

KURT HEYNS und MANFRED ROLLE

Die Umsetzung von D-Fructose mit Gelatine

Aus dem Chemischen Staatsinstitut der Universität Hamburg,
Abteilung für Organische Chemie
(Eingegangen am 31. März 1959)

Bei der Umsetzung von D-Fructose mit Gelatine in Dimethylsulfoxyd reagieren 50–60% der freien ϵ -Aminogruppen der Lysinbausteine. Der Zucker wird dabei in der Art der Aldose-Aminosäuren (2-N-Aminosäure-2-desoxy-aldosen) an das Protein gebunden. In Eisessig reagieren nur 15% der Lysinbausteine.

Nachdem aus D-Fructose und Peptiden die entsprechenden N-substituierten Derivate des D-Glucosamins leicht erhältlich sind¹⁾, haben wir die Umsetzung von Gelatine mit D-Fructose näher untersucht.

Die Umsetzung von D-Glucose und D-Glucose-1-phosphat mit Gelatine und Pferdeserum-Albumin wurde bereits von F. MICHEEL und A. KLEMER²⁾ untersucht. Hierbei wurden die Proteine in wäßriger Lösung mit und ohne Zusatz von Natriumhydrogencarbonat mit dem Zucker umgesetzt, und es wurde analytisch festgestellt, daß die Umsetzungsprodukte 1–2% Kohlenhydrat enthielten. Die Bestimmung des Kohlenhydratgehalts erfolgte nach der Methode von M. SÖRENSEN und G. HAUGAARD³⁾ mit Orcin/Schwefelsäure, und es wurde angenommen, daß das erfaßte Kohlenhydrat N-glykosidisch mit dem Protein verknüpft sei. Vorwiegend sollen dabei die ϵ -Aminogruppen der Lysinbausteine mit dem Zucker reagiert haben.

Durch Umsetzung von D-Fructose mit Gelatine haben wir 6 Reaktionsprodukte erhalten: drei in Dimethylsulfoxyd (DSO) (A₁, A₂, A₃), zwei in Eisessig (B₁, B₂) und eines in Wasser (C₁). Die Produkte A₁, B₁ und C₁ wurden in analoger Weise gewonnen, während bei der Gewinnung der Produkte A₂, A₃ und B₂ unter anderen Bedingungen gearbeitet wurde. Die Umsetzungen erfolgten bei 37°, um einen Abbau der Proteinmoleküle hintan zu halten. Es war zu erwarten, daß die für die Reaktion hauptsächlich in Frage kommenden ϵ -Aminogruppen der Lysinbausteine, die etwa 92% der freien Aminogruppen der Gelatine darstellen^{4,5)}, bereits unter diesen milden Bedingungen reagieren⁶⁾.

Nach mehrtägiger Einwirkung der Fructose, Abdestillieren des Lösungsmittels, Fällung mit Äthanol, Dialyse gegen Wasser, Einengen und nochmaligem Fällen mit Äthanol wurden nahezu farblose Produkte erhalten, die im Falle der Umsetzungsprodukte in DSO und Eisessig in pulveriger Form, im Falle des Umsetzungsproduktes in Wasser in zusammengeballter Form anfielen. Die ersteren Produkte hatten die Fähigkeit, mit Wasser zu gelieren, nahezu eingebüßt.

1) K. HEYNS und M. ROLLE, Chem. Ber. 92, 2439 [1959], vorstehend.

2) Chem. Ber. 89, 1238 [1956]; 85, 1083 [1952].

3) Biochem. Z. 260, 247 [1933].

4) K. HEYNS und G. WOLFF, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 304, 200 [1956].

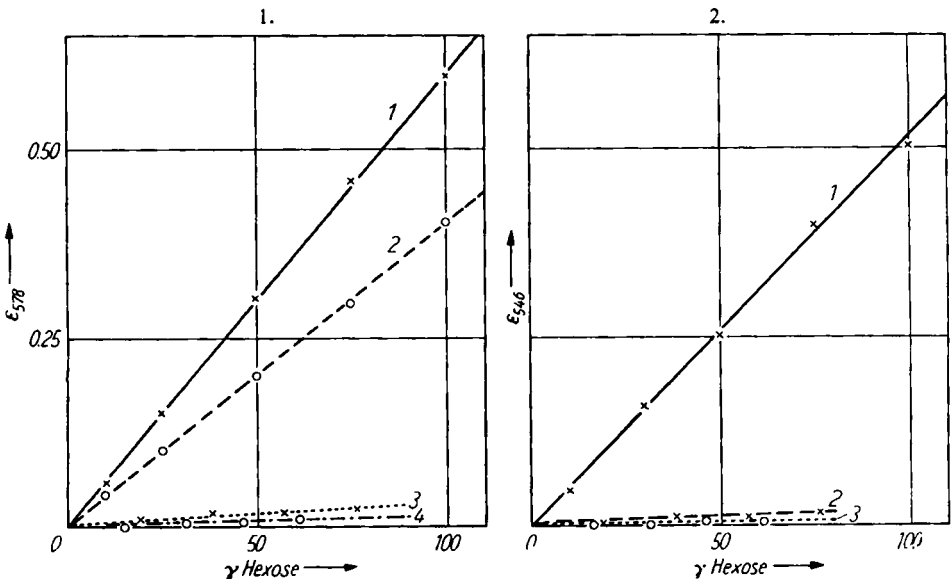
5) K. HEYNS und G. LEGLER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 306, 165 [1957].

6) K. HEYNS, H. BREUER und H. PAULSEN, Chem. Ber. 90, 1374 [1957]; K. HEYNS und H. BREUER, Chem. Ber. 91, 2750 [1958].

Durch Bestimmung des Ketosegehalts mit Anthron/Schwefelsäure (bei 15°)^{7,8)} konnte festgestellt werden, daß die Produkte weniger als 0.1% freie D-Fructose adsorbiert enthielten.

Zur Bestimmung des gebundenen Zuckers wurden vier Methoden angewendet.

Der sogenannten Anthron- sowie der Carbazol-Methode^{9,10)} liegt das Prinzip zugrunde, daß die als Lösungsmittel dienende konz. Schwefelsäure mit den Zuckern zunächst Furfurol ergibt, die dann mit den Reagenzien einen blauen bzw. roten Farbstoff liefern, der photometrisch ausgemessen werden kann. Nach beiden Methoden werden sowohl freie Hexosen als auch N- und O-glykosidisch an das Protein gebundene sowie glykosidisch miteinander verknüpfte Saccharide erfaßt, da die glykosidischen Bindungen durch die starke Säure gespalten werden. Nicht erfaßt werden bei diesen Methoden Zucker, bei denen es mit konz. Schwefelsäure nicht zur Bildung von Furfurolen kommt, wie z. B. bei Aminozuckern und Derivaten. So geben D-Fructose-Aminosäuren¹¹⁾ und, wie wir bei D-Glucose-Glycin und D-Glucose- ϵ -Aminocaprinsäure feststellten (s. Abbild. 1 und 2), auch D-Glucose-Aminosäuren bei dieser Methode praktisch keinen Farbstoff. Ein derartiges Verhalten kann auch für das an den ϵ -Aminogruppen gebundene Kohlenhydrat in den Umsetzungsprodukten von D-Fructose mit Gelatine angewonnen werden.



Abbild. 1. Zuckerbestimmung nach der Anthron-Methode, Eichkurven für D-Glucose bei 80° (1), D-Fructose bei 15° (2), D-Glucose-Glycin bei 80° (3) und D-Glucose- ϵ -Aminocaprinsäure bei 80° (4)

Abbild. 2. Zuckerbestimmung nach der Carbazol-Methode, Eichkurven für D-Glucose (1), D-Glucose-Glycin (2) und D-Glucose- ϵ -Aminocaprinsäure (3)

7) S. L. BONTING und S. BONTING, Arch. Biochem. Biophysics **52**, 272 [1954].

8) M. A. JERMYN, Nature [London] **177**, 38 [1956].

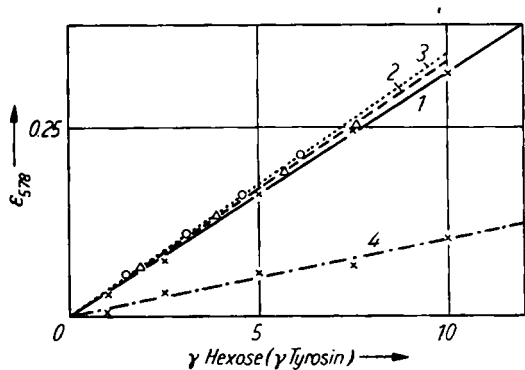
9) J. A. MOSS, Biochem. J. **61**, 151 [1955].

10) F. B. SEIBERT, J. biol. Chemistry **133**, 593 [1940].

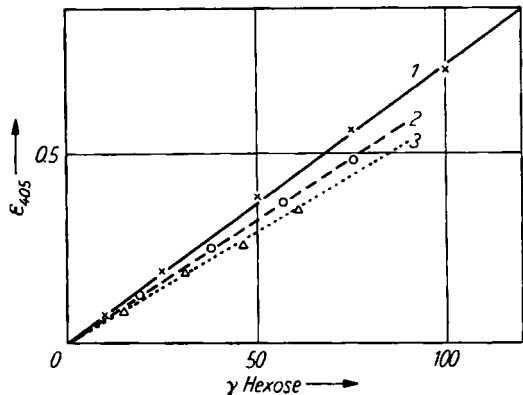
11) A. ABRAMS, H. BORSOOK und P. H. LOWY, J. biol. Chemistry **215**, 111 [1955].

H. BORSOOK und Mitarbb.¹¹⁾ hatten festgestellt, daß man den Zuckeranteil von D-Fructose-Aminosäuren mit Kaliumhexacyanoferrat(III)-Reagenz in carbonatalkalischer Lösung in der Wärme vollständig erfassen kann. Diese Methode beruht auf der durch den Zucker bewirkten Reduktion von Kaliumhexacyanoferrat(III) zu Kaliumhexacyanoferrat(II), welches mit Eisen(III)-Salzlösung Berlinerblaufärbung ergibt, die man photometrisch ausmessen kann¹²⁾. Wir konnten Entsprechendes für die D-Glucose-Aminosäuren feststellen (s. Abbild. 3). Nach dieser Methode kann also in den Umsetzungsprodukten sämtliches in der Art der Hexose-Aminosäuren gebundenes Kohlenhydrat erfaßt werden. Allerdings reagieren auch Tyrosin und Mercaptoverbindungen¹¹⁾. Tyrosin ist in Knochengelatine zu etwa 0.23% vorhanden¹³⁾. Dieser geringe Anteil fällt noch nicht störend ins Gewicht, sondern liegt im Bereich der Meßgenauigkeit, wie sich unter Berücksichtigung einer Eichkurve für Tyrosin ergab (s. Abbild. 3).

Abbild. 3. Zuckerbestimmung nach der $K_3[Fe(CN)_6]$ -Methode, Eichkurven für D-Glucose (1), D-Glucose-Glycin (2), D-Glucose- ϵ -Aminocapronsäure (3) und L-Tyrosin (4)



Abbild. 4. Zuckerbestimmung nach der Osazon-Methode (nach Einwirkung von n HCl), Eichkurven für D-Glucose (1), D-Glucose-Glycin (2) und D-Glucose- ϵ -Aminocapronsäure (3)



Auch mit der von W. GRASSMANN¹⁴⁾ eingeführten Osazon-Methode können (nach vorheriger Behandlung mit $1 n$ HCl) die D-Glucose-Aminosäuren weitgehend erfaßt

¹²⁾ J. T. PARK und M. J. JOHNSON, J. biol. Chemistry **181**, 149 [1949].

¹³⁾ J. E. EASTOE, Biochem. J. **61**, 589 [1955].

¹⁴⁾ W. GRASSMANN, H. HÖRMANN und R. HAFTER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **307**, 87 [1957].

werden. Die entsprechenden Eichkurven sind in Abbild. 4 verzeichnet. Es wird die durch Umsetzung mit Phenylhydrazin erzeugte Gelbfärbung (Osazonbildung) photometrisch ausgemessen.

In Tab. 1 sind die Ergebnisse der vier Zuckerbestimmungsmethoden für die sechs Umsetzungsprodukte und für Gelatine zusammengefaßt. Die Werte sind mit Abweichungen von etwa 5% reproduzierbar.

Tab. 1. Ergebnisse der vier Zuckerbestimmungsmethoden.
Hexose-Gehalt in Gew.-%, berechnet als D-Glucose (Standard), bezogen auf absolute Produkte

Produkt- Bez.	Lösungsmittel bei der Umsetzung	K ₃ [Fe(CN) ₆]- Methode	Osazon- Methode	Anthron- Methode (80°)	Carbazol- Methode
A ₁	DSO	3.8	3.5	0.47	0.41
A ₂	DSO	4.5	3.9	0.97	0.92
A ₃	DSO	5.0	5.0	2.2	2.0
B ₁	Eisessig	1.9	2.3	1.0	0.90
B ₂	Eisessig	2.0	2.2	1.3	1.2
C ₁	Wasser	0.30	0.63	0.47	0.43
Gelatine	—	0.20	0.44	0.41	0.39

Die nach der Kaliumhexacyanoferrat(III)-Methode und der Osazon-Methode erhaltenen Werte lagen im Falle der Umsetzungsprodukte in DSO und Eisessig sehr deutlich höher als die nach der Anthron- und Carbazol-Methode erhaltenen; es sind also zweifellos Zuckerreste an Gelatine gebunden. Beim Umsetzungsprodukt in Wasser läßt sich keine Differenz erkennen; in Wasser läßt sich Gelatine unter den angegebenen Bedingungen also nicht zu Glucose-Aminosäure enthaltenden Verbindungen umsetzen. Die nach der Anthron- und Carbazol-Methode bestimmten Zuckerwerte liegen zum Teil höher als der Nullwert für Gelatine. Es ist möglich, daß dieser Zuckeranteil *N*- oder *O*-glykosidisch an das Protein gebunden vorliegt. Es könnte sich jedoch auch Polysaccharid gebildet haben¹⁵⁾. Der besonders hohe Wert beim Produkt A₃ dürfte seine Ursache im dreistündigen Erhitzen in DSO-Lösung auf 65–70° beim Abdestillieren des DSO im Wasserstrahlvakuum haben. Die Werte für das Umsetzungsprodukt in Wasser (C₁) liegen praktisch nicht höher als der Gelatinewert nach der Anthron- und Carbazol-Methode.

Da angenommen wird, daß die Hauptmenge des Zuckers an den ϵ -Aminogruppen der Lysin- (und Hydroxylysin)-Bausteine gebunden ist, haben wir zur unabhängigen Kontrolle eine Restbestimmung der noch freien ϵ -Aminogruppen nach der DNP-Methode vorgenommen^{5,16)}. Die Aminogruppen der amino-endständigen Aminosäurebausteine (etwa 7% der gesamten freien Aminogruppen^{4,5)}) reagieren mit D-Fructose unter den angewandten milden Temperaturbedingungen in geringerem Ausmaß, da α -Aminogruppen sich erst bei stärkerem Erwärmen mit D-Fructose umsetzen⁶⁾.

Nach Umsetzung unserer kohlenhydrathaltigen Gelatine mit 2.4-Dinitro-fluorbenzol (DNFB), Entfernung von überschüssigem DNFB mit Äther, Hydrolyse mit 5.7 *n* HCl.

¹⁵⁾ F. MICHEEL und W. GRESSER, Chem. Ber. 91, 1214 [1958].

¹⁶⁾ K. HEYNS und W. KÖNIGSDORF, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 295, 244 [1953].

Extraktion der von den amino-endständigen Aminosäuren herrührenden DNP-Aminosäuren mit Äther blieb in der wäßrigen Phase *N^ε*-DNP-Lysin- (und wenig *N^ε*-DNP-Hydroxylysin-) hydrochlorid zurück, dessen Extinktion bei 358 m μ in 1-proz. NaHCO₃-Lösung bestimmt wurde. In einem Kontrollversuch mit D-Glucose- ϵ -Aminocaprönsäure wurde festgestellt, daß diese nicht mit DNFB reagiert.

In Tab. 2 sind die Ergebnisse der DNP-Methode (Spalten 5–7) mit denen aus den Zuckerbestimmungsmethoden (Spalten 3 und 4) für die Umsetzungsprodukte und für Gelatine verglichen. In Spalte 3 sind die als Aldose-Aminosäuren gebundenen Hexosemengen (berechnet als D-Glucose) in mMol/100 g Produkt absol. verzeichnet. Sie ergeben sich aus den Differenzen der nach der Kaliumhexacyanoferrat(III)- und Anthron-Methode erhaltenen Zuckerwerte. In Spalte 4 ist der dadurch blockierte Anteil der ϵ -Aminogruppen in % angegeben, wie er sich aus den Werten der Spalte 3 und unter Berücksichtigung der freien ϵ -Aminogruppen der Gelatine (36 mMol/100 g) ergibt. In Spalte 5 sind die noch freien ϵ -Aminogruppen und in Spalte 6 die blockierten ϵ -Aminogruppen in mMol/100g angegeben (nach den Ergebnissen der DNP-Methode). Spalte 7 zeigt den Anteil der blockierten ϵ -Aminogruppen in % der ursprünglich freien ϵ -Aminogruppen, hier im Gegensatz zur Spalte 4 auf Grund der Ergebnisse der DNP-Methode (Spalte 6) berechnet. — Die Spalten 3 und 4 sagen also etwas über die tatsächlich durch Zucker blockierten ϵ -Aminogruppen aus, während bei den Werten der Spalten 6 und 7 auch anderweitige Blockierungen mit erfaßt sind. In der Größenordnung besteht Übereinstimmung zwischen den Werten der Spalten 3/4 und 6/7. Die letzteren liegen ein wenig höher als die ersteren.

Tab. 2. Vergleichende Übersicht über die Aussagen der Ergebnisse der Zuckerbestimmungsmethoden, der DNP-Methode und der chromatographischen Befunde

Produkt- Bez.	Lösungs- mittel bei der Umsetzung	mMol Hexose ^{b)} /100 g Produkt absolut	Umgesetzte ϵ -Amino- gruppen in % ^{c)}	Freie ϵ -Amino- gruppen ^{e)} in mMol /100 g Produkt absolut	Umgesetzte ϵ -Amino- gruppen ^{e)} in mMol /100 g Produkt absolut	in %	Chromatogr. Nachweis von Hexose- <i>N^ε</i> -Lysin ^{d)}
1	2	3	4	5	6	7	8
A ₁	DSO ^{a)}	19	53	12	24	66	+++
A ₂	DSO ^{a)}	19	53	16	20	55	nicht unters.
A ₃	DSO ^{a)}	17	47	15	21	58	nicht unters.
B ₁	Eisessig	5.5	15	26	10	28	+
B ₂	Eisessig	4.5	12.5	27	9	25	nicht unters.
C ₁	Wasser	0	0	34	2	5	—
Gelatine	—	0	0	36	0	0	—

a) DSO = Dimethylsulfoxyd

b) Hexose, gebunden wie in den Aldose-Aminosäuren, berechnet als D-Glucose

c) berechnet aus dem gebundenen Zucker (Spalte 3)

d) nach Hydrolyse mit 2*N* HCl

e) der Lysin- und Hydroxylysin-Bausteine

Zusammenfassend läßt sich aus der Tabelle entnehmen, daß die mittels der Zuckerbestimmungen ermittelte, an Gelatine gebundene Kohlenhydratmenge mit dem mittels der DNP-Methode festgestellten Ausmaß der Blockierung der ϵ -Aminogruppen des Lysins übereinstimmt, wodurch erwiesen ist, daß die Kohlenhydratkomponente tatsächlich an den ϵ -Aminogruppen des Lysins gebunden ist.

Nach Hydrolyse mit 2 *n* HCl konnte in den Produkten A₁ und B₁ D-Glucose-*N*⁶-Lysin¹⁷⁾ papierchromatographisch nachgewiesen werden, im Produkt A₁ etwa dreimal so viel wie im Produkt B₁. Ferner war in den Hydrolysaten der Produkte A₁ und B₁ eine deutliche Abnahme der Intensität des Lysinfleckes zu bemerken, bei A₁ eine wesentlich stärkere als bei B₁.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Gewinnung der Umsetzungsprodukte von D-Fructose mit Gelatine

Produkt A₁: 5 g Knochen-Gelatine (lufttrocken) ließ man im Brutschrank (37–38°) in 200ccm Dimethylsulfoxyd (DSO) vorquellen und führte schließlich durch Umschütteln Lösung herbei. Sodann wurden 25 g *D-Fructose* zugesetzt und durch Umschütteln gelöst. Nach 72 Stdn. Reaktionsdauer im Brutschrank wurde das DSO bei 50° Badtemperatur i. Ölpumpenvak. soweit abdestilliert, daß ein dünnflüssiger Sirup zurückblieb (Dauer 2 Stdn.). Dieser wurde dann in ca. 800ccm Äthanol eingegossen, und das ausgefallene Gelatine-Produkt abgesaugt. Das Produkt wurde bei 38° in Wasser gelöst und 12 Tage im rotierenden Cellophan-schlauch gegen Wasser dialysiert. Die Außenlösung zeigte dann mit Fehlingscher Lösung keine positive Reaktion mehr. Das Dialysat engte man i. Vak. unter Zusatz einiger Tropfen Decanol (zur Verhütung des Schäumens) stark ein, goß die konzentrierte Lösung nochmals in Äthanol, saugte das ausgefallene pulverige Produkt ab und trocknete. Es zeigte kaum noch die Eigenschaft des Gelierens mit Wasser.

Produkt B₁: 4 g Gelatine löste man nach Vorquellung bei Brutschranktemperatur (37–38°) in 300ccm Eisessig, setzte 12 g *D-Fructose* zu und brachte ebenfalls durch Umschütteln in Lösung. Nach 72 Stdn. Reaktionsdauer bei Brutschranktemperatur wurde der Eisessig i. Vak. unterhalb von 30° soweit abdestilliert, daß ein Sirup zurückblieb, den man in einen großen Äthanolüberschuß eingießen konnte. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie bei Produkt A₁. Das Produkt fiel als Pulver an und zeigte kaum noch die Eigenschaft des Gelierens mit Wasser.

Produkt C₁: 6 g Gelatine löste man nach Vorquellung bei Brutschranktemperatur (37–38°) in 400ccm Wasser, gab sodann 30 g *D-Fructose* zu und brachte in Lösung. Reaktionsdauer 72 Stdn. bei Brutschranktemperatur. Das durch weitere Aufarbeitung wie bei Produkt B₁ erhaltene Produkt fiel beim Eingießen in Äthanol in „faseriger“ Form an und zeigte wie Gelatine die Eigenschaft des Gelierens mit Wasser.

Produkt A₂: Aus 2.5 g Gelatine und 12 g *D-Fructose* durch Lösen in 80ccm DSO bei 40°, 48stdg. Reaktion bei 40°, Einengen bei 55° Badtemperatur (Ölpumpenvakuum; Dauer 90 Min.), Fällung mit Äthanol, Auflösen in Wasser, 8 Tage Dialyse gegen Wasser, Einengen i. Vak., Füllen mit Äthanol und Trocknen. Es wurde ein pulveriges Produkt erhalten.

Produkt A₃: Aus 3 g Gelatine und 15 g *D-Fructose* durch Lösen in 100ccm DSO bei 40°, 3 tägige Reaktion bei 40°, Abdestillieren des DSO im Wasserstrahlvakuum bei 65–70° Badtemperatur (3 Stdn.), Aufnehmen in Wasser, Dialyse gegen Wasser (14 Tage), Einengen i. Vak., Füllen mit Äthanol und Trocknen. Es wurde ein pulveriges Produkt erhalten.

¹⁷⁾ K. HEYNS und H. NOACK, unveröffentlicht.

Produkt B₂: Aus 4 g *Gelatine* und 14 g *D-Fructose* durch Lösen in 350 ccm Eisessig bei 38°, 48 stdg. Reaktion bei 38°, Einengen i. Vak. unterhalb von 30°, Verdünnen mit Wasser, Dialyse gegen Wasser (14 Tage), Einengen i. Vak., Füllen mit Äthanol und Trocknen. Es wurde ein pulvriges Produkt erhalten.

Von den erhaltenen Produkten und von *Gelatine*, die sich im lufttrockenen Zustand befanden, wurden Wassergehaltsbestimmungen durchgeführt. Bei den Einwaagen wurden die dem Wassergehalt entsprechenden Gewichtsmengen in Abzug gebracht.

Die Produkte erhitzte man in Wägegläschen bis zur Gewichtskonstanz auf 105°. Dabei ergaben sich folgende Wassergehalte in Gew.-%: *Gelatine* 17.5; A₁ 10.0; A₂ 16.9; A₃ 10.0; B₁ 7.0; B₂ 10.9; C₁ 16.5.

Zuckerbestimmungen

Anthron-Methode: Als „Anthronreagenz“ wurde eine 0.15-proz. Lösung von Anthron in 87 vol.-proz. Schwefelsäure benutzt. Als Standardlösungen für die Eichkurven (Abbild. 1) kamen wäßrige Lösungen von D-Fructose, D-Glucose, D-Glucose-Glycin⁶⁾ und D-Glucose-ε-Aminocaprinsäure⁶⁾ zur Verwendung, die 10 mg Substanz/100 ccm enthielten.

Zur Bestimmung des D-Fructosegehalts der hergestellten Produkte wurde zunächst eine Eichkurve mit D-Fructose aufgestellt. Man pipettierte steigende Mengen der Standard-Fructose-Lösung (0.1–1.0 ccm) in extinktionsgleiche Reagenzgläser, fügte nach Kühlung mit Eis 6 ccm Anthronreagenz zu, füllte mit Wasser auf 8 ccm auf und mischte durch. Nun hielt man die Lösungen 1 Stde. lang in einem Bad auf 15°⁸⁾ und bestimmte anschließend die Extinktionen der blauen Lösungen im Photometer Eppendorf bei 578 m μ gegen Wasser. Beim Eintragen der Eichkurve wurde der Blindwert der Anthronlösung mit berücksichtigt. D-Glucose lieferte keine Blaufärbung bei 15°.

Von unseren Umsetzungsprodukten und von *Gelatine* wurden 0.5–2-proz. Lösungen hergestellt, die für alle Zuckerbestimmungen Verwendung fanden: Für die Fructose-Bestimmung pipettierte man davon 0.5–1 ccm in extinktionsgleiche Reagenzgläser und verfuhr im übrigen genau wie bei der Aufstellung der Eichkurve. Außer dem Blindwert der Anthronlösung wurde hier noch ein „Schwefelsäure-Leerwert“ bestimmt, der von einer gleichbehandelten Lösung des Proteins in gleichkonzentrierter Schwefelsäure (ohne Anthron) gegeben wurde. Die dann aus der Eichkurve entnommenen Fructosemengen wurden auf Gew.-% umgerechnet.

Für die Produkte A₁, A₂, B₁ und B₂ war der Fructose-Gehalt < 0.1 %. Die Produkte A₃ und C₁ enthielten praktisch keine Fructose.

Zur Bestimmung des gesamten mit der Anthron-Methode erfassbaren Zuckers nahm man zunächst die Eichkurven mit D-Glucose, D-Glucose-Glycin⁶⁾ und D-Glucose-ε-Aminocaprinsäure⁶⁾ auf. Dazu wurden steigende Mengen (0.1–1.0 ccm) der Standardlösungen in extinktionsgleiche Gläser pipettiert, nach Eiskühlung mit 6 ccm Anthronreagenz versetzt und mit Wasser auf 8 ccm aufgefüllt. Nach Durchmischung unter weiterer Eiskühlung erhitzte man die Lösungen im Wasserbad 15 Min. auf 80°⁹⁾, kühlte auf Raumtemperatur ab und bestimmte die Extinktion gegen Wasser bei 578 m μ im Photometer Eppendorf. Unter Berücksichtigung des Reagenz-Leerwertes ergaben sich die in Abbild. 1 verzeichneten Eichkurven. Die Werte für die D-Glucose-Aminosäuren wurden dabei auf den Zuckeranteil der Moleküle umgerechnet.

Zur Bestimmung des Zuckergehaltes der Proteine pipettierte man 0.25–1.0 ccm der Lösungen (s. o.) in extinktionsgleiche Gläser und verfuhr im übrigen in gleicher Weise wie bei der Aufstellung der Eichkurven. Es wurde ein Reagenz-Leerwert und Schwefelsäure-Leerwert des Proteins mit berücksichtigt. Als Berechnungsgrundlage diente die D-Glucose-Eichkurve. Die Ergebnisse der Zuckerbestimmungen nach der Anthron-Methode enthält Tab. 1.

Carbazol-Methode: Bei der Aufstellung der Eichkurven und der Bestimmung des gesamten nach der Methode erfassbaren Zuckers wurden die gleichen Lösungen in gleichen Mengen wie bei der Anthron-Methode verwendet. Die D-Fructose-Bestimmungen entfielen.

Den in extinktionsgleiche Gläser abpipettierten Lösungen setzte man 9ccm eisgekühlte 87-proz. Schwefelsäure zu und füllte anschließend mit Wasser auf 10ccm auf; dazu gab man 0.3ccm 0.5-proz. Carbazol-Lösung mit Äthanol und mischte das Ganze unter Eiskühlung gut durch¹⁰⁾. Sodann erhitze man die Lösungen 10 Min. lang auf dem siedenden Wasserbad, kühlte anschließend auf Raumtemperatur ab und bestimmte die Extinktion der rotgefärbten Lösung bei 546 m μ gegen Wasser im Photometer Eppendorf. Reagenz-Leerwert und Schwefelsäure-Leerwert des Proteins wurden mit berücksichtigt.

Die Eichkurven sind in Abbild. 2, die Ergebnisse der Zuckerbestimmungen in den Proteinen (Berechnungsstandard D-Glucose) in Tab. 1 verzeichnet.

K₃/Fe(CN)₆-Methode: Als Reagenzlösungen wurden folgende wäbr. Lösungen verwendet¹²⁾:

Lösung I: 0.5 g K₃[Fe(CN)₆]/1 l Wasser

Lösung II: 5.3 g Na₂CO₃ + 0.65 g KCN/1 l Wasser

Lösung III: 1.5 g Eisen(III)-ammoniumsulfat + 0.5 g Methylcellulose *)/1 l 0.05 n H₂SO₄

Außer den bei der Anthron-Methode angeführten Standardlösungen wurde eine Lösung von 10mg Tyrosin/100ccm Wasser zur Aufstellung einer Eichkurve verwendet. Die Verwendung von D-Fructose war nicht erforderlich.

Für die Aufstellung der Eichkurven pipettierte man steigende Mengen der Standardlösungen in extinktionsgleiche Gläser (0.01–0.1 cc), verdünnte mit 2.5ccm Wasser, fügte je 1 cc der Lösungen I und II hinzu und mischte durch. Nun erhitze man die Lösungen 15 Min. auf siedendem Wasserbad, kühlte anschließend mit Leitungswasser auf Raumtemperatur ab, setzte sofort 5ccm der Lösung III zu, füllte mit Wasser auf 10ccm auf, mischte durch und bestimmte die Extinktion der blauen Lösung bei 578 m μ gegen Wasser im Photometer Eppendorf.

Bei der Bestimmung des Zuckergehalts der Proteine wurde in gleicher Weise verfahren. Ein Reagenz-Leerwert wurde berücksichtigt. Die Eichkurven sind in Abbild. 3, und die sich aus der D-Glucose-Kurve ergebenden Zuckergehalte der Proteine in Tab. 1 verzeichnet.

Osazon-Methode: Vor den eigentlichen Zuckerbestimmungen wurden sowohl die Eichsubstanzen D-Glucose, D-Glucose-Glycin⁶⁾ und D-Glucose- α -Aminocaprinsäure⁶⁾, als auch die Proteine in 1 n HCl 4 Stdn. bei 100° im Einschlußröhrchen hydrolysiert.

Steigende Menge der Standardlösungen (0.1–1 cc) und die Proteinlösungen (0.25–1 cc) wurden mit dem gleichen Volumen 2 n HCl versetzt und entsprechend behandelt.

Die Lösungen wurden dann in extinktionsgleiche Gläser übergeführt und mit 2ccm folgender Acetatpuffer-Lösung versetzt: 25 g Natriumacetat (wasserfrei) + 25ccm Eisessig, mit ausgekochtem Wasser auf 100ccm aufgefüllt. Dazu gab man dann 1 cc folgender Phenylhydrazin-Lösung: 1 g Phenylhydrazin + 10 g NaHSO₃ in 100ccm ausgekochtem Wasser gelöst¹⁴⁾.

Die Lösung füllte man nun mit ausgekochtem Wasser auf 6ccm auf, mischte durch und erhitze 3 Stdn. auf dem siedenden Wasserbad. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur und Auffüllen auf 10ccm wurde die Extinktion der gelben Lösung bei 405 m μ gegen Wasser im Photometer Eppendorf bestimmt. Auch hier wurde ein Reagenz-Leerwert berücksichtigt.

Die Eichkurven sind in Abbild. 4, die Ergebnisse der Zuckerbestimmungen in den Proteinen (Berechnungsstandard D-Glucose) in Tab. 1 verzeichnet.

*) Dient zur Stabilisierung der entstehenden kolloidalen Berlinerblau-Lösung.

Bestimmung der freien ε-Aminogruppen nach der DNP-Methode^{4,5,16)}

30–40 mg des Proteins wurden in 50ccm Wasser unter Erwärmen auf Brutschranktemperatur in Lösung gebracht. Dann setzte man 2 g NaHCO₃ und 0.2ccm 2.4-Dinitro-fluorbenzol (DNFB) zu und rührte die Lösung 18 Stdn. bei 26–27° kräftig. Meist war die gelb gefärbte Lösung klar, manchmal hatte sich etwas DNP-Protein abgeschieden, welches natürlich mit verarbeitet werden mußte. Die Lösung wurde dann dreimal mit dem gleichen Vol. Äther extrahiert, um überschüss. DNFB weitgehend zu entfernen. Die beim Ausschütteln auftretenden gallertigen Emulsionen mußten dabei meist durch Zentrifugieren zerstört werden. Die ätherische Phase wurde sodann, da sie leicht gelb gefärbt war, noch mit wenig 2-proz. Hydrogencarbonatlösung rückextrahiert und der Rückextrakt zur übrigen wäbr. Phase gefügt. Durch Versetzen mit etwa dem gleichen Vol. konz. Salzsäure wurde diese nun auf eine Konzentration von 5.7 n gebracht. Diese Lösung wurde 8 Stdn. zum Sieden erhitzt, anschließend zur Entfernung der gebildeten DNP-Aminosäuren (von den amino-endständigen Aminosäuren her stammend) und von 2.4-Dinitro-phenol dreimal mit Äther ausgeschüttelt. Die wäbr. Phase, im wesentlichen N^ε-DNP-Lysin- und N^ε-DNP-Hydroxylysin-hydrochlorid enthaltend, wurde i. Vak. zur Trockne eingedampft, restliche Salzsäure durch Abdampfen mit Wasser i. Vak. weitgehend entfernt und schließlich mit 1-proz. NaHCO₃-Lösung auf ein bestimmtes Vol. aufgefüllt, das je nach Intensität der Färbung gewählt wurde. Eine manchmal auftretende Trübung der Lösung, wahrscheinlich vom Silikat des Glases herrührend, das durch die Fluorverbindungen angegriffen wurde, wurde abfiltriert.

Sodann wurde die Extinktion der gelben Lösung gegen Wasser im Spektralphotometer Zeiss Opton M 4 Q bei 358 m μ gemessen und die Menge der freien ε-Aminogruppen nach folgender Formel in mMol/100 g errechnet:

$$a = \frac{\epsilon_{\text{gem}} \cdot V \cdot 100}{\epsilon_{\text{spez}} \cdot g}$$

ϵ_{gem} = gemessene Extinktion gegen Wasser

ϵ_{spez} = spezif. Extinktion des N^ε-DNP-Lysins (und Hydroxylysins) in ccm/ μ Mol = 16.3

V = Volumen in ccm, auf das mit der 1-proz. NaHCO₃-Lösung vor der Messung aufgefüllt wurde

g = Einwaage in mg

Die Ergebnisse dieser Bestimmungen gibt Tab. 2.

Zur Feststellung der Reaktionsfähigkeit von D-Glucose-ε-Aminocaprinsäure mit DNFB wurden 5.3 mg der Substanz in 50ccm Wasser gelöst und 2 g NaHCO₃ sowie 0.2ccm DNFB zugefügt. Es wurde 18 Stdn. bei 26–27° gerührt, dann dreimal mit dem gleichen Vol. Äther ausgeschüttelt und mit 2-proz. NaHCO₃-Lösung rückextrahiert. Die wäbr. Lösung wurde sodann mit Salzsäure angesäuert und dreimal mit Essigester ausgeschüttelt. Eventuell vorhandene DNP-Verbindungen hätten sich nun neben gebildetem Dinitrophenol in der Essigesterphase befinden müssen. Die Essigesterlösung wurde zur Trockne eingedampft und die Hauptmenge des Dinitrophenols im Ölpumpenvakuum bei 80° sublimiert. Der Rückstand wurde in 1-proz. NaHCO₃-Lösung gelöst und auf 100ccm aufgefüllt. Das Chromatogramm dieser Lösung, in Pyridin/Isoamylalkohol/Wasser (7:7:6) entwickelt, zeigte nur die Anwesenheit von Dinitrophenol. Nach weiterer Verdünnung auf 10 l wurde die Extinktion gegen Wasser bei 358 m μ bestimmt, einmal in 1-proz. NaHCO₃-Lösung und einmal nach weiterer Verdünnung mit 2 n HCl.

ϵ_1 (in NaHCO₃) = 1.55; ϵ_2 (in HCl) = 0.21. Das Verhältnis dieser Extinktionswerte war das gleiche wie es für Dinitrophenol gefunden wurde.

Hydrolytische Spaltung; chromatographischer Nachweis von D-Glucose-N^ε-Lysin

Etwa 5-proz. Lösungen der Umsetzungsprodukte A₁, B₁ und C₁ sowie von Gelatine in 2*n* HCl wurden 8 Std. im Einschlußröhrchen auf 100° erhitzt. Die Lösungen wurden dann dreimal gleichstark auf die Startpunkte von zweifach angesetzten Chromatogrammen (Schleicher & Schüll-Papier 602 h:p) aufgetragen, die absteigend mit *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (10:3:6) entwickelt wurden¹⁸⁾. Die Anfärbung wurde einmal mit ammoniakalischem Silbernitrat und einmal mit Ninhydrin vorgenommen.

¹⁸⁾ Zum Vergleich wurde eine Lösung von D-Glucose-N^ε-Lysin, das durch direkte Umsetzung von D-Fructose mit Lysin erhalten worden war¹⁷⁾, auf Parallelchromatogramme aufgetragen.

FRIEDRICH NERDEL und WILFRIED LEHMANN

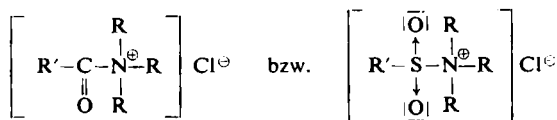
Die Konstitution des „Vorländerschen Salzes“¹⁾

Aus dem Institut für Organische Chemie der Technischen Universität Berlin

(Eingegangen am 9. März 1959)

Durch alkalische Hydrolyse und durch Synthese aus Trimethylamin, Formaldehyd und Benzolsulfochlorid wird bewiesen, daß es sich bei dem „Vorländerschen Salz“ nicht um Benzolsulfonyl-trimethylammoniumchlorid, sondern um Benzolsulfonyloxymethyl-trimethyl-ammoniumchlorid („Benzolsulfonyl-formochochlorid“) handelt.

Im Rahmen unserer Untersuchungen über Reaktionen zwischen Säurechloriden und tertiären Aminen haben wir uns auch mit deren Additionsverbindungen beschäftigt, die von mehreren Autoren²⁾ als quartäre Ammoniumsalze³⁾



formuliert werden. Diese Salze sind aber nur in Abwesenheit von Wasser beständig. Daher kann die sog. „VORLÄNDERSCHE VERBINDUNG“ die sich ebenfalls aus Benzolsulfochlorid und Trimethylamin, aber in wäßriger Lösung bildet, nicht die Ammoniumstruktur (rechte Formel) besitzen.

¹⁾ a) M. KAUFFMANN und D. VORLÄNDER, Ber. dtsh. chem. Ges. **43**, 2735, dort S. 2471 [1910]; b) D. VORLÄNDER und O. NOLTE, ebenda **46**, 3212 [1913].

²⁾ S. I. LURJE, J. allg. Chem. (russ.) **18**, 1517 [1948]; C. A. **43**, 4240 [1949]. W. v. E. DOERING und W. E. McEWEN, J. Amer. chem. Soc. **73**, 2104 [1951]; H. E. BAUMGARTEN, J. Amer. chem. Soc. **75**, 1239 [1953]; N. O. V. SONNTAG, Chem. Reviews **52**, 237, dort S. 294 [1953]; L. HORNER und H. NICKEL, Liebigs Ann. Chem. **597**, 20 [1955].

³⁾ Eine andere Ansicht vertreten W. LOOP und E. LÜHRS für ihre aus *p*-Acetaminobenzolsulfonylchlorid und Trimethylamin erhaltene Verbindung (Liebigs Ann. Chem. **580** 225, dort S. 230 [1953]).