde abgesaugt und mit Äthanol/Äther nachgewaschen. Ausb. 1.0 g (50 % d. Th.) *1-Desoxy-1-p-toluidino-D-fructose-[1-T]*; Schmp. 159–160° (aus Methanol).

4. *1-Desoxy-1-p-toluidino-D-fructose-[1-D,T]* aus nichtradioaktiver Glucose in tritiumhaltigem Deuteriumoxyd: 1.44 g Glucose wurden in 4.3 ccm D<sub>2</sub>O mit 0.3 % H<sub>2</sub>O-[T] gelöst, zum Sirup eingedampft und nach 2maliger Wiederholung dieser Behandlung mit 1.3 g *p-Toluidin* (Gehalt an H des auswaschbaren Wasserstoffs durch Austausch mit D<sub>2</sub>O-[T] = 0.5 %), 3.8 ccm D<sub>2</sub>O-[T] (0.3 % H<sub>2</sub>O) und 0.008 ccm Eisessig versetzt. Der Gehalt an H im Reaktionsgemisch betrug 0.4–0.5 % des auswaschbaren Gesamtwasserstoffs. Dann wurde 30 Min. auf siedendem Wasserbad erhitzt und die Isolierung wie unter 3. vorgenommen. Die entstandene *1-Desoxy-1-p-toluidino-D-fructose-[1-D,T]* wurde zur Entfernung des labil gebundenen Tritiums und Deuteriums 3 mal aus der 100fachen molaren Menge Methanol umkristallisiert.

5. *D-Glucose-phenylosazon-[1-D,T]* aus *D-Glucose-[1-D,T]* in Deuteriumoxyd: 150 mg *Glucose-[1-D,T]*, 360 mg *Phenylhydrazin-hydrochlorid* (labile H-Atome beider Substanzen gegen Deuterium ausgetauscht) und 300 mg wasserfreies Natriumacetat wurden in 3 ccm 99.8-proz. D<sub>2</sub>O gelöst und 45 Min. auf siedendem Wasserbad erhitzt. Danach wurde abgesaugt und mit Methanol gewaschen. Zur Umkristallisation wurde in 5 ccm Dioxan heiß gelöst, mit 5 ccm Wasser versetzt und das Dioxan etwa zur Hälfte i. Vak. abdestilliert. Ausb. nach Wiederholung der Umkristallisation etwa 100 mg (30 % d. Th.); Schmp. 205–208°. Der Gehalt an H im Reaktionsgemisch betrug etwa 5 % des auswaschbaren Gesamtwasserstoffs.

6. *D-Glucose-phenylosazon-[1-D,T]* aus nichtradioaktiver Glucose in tritiumhaltigem Deuteriumoxyd: Die Darstellung wurde wie bei 5. vorgenommen. Statt des 99.8-proz. D<sub>2</sub>O wurde als Lösungsmittel und für den Austausch der labilen H-Atome D<sub>2</sub>O mit 0.3 % H<sub>2</sub>O-[T] verwandt.

Das Osazon-[1-D,T] wurde zur Entfernung des labil gebundenen Tritiums 3mal aus Dioxan/Wasser umkristallisiert.

7. *D-Glucose-phenylosazon-[1-T] aus 1-Desoxy-1-p-toluidino-D-fructose-[1-T]*; unvollständige Umsetzungen: Die partiellen Umsätze wurden durch Anwendung unterschüssiger Mengen von Phenylhydrazin erreicht. Jeweils 1 mMol 1-Desoxy-1-p-toluidino-D-fructose-[1-T] (270 mg) wurde bei dem Umsatz von 3 %, 25 %, 64 %, 84 % und darüber mit jeweils 0.3 mMol, 1.5 mMol, 2.7 mMol bzw. 3.1 mMol Phenylhydrazin-hydrochlorid und gewichtsmäßig gleichen Mengen krist. Natriumacetat in 4 ccm 85-proz. Methanol auf dem Wasserbad erhitzt. Nach etwa 5 Min. begann die Ausscheidung des Osazons. Nach weiterem Erhitzen unter Rückfluß (30 Min.) wurde das Osazon isoliert und wie unter 5. umkristallisiert.

Zur genauen Bestimmung der entstandenen Osazonmengen wurde das Osazon jeweils nach einmaligem Umkristallisieren aus Dioxan/Wasser gewogen und der Osazongehalt der angefallenen Mutterlaugen photometrisch bestimmt.

8. *Abbau von D-Glucose-phenylosazon-[1-D,T] zu 1-Phenyl-4-phenylhydrazono-pyrazolon-(5)*<sup>21)</sup>: 1 g des Osazons wurde in 400 ccm 66-proz. Methanol heiß gelöst. Nach Abkühlen auf 35–40° wurde eine Lösung von 2.3 g Natriummetaperjodat in 50 ccm Wasser und 0.5 ccm konz. Schwefelsäure zugesetzt. Es fiel ein gelber Niederschlag von Mesoxaldialdehyd-bis-phenylhydrazon aus, der sich nach etwa 2 Stdn. wieder gelöst hatte. Gleichzeitig begann die Kristallisation von orangegelbem 1-Phenyl-4-phenylhydrazono-pyrazolon-(5). Nach 12 Stdn. wurde abgesaugt und mit 66-proz. Methanol gewaschen. Ausb. 230 mg (30 % d. Th.), Schmp. 143–144°, nach Umkristallisieren aus Methanol Schmp. 146°.

9. *Fraktionierte Bildung von D-Glucose-phenylosazon-[1-D,T] aus Glucose-[1-T] in Deuteriumoxyd*: 540 mg Glucose-[1-T] (3 mMole), 1.44 g Phenylhydrazin-hydrochlorid (10 mMole) (labile H-Atome beider Substanzen gegen D ausgetauscht), und 1.3 g wasserfreies Natriumacetat wurden in 10 ccm reinem Deuteriumoxyd erhitzt. Der Gehalt an H des gesamten auswaschbaren Wasserstoffs betrug 0.1 %. Nach 7 Min. hatte sich eine gewisse Menge Osazon gebildet; es wurde rasch abgekühlt und auf der Nutsche abgezogen. Das Filtrat wurde erneut auf 100° erhitzt. Die nächsten Osazonfraktionen wurden nach weiteren Erhitzungszeiten von 7, 12, 17, 15 und 45 Min. in gleicher Weise gewonnen. Die Rohausbeute an Osazon betrug 590 mg (55 % d. Th.). Die Reinigung erfolgte wie unter 5. angegeben.

10. *Fraktionierte Bildung von D-Glucose-phenylosazon-[1-D,T] aus nichtradioaktiver Glucose in tritiumhaltigem Deuteriumoxyd*: Die Gewinnung der Osazonfraktionen erfolgte wie unter 9. Als Lösungsmittel bei der Reaktion diente das zur Reduktion des Gluconsäurelactons benutzte und durch Destillation wiedergewonnene tritiumhaltige Deuteriumoxyd mit etwa 9 % H.

11. *Fraktionierte Bildung von D-Glucose-phenylosazon-[1-D,T] aus nichtradioaktiver Glucose in tritiumhaltigem Deuteriumoxyd unter Zusatz von Anilin*: Die Darstellung wurde wie unter 10. vorgenommen. Pro mMol Glucose wurden dem Reaktionsgemisch 4 mMole Anilin und 4 mMole Eisessig zugesetzt.

12. *Behandlung von 1-Desoxy-1-p-toluidino-D-fructose-[1-T] in alkalischer urd schwach saurer Lösung*: 270 mg wurden in 5 ccm 0.2*n* methanol. Natronlauge bei Zimmertemperatur rasch gelöst und die Lösung nach 2 Min. mit 0.2*n* methanol. Salzsäure wieder neutralisiert. Die Verbindung kristallisierte aus der neutralen Lösung schnell wieder aus. Die Analyse nach Umkrist. aus Methanol ergab einen Verlust von 46 % des Tritiumgehaltes. Gleiche Versuche, bei denen die Neutralisation nach 7 bzw. 30 Min. erfolgte, gaben Tritiumverluste von 64 bzw. 72 %.

Zur Behandlung in schwach saurer Lösung wurden 270 mg in 5 ccm einer Citronensäure/sek. Natriumphosphat-Puffermischung von  $p_H$  5.0 gelöst und 45 Min. auf  $100^\circ$  erhitzt. Es zeigte sich nach Umkristallisieren aus Methanol ein Tritiumverlust von 7.5 %.

13. *Versuch der Isotopieeffektbestimmung bei der Reaktion 1-Desoxy-1-p-toluidino-D-fructose-[1-T]  $\rightarrow$  Osazon-[1-T] nach den Formeln von BIGELEISEN<sup>17)</sup>*: Es wurde, wie unter 7. beschrieben, mit 4.042 g 1-Desoxy-1-p-toluidino-D-fructose-[1-T] ein 28.4-proz. Umsatz zum Osazon durchgeführt. Die Isolierung des nicht umgesetzten Materials erfolgte durch Extraktion der auf  $1/4$  eingeeengten Mutterlauge der Osazonfällung mit Äther im Schacherl-Extraktor. Nach 12 Stdn. Extraktionszeit war ein großer Teil der Verbindung im Äther auskristallisiert, der durch Umkristallisieren aus Methanol gereinigt wurde. Die Tritiumbestimmung ergab:

Molare Radioaktivität des nicht umgesetzten Ausgangsproduktes

$$N_1 = 1773 \text{ Imp./Min. } \mu\text{Mol.}$$

molare Radioaktivität des Ausgangsproduktes  $N_2 = 1300 \text{ Imp./Min. } \mu\text{Mol.}$

Zur Bestimmung der nicht umgesetzten Menge an 1-Desoxy-1-p-toluidino-D-fructose-[1-T] war ein Drittel der Mutterlauge der Osazonfällung abgetrennt und in ihm 1.0026 g nichtradioaktive 1-Desoxy-1-p-toluidino-D-fructose gelöst worden. Nach Wiederisolierung hatte die 1-Desoxy-1-p-toluidino-D-fructose-[1-T] eine molare Radioaktivität von 455 Imp./Min.  $\mu\text{Mol.}$  Nach dem Ansatz

$$\frac{x}{x + 1.0026} = \frac{455}{1773}$$

wurde die Menge an nicht umgesetzter 1-Desoxy-1-p-toluidino-D-fructose-[1-T] berechnet.

Zur Bestimmung des sekundären Isotopieeffektes ergab sich nach einem 3-proz. Umsatz 1-Desoxy-1-p-toluidino-D-fructose-[1-T]  $\rightarrow$  Osazon die molare Radioaktivität des Reaktionsproduktes  $N_3 = 90.5 \text{ Imp./Min. } \mu\text{Mol.}$  Die Ausgangsverbindung hatte eine Radioaktivität  $N_2 = 211 \text{ Imp./Min. } \mu\text{Mol.}$  Die geringe Menge des entstandenen Osazons kristallisierte nach Einengen des Reaktionsgemisches aus.

14. *Errechnung des Isotopieeffektes der Reaktion 1-Desoxy-1-p-toluidino-D-fructose-[1-T]  $\rightarrow$  Osazon-[1-T] aus dem 3-proz. Umsatz*: Die Berechnung aus der im allgemeinen Teil entwickelten Formel erfolgt durch Ersatz des *intramol. IE* durch *k IE*, da beide über die Gleichung

$$k \text{ IE} = \frac{2 \text{ i IE}}{\text{sek. IE} + \text{i IE} \cdot \text{sek. IE}}$$

miteinander verbunden sind. Der *sek. IE* konnte gesondert berechnet werden. In rechnerisch einfacherer Weise kann die Richtigkeit der aus der Extrapolation der *IE*-Kurve erhaltenen Werte für *k IE* und *i IE* durch Einsetzen in die Formel geprüft werden. Der errechnete Wert stimmt mit den experimentell erhaltenen gut überein.