

KURT HEYNS und HERMANN BREUER

**Darstellung und Verhalten weiterer *N*-substituierter  
2-Amino-2-desoxy-aldosen aus D-Fructose und Aminosäuren<sup>1)</sup>**

Aus dem Chemischen Staatsinstitut der Universität Hamburg,  
Abteilung für Organische Chemie

(Eingegangen am 22. August 1958)

Umsetzung von D-Fructose mit  $\gamma$ -Amino-buttersäure, L-Valin,  $\epsilon$ -Aminocaprinsäure, L-Phenylalanin, L-Tyrosin, L-Asparaginsäure, L-Glutaminsäure und L-Leucin liefert unter Umlagerung die entsprechenden „Glucose-Aminosäuren“. Zugleich entstehen die epimeren „Mannose-Aminosäuren“, von denen D-Mannose-L-Glutaminsäure und D-Mannose-L-Asparaginsäure isoliert wurden. Überraschenderweise konnten auch „Fructose-Aminosäuren“ unter den Reaktionsprodukten aufgefunden und erstmalig kristallisiert isoliert werden. — Die Rückspaltung der Glucose-Aminosäuren verläuft bis zu einem Gleichgewichtszustand; unter gleichen Bedingungen werden Glucose-Aminosäuren aus Fructose und Aminosäuren gebildet. Umlagerung und Rückspaltung sind in charakteristischer Weise von der  $H^+$ -Ionenkonzentration abhängig.

Kohlenhydrat-Aminosäureverbindungen sind in verschiedener Hinsicht von erheblicher Bedeutung, wenn auch ihr Aufbau und ihre Funktionen noch weitgehend ungeklärt sind<sup>2)</sup>. Die von BORSOOK und Mitarbb.<sup>3)</sup> aus Leberextrakten isolierten 1-[*N*-Aminosäure]-1-desoxy-fructosen — „Fructose-Aminosäuren“, die aus Glucose und Aminosäuren entstehen — sind Verbindungen dieser Art, die genauer untersucht worden sind.

Im Rahmen früherer Untersuchungen über das Verhalten von Ammoniak und Aminen bei der Umsetzung mit D-Fructose konnte ein unter Umlagerung verlaufender Reaktionstyp<sup>4)</sup> aufgefunden werden<sup>4-8)</sup>, welcher zum D-Glucosamin bzw. dessen *N*-substituierten Derivaten führt; dieser Weg wird offensichtlich auch bei der Biosynthese beschritten<sup>9, 10)</sup>. Bei der Verwendung von Aminosäuren als Aminkomponente bei der Umlagerung der zunächst gebildeten Ketosylaminstufe (I) entstehen 2-*N*-

\* Zusammenfassende Übersicht bei H. H. BAER, Fortschr. chem. Forsch. 3 [1954—1958], Chemie der Aminozucker, S. 862ff.

<sup>1)</sup> Vgl. K. HEYNS, H. BREUER und H. PAULSEN, Chem. Ber. 90, 1374 [1957].

<sup>2)</sup> F. MICHEEL, Kohlenhydrat-Eiweißverbindungen und ihre biochemische Bedeutung: Veröffentlichung der Arbeitsgemeinschaft des Landes Nordrhein-Westfalen (Naturwiss.) H. 44, Köln und Opladen [1956].

<sup>3)</sup> H. BORSOOK, A. ABRAMS und P. H. LOWY, J. biol. Chemistry 215, 111 [1955].

<sup>4)</sup> K. HEYNS und W. KOCH, Z. Naturforsch. 7b, 486 [1952].

<sup>5)</sup> K. HEYNS und K. H. MEINECKE, Chem. Ber. 86, 1453 [1953].

<sup>6)</sup> K. HEYNS, R. EICHSTEDT und K. H. MEINECKE, Chem. Ber. 88, 1551 [1955].

<sup>7)</sup> J. F. CARSON, J. Amer. chem. Soc. 77, 1881, 5957 [1955]; 78, 3728 [1956].

<sup>8)</sup> K. HEYNS, H. PAULSEN, R. EICHSTEDT und M. ROLLE, Chem. Ber. 90, 2039 [1957].

<sup>9)</sup> L. F. LÉLOIR und C. E. CARDINI, Biochim. Biophysica Acta 12, 15 [1953]; 20, 33 [1956].

<sup>10)</sup> J. B. WOLFE und Mitarbb., Arch. Biochem. Biophysics 64, 480, 489 [1956]; 66, 323 [1957].



Daß bei der Umsetzung von D-Fructose mit Aminoverbindungen nicht nur D-Glucosaminoderivate entstehen, sondern auch solche, die sich vom epimeren Aminozucker D-Mannosamin ableiten, konnte zum erstenmal bei der Verwendung von Glycin als Aminkomponente nachgewiesen werden<sup>1)</sup>. Es zeigte sich aber bald, daß alle Aminosäuren bei der Umsetzung mit D-Fructose Derivate dieses bisher seltenen und synthetisch nur schwer zugänglichen Aminozuckers<sup>11)</sup> in jeweils wechselnden Anteilen liefern (D-Mannose-Aminosäuren III), die auf dem Papierchromatogramm in Butanol/Eisessig/Wasser (70:7:23) etwas schneller wandern als die entsprechenden Glucose-Aminosäuren, bei der Behandlung mit 2*n* Essigsäure jedoch ebenfalls wieder rückläufig in D-Fructose und Aminosäure gespalten werden können. D-Mannose-L-Glutaminsäure und D-Mannose-L-Asparaginsäure wurden analysenrein in amorpher Form isoliert. Diese Verbindungen drehen, wie auch D-Mannose-Glycin<sup>1)</sup>, schwach negativ. Beim Erwärmen mit Phenylhydrazin in essigsaurer Lösung erhält man aus beiden Verbindungen D-Glucose-phenylosazon.

Das Verhältnis, in dem D-Mannose-Aminosäuren und D-Glucose-Aminosäuren nebeneinander auftreten, hängt von den Reaktionsbedingungen ab. Läßt man D-Fructose in Methanol mit Glycin reagieren, so beträgt der Anteil an D-Mannose-Glycin etwa 40 % der Gesamtausbeute, bei der Verwendung von Eisessig als Lösungsmittel dagegen nur 20–25 %. L-Tyrosin, in Dimethylsulfoxyd mit D-Fructose umgesetzt, bildet nur sehr wenig D-Mannose-L-Tyrosin. Ganz allgemein zeigte sich, daß in Methanol relativ mehr D-Mannose-Aminosäuren gebildet werden als in Eisessig oder Dimethylsulfoxyd.

Überraschend war die Beobachtung, daß aus Aminosäuren und D-Fructose auch D-Fructose-Aminosäuren (IV) entstehen, jene Verbindungen also, die normalerweise aus D-Glucose und Aminosäuren durch Amadori-Umlagerung erhalten werden<sup>12)</sup>. Die Mutterlauge der D-Glucose-L-Phenylalanin-Kristallisation enthielt neben einer Reihe weiterer Nebenprodukte als Hauptbestandteil eine Verbindung, die auf dem Papierchromatogramm wenig langsamer wanderte als D-Glucose-L-Phenylalanin und durch Säulenchromatographie an Cellulosepulver (Whatman-Standard) mit wasser-gesättigtem Butanol als Eluierungsmittel von den Begleitstoffen abgetrennt werden konnte. Das erhaltene amorphe Produkt reduziert eine alkalische Lösung von Kaliumhexacyanoferrat(III) bereits in der Kälte und wird bei der Behandlung mit 2*n* Essigsäure bei 100° zerstört, wobei Hydroxymethyl-furfurol und Phenylalanin entstehen. Das Verhalten der Substanz gleicht somit dem der Fructose-Aminosäuren. Ihre Identifizierung wurde dadurch erleichtert, daß sie zur Kristallisation gebracht werden konnte. Sie erwies sich in allen Eigenschaften (papierchromatographisches Verhalten, Schmelzpunkt, Misch-Schmelzpunkt, spezif. Drehung und IR-Spektrum) als identisch mit D-Fructose-L-Phenylalanin, welches durch Amadori-Umlagerung aus D-Glucose und L-Phenylalanin dargestellt werden konnte, und zwar im Gegensatz zu den in der Literatur bisher nur als amorphe Produkte beschriebenen Fructose-

<sup>11)</sup> Vgl. P. A. LEVENE, *Biochem. Z.* **124**, 37 [1921]; R. KUHN und W. KIRSCHENLOHR, *Liebigs Ann. Chem.* **600**, 115 [1956]; R. KUHN und W. BISTER, *Liebigs Ann. Chem.* **602**, 217 [1957]; S. ROSEMAN und D. G. COMB, *J. Amer. chem. Soc.* **80**, 497, 3166 [1958].

<sup>12)</sup> A. ABRAMS, P. H. LOWY und H. BORSOOK, *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 4794 [1955]; P. H. LOWY und H. BORSOOK, ebenda **78**, 3175 [1956]; vgl. auch A. KLEMER und F. MICHEEL, *Chem. Ber.* **89**, 1242 [1956].

Aminosäuren ebenfalls in schön kristallisierender Form<sup>\*)</sup>. Aus den Reaktionsprodukten von 2 g L-Phenylalanin mit D-Fructose konnten neben 1 g D-Glucose-L-Phenylalanin mehr als 0.3 g D-Fructose-L-Phenylalanin isoliert werden.

Die Entstehung von Fructose-Aminosäuren ließ sich bei allen untersuchten Aminosäuren und unter allen angewandten Reaktionsbedingungen nachweisen. Zuweilen, wie zum Beispiel in Eisessig, treten sie nur in sehr geringer Menge auf, meistens aber können sie nicht übersehen werden, besonders bei der Verwendung von Methanol als Lösungsmittel. Auch bei der Umsetzung von L-Sorbose mit Glycin tritt neben L-Gulose-Glycin und L-Idose-Glycin offensichtlich auch L-Sorbose-Glycin auf.

Von besonderer Bedeutung erscheint uns der beträchtliche Anteil an Fructose-Aminosäuren neben den Aldose-Aminosäuren. Über die als Zwischenstufen der Ketosylamin-Umlagerung auftretenden N-Fructoside können sie nicht entstanden sein. Ihre Entstehung ließe sich durch eine Lobry-de-Bruyn-van-Ekenstein-Umlagerung eines Teiles der D-Fructose zu D-Glucose und D-Mannose und deren weiterer Umsetzung mit den Aminosäuren deuten. Dies erscheint jedoch fraglich, da die Reaktionsbedingungen ein derartiges Ausmaß der Fructose-Umlagerung kaum ermöglichen, daß bis zu 25% Fructose-Aminosäuren auftreten könnten. D-Glucose konnten wir in keinem Fall nach der Abtrennung der Zucker-Aminosäuren neben der im Überschuß angewandten Fructose feststellen.

Aus früheren Modellversuchen<sup>12a)</sup> ergeben sich jedoch Hinweise auf den Reaktionsverlauf insofern, als wir feststellen konnten, daß endständige Ketole mit Aminen in der Regel aus der Form ihrer tautomeren Hydroxyaldehyde zu Aminoketonen und nicht zu Aminoaldehyden führen. Es reagieren hierbei die im Gleichgewicht vorhandenen geringen Hydroxyaldehydanteile infolge ihrer erheblich höheren Reaktivität ausschließlich in Richtung Aminoketon. Da bekanntlich ein sehr geringer Anteil der Fructose in der offenen Form vorliegt, die nicht wie die Halbacetalform N-Glucoside und damit Glucose-Aminosäuren bilden kann, wäre damit ein Weg zu einer Umsetzung aus der Hydroxyaldehydform wie bei den Modellversuchen gegeben, der dann zu Fructose-Aminosäuren führt. Die Geschwindigkeit dieser letzten Reaktion dürfte größer sein als die der Bildung von Glucose-Aminosäuren, denn trotz der sehr geringen Konzentration der offenen Fructose sind Fructose-Aminosäuren stets in wechselndem, aber mengenmäßig deutlichem Ausmaße in den Reaktionsmischungen vorhanden.

Für die Umsetzung der Fructose mit den Aminosäuren haben sich außer Methanol auch Eisessig und Dimethylsulfoxyd als Lösungsmittel bewährt. Die Reaktionstemperaturen liegen vorteilhaft zwischen Raumtemperatur und 70–80°, die Reaktionszeiten zwischen einigen Stunden und mehreren Wochen. Die Abtrennung der Reaktionsprodukte von den Ausgangsstoffen erfolgt mit Hilfe von Ionenaustauschern, die weitere Auftrennung der Reaktionsprodukte durch Kristallisation, Ionenaustauscher- oder Säulenchromatographie bzw. Kombination dieser Verfahren. Hierbei macht man sich die Eigenschaft zunutze, daß die Hexose-Aminosäuren von stark sauren Ionenaustauschersäulen (Lewatit S 100, Dowex 50, H<sup>+</sup>-Form) mit verdünnten Trichloressigsäurelösungen in der Reihenfolge Glucose-Aminosäure, Mannose-

<sup>\*)</sup> Erstmals kristallisiert wurden von uns eine ganze Reihe von Fructose-Aminosäuren gewonnen. So haben wir sowohl auf synthetischem Wege als auch aus Leberextrakten D-Fructose-Glycin, D-Fructose-L-Alanin, D-Fructose-L-Valin und D-Fructose-L-Asparaginsäure in schön kristallisierter Form erhalten können. Über diese Untersuchungen wird in anderem Zusammenhang berichtet werden.

<sup>12a)</sup> K. HEYNS und W. STUMME, Chem. Ber. **89**, 2833, 2844 [1956].

Aminosäure und Fructose-Aminosäure eluiert werden, während sie auf dem Papierchromatogramm (Butanol/Eisessig/Wasser 70:7:23) sowie auf Cellulosesäulen mit wassergesättigtem Butanol als Eluierungsmittel in der Reihenfolge Mannose-Aminosäuren, Glucose-Aminosäuren und Fructose-Aminosäuren wandern. Eine weitere Trennungsmöglichkeit bietet sich durch die Anwendung von Kohle-Celite-Säulen. Eine solche Säule liefert im Falle der Glutaminsäure zuerst die D-Fructose-Verbindung, einen recht labilen Stoff, der auf diesem Wege besonders schnell und schonend von den übrigen Reaktionsprodukten abgetrennt werden kann.

Die Reaktionsweise der verschiedenen Aminosäuren ist sehr unterschiedlich, so daß kein einheitliches Schema angegeben werden kann. Wir berichten nachstehend über unsere Erfahrungen etwas genauer, da sich hieraus Rückschlüsse in bezug auf die Frage ergeben, ob Verbindungen aus Hexosen und Aminosäuren, wie sie in Leberpräparaten nachweisbar sind, dort normalerweise vorkommen oder aber erst durch Sekundärreaktionen gebildet werden.

$\gamma$ -Amino-buttersäure reagiert bereits bei Raumtemperatur in methanolischer Lösung mit D-Fructose. Hauptprodukt der Reaktion ist die schön kristallisierende Glucose- $\gamma$ -Amino-buttersäure. Ähnlich verhält sich  $\epsilon$ -Amino-capronsäure ebenfalls unter Bildung einer als Hauptprodukt kristallisiert erhältlichen Glucose-Verbindung.

L-Valin löst sich beim Kochen in methanolischer D-Fructuselösung nur sehr langsam auf, schneller bei Gegenwart von katalytischen Mengen Oxalsäure. Hauptprodukt ist D-Glucose-L-Valin neben D-Mannose-L-Valin und D-Fructose-L-Valin. D-Glucose-L-Valin kristallisiert nach dem Umfällen des Rohproduktes. Es ist in Wasser relativ leicht löslich. Eine teilweise Auftrennung von D-Mannose- und D-Fructose-L-Valin gelingt mit Hilfe von Dowex-50. Auch das D-Fructose-L-Valin wurde kristallisiert erhalten. Es war mit einem aus D-Glucose und L-Valin erhaltenen Produkt identisch. (Die halbquantitative Aufarbeitung eines Ansatzes von 3 g L-Valin ergab, daß mindestens 640 mg D-Glucose-L-Valin, 360 mg D-Fructose-L-Valin und 200 mg D-Mannose-L-Valin entstanden waren.)

L-Tyrosin setzt sich in methanolischer D-Fructuselösung beim Kochen nicht um. Auch Eisessig erwies sich als ungeeignet. Dagegen bewährte sich Dimethylsulfoxyd als Lösungsmittel. Man erhält schön kristallisierendes D-Glucose-L-Tyrosin in guter Ausbeute; daneben entstehen nur sehr wenig Mannose- bzw. Fructose-Derivate. Glucose-L-Tyrosin reduziert eine alkalische Lösung von Kalium-hexacyanoferrat(III) schon in der Kälte auf Grund der phenolischen OH-Gruppe und kann deshalb Fructose-Aminosäuren vortäuschen. An Nebenprodukten konnten Glucosamin sowie eine unbekannte Verbindung ( $R_F$ -Wert 0.06) nachgewiesen werden, die im Papierchromatogramm nach mehrtägiger Laufzeit wenig langsamer als D-Glucose-Glycin wandert und bei der Behandlung mit 2*n* Essigsäure gespalten wird, wobei ein kräftiger Fructosefleck auf dem Papierchromatogramm auftritt, während ninhydrinpositive Spaltprodukte praktisch nicht beobachtet werden; dies müßte aber der Fall sein, wenn die unbekannte Verbindung eine Hexose-Aminosäure wäre. Wir vermuten hier ein Abbauprodukt des D-Glucose-L-Phenylalanins, das zwar noch die Aminogruppe, den Phenylrest jedoch nicht mehr enthält.

L-Asparaginsäure und L-Glutaminsäure setzt man mit D-Fructose um, indem man etwa ein Mol. Natriummethylat pro Mol. Aminosäure zusetzt. In Dimethylsulfoxyd als Lösungsmittel kommt man ohne Alkalizusatz aus. Die Reaktionsprodukte lassen sich durch wiederholte Austauschchromatographie voneinander trennen. Man erhält amorphe Substanzen, die durch Umfällen analysenrein werden. In verdünnten alkoholischen Lösungen der Hexose-L-Glutaminsäuren bzw. Hexose-L-Asparaginsäuren entstehen bei Gegenwart von wenig Salzsäure je nach Säuregehalt und Einwirkungsdauer Mono- bzw. Dialkylester, die auf dem Papierchromatogramm erheblich schneller als die Ausgangsprodukte wandern ( $R_F$ -Werte: D-Glucose-L-Asparaginsäure 0.06; D-Glucose-L-Asparaginsäure-monomethylester 0.36). Sie werden wie die Ausgangsprodukte von ammoniakalischer Silbernitratlösung und von Chlor/*o*-Tolidin<sup>13)</sup> angefärbt. In saurer, wäßriger Lösung sind sie beständig, von verdünnten Alkalien dagegen werden sie bereits bei Raumtemperatur außerordentlich rasch verseift, wobei wieder die Hexose-Aminosäuren entstehen. Die Methylester lassen sich auch mit Hilfe von Diazomethan in methanolischer Lösung darstellen.

D-Glucose-L-Serin entsteht mit den besten Ausbeuten in Eisessig als Lösungsmittel. Es konnte bisher nicht zur Kristallisation gebracht werden.

L-Sorbose reagiert mit Aminosäuren genau so gut wie D-Fructose. Mit Glycin erhält man überwiegend L-Gulose-Glycin neben etwas L-Idose-Glycin und L-Sorbose-Glycin. Das L-Gulose-Glycin wurde durch Ionenaustauscherchromatographie als papierchromatographisch einheitliches, amorphes Pulver mit der spezif. Drehung  $[\alpha]_D^{20}$ : +19° isoliert. Im Vergleich dazu hat L-Gulosamin-hydrochlorid die spezif. Drehung  $[\alpha]_D^{20}$ : +17.8° und L-Idosamin-hydrochlorid  $[\alpha]_D^{20}$ : -4.8°<sup>8)</sup>. L-Idose-Glycin wandert auf dem Papierchromatogramm wenig schneller, L-Sorbose-Glycin wenig langsamer als L-Gulose-Glycin.

Wir haben bereits darauf hingewiesen<sup>1)</sup>, daß die Glucose-Aminosäuren bei der Behandlung mit verdünnten organischen Säuren bei 110° rückläufig in D-Fructose und Aminosäuren gespalten werden. Daß diese Spaltung nicht vollständig ist, liegt offenbar daran, daß unter den gleichen Bedingungen Glucose-Aminosäuren entstehen können. Erwärmt man nämlich D-Fructose und Glycin mit 2*n* Essigsäure einige Stunden auf 110°, so läßt sich hinterher eindeutig Glucose-Glycin in der Lösung nachweisen. Auf Grund dieses Ergebnisses kann es im Gegensatz zu den noch ungeklärten Verhältnissen bei der Amadori-Umlagerung im Falle der Ketosylamin-Umlagerung als gesichert gelten, daß alle Reaktionsschritte reversibel sind, da Bedingungen aufgezeigt werden konnten, unter denen ein Gleichgewichtszustand sowohl von den Ausgangs- als auch von den Endprodukten der Reaktion her angestrebt wird. Dieses gilt unabhängig von der noch nicht geklärten Frage, ob die Umlagerung über eine Hydridverschiebung oder einen Protonenwanderungsmechanismus abläuft.

Umlagerung und Rückspaltung sind in charakteristischer Weise von der H<sup>+</sup>-Ionenkonzentration abhängig. Beide Vorgänge laufen bei Gegenwart schwacher Säuren besonders leicht ab, während sie durch stärkere Säuren merklich gehemmt werden. Nach H. S. ISBELL und H. L. FRUSH<sup>14)</sup> zeigt die Hydrolyse von N-Glykosiden eine

<sup>13)</sup> P. W. G. SMITH, J. chem. Soc. [London] 1957, 3985.

<sup>14)</sup> J. Res. Nat. Bur. Standards 46, 132 [1951].

starke  $p_H$ -Abhängigkeit. Die Autoren nehmen an, daß bei Gegenwart zu starker Säuren die *N*-Glykosid-Spaltung durch Ammonium-Ion-Bildung gehemmt wird und dadurch die Hydrolysegeschwindigkeit stark herabgesetzt wird. In ähnlicher Weise könnte die oben beschriebene Umlagerung und Rückspaltung bei Gegenwart starker Säuren durch Ammonium-Ion-Bildung verhindert werden.

### BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

*D-Glucose- $\gamma$ -Amino-buttersäure*: 1 g  $\gamma$ -Amino-buttersäure wurde in 100 ccm Methanol in der Wärme gelöst, ebenso 5 g *D-Fructose* in 50 ccm Methanol. Beide Lösungen wurden vereinigt, nachdem sie auf Raumtemperatur abgekühlt waren; den Ansatz beließ man bei Raumtemperatur.

Nach 10 Tagen wurde das Methanol abgedampft und der gelbe Rückstand, in wenig Wasser gelöst, auf eine Dowex-50-Säule (18  $\times$  300 mm) gegeben, mit Wasser gewaschen und mit 0.2 *n* Trichloressigsäure (TCE) eluiert (Fraktionen zu je 8 ccm).

Die Fraktionen 62–73 wurden im Perforator ausgeäthert und i. Vak. eingengt, in wenig Methanol aufgenommen und mit überschüss. Aceton versetzt, bis die Fällung vollständig war. Diese wurde abzentrifugiert und mit Aceton gewaschen. Beim Aufnehmen des acetoneuchten Niederschlages in Methanol kristallisierten 0.48 g *D-Glucose- $\gamma$ -Amino-buttersäure* aus. Schmp. 145–147° (Zers.). Aus Wasser/Äthanol Schmp. 150–151° (Zers.).  $[\alpha]_D^{20}$ : +86° (4 Min)  $\rightarrow$  +78° (Endwert) ( $c = 1$ , in Wasser).

$C_{10}H_{18}NO_7$  (265.2) Ber. C 45.28 H 7.22 N 5.28 Gef. C 44.33 H 7.40 N 4.94

*D-Glucose-L-Valin*: 3 g *L-Valin*, 30 g *D-Fructose* und 0.3 g wasserfreie Oxalsäure wurden in 200 ccm Methanol 4 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Die mittelbraune Lösung saugte man vom teils ungelöst gebliebenen *L-Valin* (930 mg) ab. Nach dem Einengen i. Vak. und Aufnehmen in wenig Wasser wurde das Produkt auf eine saure Ionenaustauschersäule (Lewatit S 100, H<sup>+</sup>-Form, 18+520 mm) gegeben und mit 0.5 *n* TCE eluiert.

Zur schnellen Prüfung der Austauschfraktionen auf Hexose-Aminosäuren bringt man auf einem Streifen Chromatographierpapier nebeneinander etwa von jeder fünften Fraktion einen Tropfen auf, trocknet, besprüht mit ammoniakalischer Silbernitratlösung, trocknet abermals und erwärmt dann kurz im Trockenschrank auf 110°. Hexose-Aminosäuren geben sich durch die bekannte Braunfärbung zu erkennen.

Alle in diesem Probest mit ammoniakalischem Silbernitrat positiv reagierenden Fraktionen (zusammen etwa 400 ccm) wurden im Perforator ausgeäthert und nach Einengen des Extraktes i. Vak. und Aufnehmen des Rückstandes in Methanol mit Äther gefällt. Nach dem Abzentrifugieren und mehrmaligen Waschen der Fällung mit Äther wurden 1.6 g Rohprodukt erhalten, aus dessen Lösung in wasserfreiem Methanol sich bald 490 mg Kristalle von *D-Glucose-L-Valin* abschieden, Schmp. 145–147° (Zers.), Bräunung ab 130°. Aus Wasser/Methanol Schmp. 153–155° (Zers.). Bräunung ab 135°.

$C_{11}H_{21}NO_7$  (279.3) Ber. C 47.30 H 7.58 N 5.02 Gef. C 46.86 H 7.69 N 4.86

$[\alpha]_D^{20}$ : +77° (4 Min.)  $\rightarrow$  +65° (Endwert) ( $c = 2$ , in Wasser).

*D-Glucose-L-Valin-phenylhydrazon*: 25 mg *D-Glucose-L-Valin* wurden in 0.2 ccm Wasser gelöst und, mit 35 mg *Phenylhydrazin* versetzt, bei Raumtemperatur stengelassen. Nach 5 Stdn. wurde mit 0.3 ccm Methanol und einigen Tropfen Äther versetzt und über Nacht im Eisschrank belassen. Die gebildeten Kristalle (20 mg) wurden abgesaugt, mit Methanol gewaschen und getrocknet. Nicht umkristallisierbar. Schmp. 138–140° (Zers.),  $R_F$  0.6.

$C_{17}H_{22}N_3O_6$  (369.4) Ber. N 11.38 Gef. N 11.03





Schmp. 120–125° ab, die nochmals aus Wasser/Äthanol umkristallisiert wurden. Ausb. 170 mg, Schmp. 125–130° (Zers.).  $[\alpha]_D^{20}$ : +84° (4 Min.) → +72° (Endwert) ( $c = 1$ , in Wasser).

$C_{12}H_{23}NO_7 \cdot H_2O$ (311.3)	Ber. (wasserfrei)	C 49.14 H 7.91 N 4.78
	Ber. (mit 1 Mol. Kristallwasser)	C 46.29 H 8.09 N 4.50
	Gef.	C 46.17 H 8.09 N 4.51

Die *D*-Glucose-*e*-Amino-capronsäure nimmt also beim Umkristallisieren ein Mol. Kristallwasser auf, was außer durch die Analyse auch durch das IR-Spektrum bestätigt wird.

*D-Glucose-L-Phenylalanin*: 5 g *L-Phenylalanin* und 15 g getrocknete *D-Fructose* wurden in 500 ccm Methanol 3 Stdn. zum Sieden erhitzt. Die klare braune Lösung wurde nach dem Einengen mit Wasser aufgenommen. Es bildete sich eine flockige braune Fällung, die abgesaugt und getrocknet wurde (0.65 g). Das Produkt ist in Methanol leicht löslich und fällt auf Zusatz von Wasser wieder aus. Auf dem Papierchromatogramm wandert es in Butanol/Eisessig mit der Front.

Das Filtrat dieser Fällung wurde an einer sauren Austauschersäule (Lewatit S 100, H<sup>+</sup>-Form, 30 × 500 mm) mit 0.2*n* TCE aufgetrennt. In den ersten 300 Fraktionen (je 10 ccm) waren papierchromatographisch keine Substanzen nachzuweisen. Die Fraktionen 300–900 waren schwach silbernitratpositiv. (Mit Hilfe einer kleinen Säule und konzentrierter TCE könnte die Auftrennung sicher beschleunigt werden.)

Die Ätherextrakte der vereinigten Fraktionen wurden eingengt. Gegen Ende des Einengens i. Vak. fiel ein Niederschlag aus, der nach Abtrennung in warmem Methanol gelöst wurde, aus dem er nach kurzer Zeit wieder ausfiel (0.75 g Rohprodukt).

Die vereinigten wäbr. und methanol. Mutterlaugen wurden eingengt, in etwas Methanol aufgenommen und mit großem Ätherüberschuß gefällt. Die amorphe Fällung zentrifugierte man ab, wusch in Äther und nahm noch ätherfeucht in Methanol auf. Aus der klaren gelblichen Lösung schieden sich über Nacht weitere Kristalle ab (0.3 g).

Das *D-Glucose-L-Phenylalanin* kann aus heißem Wasser umkristallisiert werden. Bessere Ausbeuten erhält man aus Wasser/Methanol. Schmp. 208–210° (Zers., braun ab 195°).  $[\alpha]_D^{20}$ : +57° (Endwert) ( $c = 1$ , in Wasser).

$C_{15}H_{21}NO_7$ (327.3)	Ber. C 55.04 H 6.47 N 4.28	Gef. C 54.68 H 6.50 N 4.38
----------------------------	----------------------------	----------------------------

*D-Fructose-L-Phenylalanin* (aus den Mutterlaugen der *D-Glucose-L-Phenylalanin-Kristallisationen*): Nach dem Einengen der Mutterlaugen von *D-Glucose-L-Phenylalanin* blieben etwa 2 g eines noch nicht ganz lösungsmittelfreien, gelben Sirups zurück, der nach dem Auflösen in etwas Methanol auf eine große Chromatographiesäule (55 × 650 mm) aufgebracht wurde, die mit Cellulosepulver (Whatman Standard) gefüllt war. Es wurde mit wasser-gesättigtem Butanol eluiert. Nach einem Vorlauf, der verworfen wurde, fing man Fraktionen von je 10 ccm auf. Die Fraktionen 30–80 enthielten vorwiegend *D-Mannose-L-Phenylalanin*. Die Fraktionen 80–97 enthielten überwiegend *D-Fructose-L-Phenylalanin* neben geringen Mengen *D-Glucose-L-Phenylalanin*. Die Fraktionen 98–125 enthielten lediglich *D-Fructose-L-Phenylalanin*. Die Fraktionen über 126 wurden verworfen.

Die vereinigten Fraktionen 80–97 wurden i. Vak. eingengt, bis auf ca. 5 ccm. Die amorphe Fällung wurde in wenig Methanol gelöst und mit Butanol versetzt, so daß gerade noch keine bleibende Trübung auftrat. Das *D-Fructose-L-Phenylalanin* kristallisierte im Eisschrank bald vollständig (164 mg).

Die Kristalle waren papierchromatographisch einheitlich. Die Mutterlauge enthielt noch *D-Glucose-L-Phenylalanin*. Aus den Fraktionen 98–125 wurden auf die gleiche Weise 152 mg *D-Fructose-L-Phenylalanin* isoliert. Gesamtausb. 316 mg *D-Fructose-L-Phenylalanin*. Schmp. 170° (Zers., braun ab 140°).  $[\alpha]_D^{20}$ : –33° (Endwert) ( $c = 2$ , in Wasser).

*D-Fructose-L-Phenylalanin* (durch *Amadori-Umlagerung*): 1 g *L-Phenylalanin* und 5 g *D-Glucose* wurden in 100 ccm Methanol 2 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Man engte i. Vak. ein, gab den in wenig Wasser aufgenommenen Sirup auf eine saure Austauschersäule (Lewatit S 100, H<sup>+</sup>-Form, 18 × 400 mm) und eluierte mit 0.5 n TCE (Fraktionen von je 10 ccm). Die gesuchte Verbindung war in den Fraktionen 40–160 enthalten. Ihre Ätherextrakte wurden eingengt und aus methanol. Lösung mit Äther ein amorphes Produkt ausgefällt, welches in Methanol löslich war und auf Zusatz von Butanol bald zu kristallisieren begann. Ausb. 570 mg. Schmp. 170° (Zers., braun ab 140°).  $[\alpha]_D^{20}$ : -33° (Endwert) ( $c = 2$ , in Wasser).

*D-Glucose-L-Tyrosin*: 1 g *L-Tyrosin* und 10 g *D-Fructose* wurden in 150 ccm frisch dest. Dimethylsulfoxyd 20 Stdn. unter Rühren auf 65° erwärmt. Die Fructose löste sich sofort, das Tyrosin nach einigen Stdn.

Es wurde im Vakuum bei Wasserbadtemperatur eingengt, der Rückstand, in wenig Wasser gelöst, auf eine Austauschersäule gegeben (Lewatit S 100, H<sup>+</sup>-Form, 18 × 300 mm), mit Wasser gewaschen und mit 0.5 n TCE eluiert (Fraktionen von 5–7 ccm). Jeweils gemeinsam verarbeitet wurden die Fraktionen 5–23 (diese enthielten ein Nebenprodukt mit dem  $R_F$ -Wert 0.06), 24–52 (diese enthielten ein Nebenprodukt mit dem  $R_F$ -Wert 0.11) und 53 bis 90. Will man die Nebenprodukte nicht isolieren, so kann man selbstverständlich alle Fraktionen gemeinsam aufarbeiten. Über die Nebenprodukte vergleiche die Ausführungen im allgemeinen Teil.

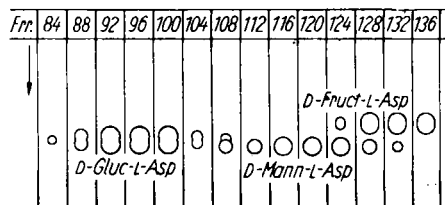
Aus jeder dieser Fraktionen wurden zunächst durch Ausäthern, Einengen und Fällern aus methanol. Lösung mit Äther amorphe Rohprodukte isoliert (insgesamt 872 mg), die nach Lösen in Methanol krist. *D-Glucose-L-Tyrosin* liefern (Gesamtausbeute 435 mg), Schmp. 197°. Das *D-Glucose-L-Tyrosin* läßt sich aus heißem Wasser auf Zusatz der doppelten Menge Methanol umkristallisieren.  $[\alpha]_D^{20}$ : +63° (4 Min.) → +52° (Endwert) ( $c = 2$ , in Wasser).

$C_{15}H_{21}NO_8$ (343.3)	Ber. (wasserfrei)	C 52.47	H 6.17	N 4.08
	Ber. (mit 1 Mol. Kristallwasser)	C 49.86	H 6.42	N 3.88
	Gef. (1 mal umkrist.)	C 50.40	H 6.36	N 3.80
	Gef. (2 mal umkrist.)	C 50.78	H 6.26	N 4.13

Der auch nach zweimaligem Umkristallisieren zu niedrig gefundene C-Wert deutet auf Kristallwasser hin.

*D-Glucose-L-Asparaginsäure*, *D-Mannose-L-Asparaginsäure* und *D-Fructose-L-Asparaginsäure* aus *D-Fructose* und *L-Asparaginsäure*: 5 g *L-Asparaginsäure* und 50 g getrocknete *D-Fructose* wurden in 800 ccm wasserfreiem Methanol, worin 1.05 g Na gelöst worden waren, 20 Stdn. unter Rühren auf 40° erwärmt. An der Wand hatten sich rotbraune Krusten abgeschieden. Man engte i. Vak. ein und nahm in Wasser auf (eine Spur ungelöst gebliebener *L-Asparaginsäure* war noch vorhanden). Die wäbr. Lösung (200 ccm) wurde auf eine Austauschersäule gegeben (Dowex 50, H<sup>+</sup>-Form, 200–400 mesh, 25 × 500 mm). Die Fructose wurde mit Wasser gut ausgewaschen. Dann eluierte man mit 0.1 n TCE (Fraktionen von je 8 ccm). Die Reaktion der Fraktionen 80–145 mit ammoniakalischem Silbernitrat war positiv. Abbild. 2 zeigt das papierchromatographische Bild der Austauschertrennung.

Abbild. 2  
Austauschertrennung des  
Glucose-Asparaginsäure-  
Ansatzes  
(Papierchromatogramme)



Der in den Fraktionen 80–103 enthaltene Stoff zeigt einen Doppelfleck im Chromatogramm. Er ist in den Fraktionen 90–100 sehr intensiv. Die Intensität durchläuft dann in Fraktion 104 ein deutliches Minimum. Daher kann der in den folgenden Fraktionen enthaltene Stoff, der in den Fraktionen 115–125 besonders intensiv ist und keinen Doppelfleck im Chromatogramm gibt, nicht mit dem ersten Stoff identisch sein, obwohl beide fast den gleichen  $R_F$ -Wert haben. Nach den allgemeinen Erfahrungen mußte das zuerst von der Säule eluierbare Produkt D-Glucose-L-Asparaginsäure sein, das dann folgende D-Mannose-L-Asparaginsäure, von der die zuletzt erscheinende D-Fructose-L-Asparaginsäure im Papierchromatogramm deutlich getrennt zu sehen ist und im Gegensatz zu den braunen Glucose- und Mannose-Verbindungen einen schwarzbraunen Fleck gibt.

Der Doppelfleck in den Fraktionen 80–103 hat nichts zu bedeuten. Die Verbindung erwies sich als einheitlich. (Es scheint eine allgemeine Eigenschaft der Glucose-Aminosäuren zu sein, in manchen Fällen einen Doppelfleck im Chromatogramm zu geben. Dieselbe Erscheinung wurde bereits bei reinem, kristallisiertem Glucose-Glycin beobachtet.)

Die vereinigten Fraktionen 80–103 wurden ausgeäthert, die Extrakte eingengt und sofort einer zweiten Austauschertrennung über eine kleine Dowex-50-Säule unterworfen. Nach dem Ausäthern und Einengen wurde in Äthanol aufgenommen und mit Äther gefällt. Ausb. 1.05 g.

Die *D-Glucose-L-Asparaginsäure* fiel amorph an. Es gelang nicht, die auch in Methanol nicht mehr lösliche Verbindung zur Kristallisation zu bringen.  $[\alpha]_D^{20}$ : +66° (keine Mutarotation).

$C_{10}H_{17}NO_9$  (295.2) Ber. C 40.68 H 5.80 N 4.75 Gef. C 40.73 H 6.13 N 4.61

Glucose-L-Asparaginsäure bildet mit Phenylhydrazin ein papierchromatographisch nachweisbares Phenylhydrazon, welches allerdings auf Zusatz von Äthanol nicht auskristallisierte. Auch mit *p*-Nitro-phenylhydrazin bildet sich in methanol. Lösung ein nicht kristallisiert erhaltenes *p*-Nitro-phenylhydrazon.

Aus den Fraktionen 123–131 (Mischfraktionen von D-Mannose-L-Asparaginsäure und D-Fructose-L-Asparaginsäure) ließen sich durch eine zweite Austauschertrennung auf Dowex-50 noch reine D-Mannose-L-Asparaginsäure und reine D-Fructose-L-Asparaginsäure gewinnen.

Die Mannose-Asparaginsäure-Fraktionen wurden zusammen mit der Mannose-L-Asparaginsäure-Hauptfraktion (104–122) nochmals über einen Austauscher (Dowex-50) mit 0.1 *n* TCE gereinigt. Die dabei erhaltenen chromatographisch reinen Mannose-L-Asparaginsäure-Fraktionen wurden in der gleichen Weise, wie bei der Glucose-Verbindung beschrieben, aufgearbeitet. Ausb. 273 mg amorphes Produkt.  $[\alpha]_D^{20}$ : –16° (keine Mutarotation).

$C_{10}H_{17}NO_9$  (295.2) Ber. C 40.68 H 5.80 N 4.75 Gef. C 40.66 H 6.34 N 4.46

*D-Mannose-L-Asparaginsäure* bildet mit Phenylhydrazin ein nicht kristallisierbares Phenylhydrazon.

Auf die gleiche Weise wie bei der Mannose-L-Asparaginsäure wurden die Fructose-L-Asparaginsäure-Hauptfraktionen 124–145, vereinigt mit den reinen Fructose-L-Asparaginsäure-Fraktionen der zweiten Austauschertrennung der Mischfraktionen 123–131, nochmals über eine Dowex-50-Säule gereinigt (197 mg).  $[\alpha]_D^{20}$ : –59° (keine Mutarotation).

Die Verbindung ist mit authent. Material aus D-Glucose und L-Asparaginsäure identisch.  $[\alpha]_D^{20}$ : –60.7°, Zers.-P. 154°.

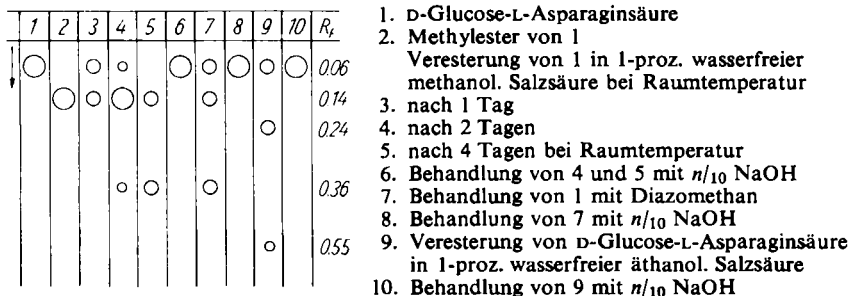
*Esterbildung aus Glucose-L-Asparaginsäure*: D-Glucose-L-Asparaginsäure hat in Butanol/Eisessig den  $R_F$ -Wert ca. 0.06. Läßt man den nach dem Ausäthern der Trichloressigsäurelösung und Einengen der Extrakte erhaltenen Rohsirup, in Methanol gelöst, einige Tage stehen, so läßt sich papierchromatographisch bald eine weitere Verbindung nachweisen, die den  $R_F$ -Wert ca. 0.16 in Butanol/Eisessig hat (s. Abbild. 3). Diese Substanz ist von ammo-

niakalischer Silbernitratlösung anfärbbar wie D-Glucose-L-Asparaginsäure. Mit Chlor/*o*-Tolidin<sup>13)</sup> gibt sie genau wie D-Glucose-L-Asparaginsäure den für NH-Gruppierungen charakteristischen blauen Farbstoff.

Zur Isolierung dieser Verbindung wurde eine Abtrennung von noch vorhandener D-Glucose-L-Asparaginsäure durch Säulenchromatographie an einer Cellulosesäule vorgenommen. Das so gewonnene amorphe Produkt war papierchromatographisch einheitlich, ließ sich mit 0.1 *n* NaOH in der Kälte sofort und vollständig in D-Glucose-L-Asparaginsäure zurückverwandeln und zerfiel bei der Spaltung mit warmer 2 *n* Essigsäure in D-Fructose und L-Asparaginsäure. Die neue Verbindung mußte also der D-Glucose-L-Asparaginsäure sehr nahe verwandt sein. Da sie beim Titrieren gegen Methylrot kein Alkali verbrauchte, während D-Glucose-L-Asparaginsäure genau 1 Äquiv. Alkali aufnahm, entsprechend einer „freien“ Carboxylgruppe (D-Glucose-Glycin verbraucht kein Alkali), mußte diese in der neuen Verbindung irgendwie maskiert sein. Es konnte sowohl ein Methylester als auch ein Lacton in Frage kommen. Die Elementaranalyse der amorphen, wohl nicht ganz reinen Substanz ließ keine eindeutige Entscheidung zu.

D-Glucose-L-Asparaginsäure geht bei Raumtemperatur in methanolischer Lösung, die 1 % HCl enthält, innerhalb kurzer Zeit in die unbekannte Verbindung über, und zwar um so schneller, je weniger Wasser der Methylalkohol enthält. Läßt man länger stehen, so bildet sich eine weitere, im Chromatogramm noch schneller als die erste wandernde Substanz (s. Abbild. 3).

Abbild. 3. Papierchromatographische Versuche mit Glucose-L-Asparaginsäure



Beide gehen mit 0.1 *n* NaOH spontan wieder in D-Glucose-L-Asparaginsäure über. Es zeigte sich weiter, daß beide Stoffe ebenfalls aus D-Glucose-L-Asparaginsäure in methanolischer Lösung auf Zusatz von Diazomethan entstehen (s. Abbild. 3). Es dürfte sich somit um die beiden Methylester handeln, den D-Glucose-L-Asparaginsäure-monomethylester mit  $R_F$  0.14 in Butanol/Eisessig und den D-Glucose-L-Asparaginsäure-dimethylester mit  $R_F$  0.36. Die leichte Verseifbarkeit der Ester ist verständlich, da auch Asparaginsäure-mono- und -dimethylester leicht verseift werden. In äthanolischer, 1 % HCl enthaltender Lösung entstehen bei Raumtemperatur ganz analog Äthylester (s. Abbild. 3).

Bei Untersuchungen mit D-Mannose-L-Asparaginsäure und D-Fructose-L-Asparaginsäure ergab sich, daß diese ebenfalls Mono- und Dimethylester bilden. Ganz analoge Verhältnisse wurden bei den Hexose-L-Glutaminsäuren vorgefunden.

*D-Glucose-L-Glutaminsäure und D-Mannose-L-Glutaminsäure aus D-Fructose und L-Glutaminsäure:* 10 g L-Glutaminsäure und 100 g trockene D-Fructose wurden in 600 ccm wasserfreiem Methanol, in dem 1.4 g Natrium gelöst worden waren, 2 Stdn. zu gelindem Sieden erhitzt. Die braune Lösung filtrierte man von etwas ungelöst gebliebener Glutaminsäure

ab, engte darauf ein, nahm mit Wasser auf und gab auf eine saure Ionenaustauschersäule (Lewatit S 100,  $H^{\oplus}$ -Form,  $32 \times 500$  mm). Nach dem Auswaschen mit Wasser wurde mit  $0.1n$  TCE eluiert. Die Fraktionen 1–260 reagierten mit Silbernitrat positiv. Sie wurden vereinigt, ausgeäthert, die Extrakte eingeengt, mit Aktivkohle behandelt, eingeengt, in wenig Methanol aufgenommen und mit absol. Äther gefällt. Ausb. 12.3 g Rohprodukt.

Glucose-L-Glutaminsäure erhielt man durch Chromatographie an einem feinkörnigen sauren Ionenaustauscher (Dowex 50,  $H^{\oplus}$ -Form, 200–400 mesh). Sie befand sich in den ersten silbernitratpositiven Fraktionen und wurde papierchromatographisch identifiziert. Danach erschien die Mannose-L-Glutaminsäure die im Papierchromatogramm etwas schneller läuft als Glucose-L-Glutaminsäure, schließlich die Fructose-L-Glutaminsäure mit etwas niedrigerem  $R_F$ -Wert als Glucose-L-Glutaminsäure. Durch wiederholte Austauscherchromatographie läßt sich jede Hexose-L-Glutaminsäure rein erhalten. Die Trennung verläuft im Prinzip genau so wie bei den Hexose-L-Asparaginsäuren beschrieben (vgl. vorstehend).

*D-Glucose-L-Glutaminsäure*, Ausb. 2.3 g; Schmp. ca.  $120^{\circ}$  (Zers.);  $[\alpha]_D^{20}$ :  $+48^{\circ}$  (keine Mutarotation).

$C_{11}H_{19}NO_9$  (309.3) Ber. C 42.71 H 6.19 N 4.53 Gef. C 41.86 H 6.43 N 4.27

*D-Mannose-L-Glutaminsäure*, Ausb. 1.1 g; Schmp. ca.  $120^{\circ}$  (Zers.);  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-10^{\circ}$  (keine Mutarotation).

$C_{11}H_{19}NO_9$  (309.3) Ber. C 42.71 H 6.19 N 4.53 Gef. C 43.35 H 6.62 N 4.16

*Glucose-L-Serin*: 1 g *L-Serin* und 10 g *D-Fructose* wurden in 200 ccm Eisessig unter Rühren auf  $70^{\circ}$  erhitzt. Die Lösung war nach 15 Min. klar. Nach 2 Stdn. wurde der Eisessig abdestilliert, der Rückstand mit Wasser aufgenommen und auf Dowex 50,  $H^{\oplus}$ -Form, 200–400 mesh, gegeben. Eluiert wurde mit  $0.2n$  TCE und Fraktionen von je 8 ccm aufgefangen. Die Fraktionen 31 bis 38 enthielten im wesentlichen *D-Glucose-L-Serin*. Man erhielt daraus nach dem üblichen Einengen und Ausfällen 255 mg amorphes Rohprodukt, welches nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte. Es wurde über eine kleine Austauschersäule gereinigt. Ausb. 170 mg; Schmp. ca.  $115^{\circ}$  (Zers.).

$C_9H_{17}NO_3$  (267.2) Ber. C 40.45 H 6.41 N 5.24 Gef. C 40.71 H 6.73 N 5.01

*Phenylhydrazon*:  $R_F$ -Wert 0.35 (nicht kristallisiert).

Alle Zersetzungspunkte wurden im Schmelzpunktsröhrchen bestimmt. Sie sind naturgemäß ein wenig von der Geschwindigkeit des Aufheizens abhängig, was daher nicht zu langsam vorgenommen werden soll. Scharfe Schmelzpunkte werden bei den dargestellten Verbindungen nicht beobachtet.

Die papierchromatographischen Untersuchungen wurden sämtlich absteigend auf Schleicher & Schüll-Papier 602 h:p unter Verwendung von *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (70:7:23) durchgeführt. Die angeführten  $R_F$ -Werte wurden auf diese Weise bestimmt.