

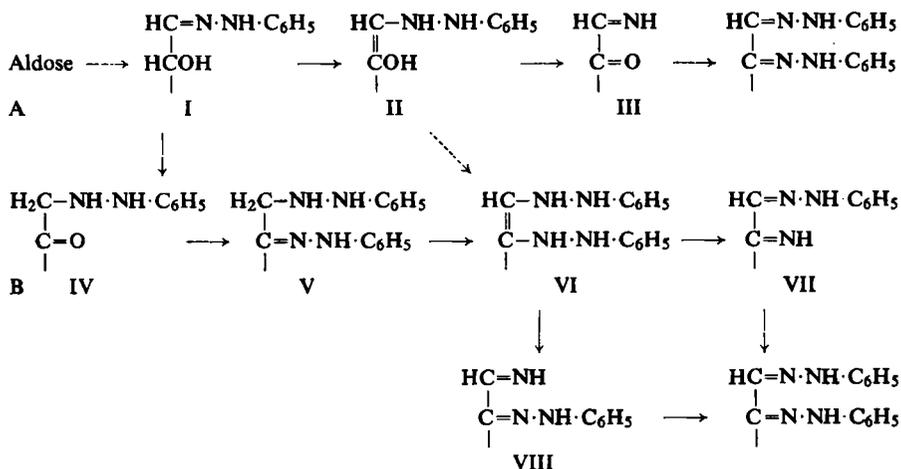
# HELMUT SIMON, KARL-DIETHER KEIL und FRIEDRICH WEYGAND

## Untersuchungen über den Mechanismus der Osazonbildung in der Zuckerreihe mit Hilfe tritiummarkierter Verbindungen, II<sup>1)</sup>

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Technischen Hochschule München  
(Eingegangen am 9. Juni 1961)

Die bei der Osazonbildung aus Glucose-[1-T] und Mannose-[1-T] auftretenden Tritiumverluste von 0–15% (in D<sub>2</sub>O von 10–30%) hängen stark von den Reaktionsbedingungen ab und verlaufen bei beiden Zuckern gleichsinnig. Es handelt sich dabei nicht um einen unspezifischen Tritiumaustausch. Bei fortschreitendem Umsatz nimmt der Reaktionsweg B von WEYGAND gegenüber einem anderen (wahrscheinlich Weg A) zu. Die anfängliche Osazonbildungsgeschwindigkeit hängt innerhalb weiter Konzentrationsverhältnisse in erster Linie nur von der Essigsäure- bzw. Acetationenkonzentration ab.

Kürzlich berichteten wir<sup>1)</sup> über Untersuchungen der Osazonbildung von Glucose und 1-Desoxy-1-*p*-toluidino-D-fructose mit Hilfe der Tritiummarkierung. Hierbei trat unter den von uns gewählten Reaktionsbedingungen bei der Osazonbildung aus Glucose-[1-T] kein Tritiumverlust auf, wenn der Isotopeneffekt nicht durch Verwendung einer Glucose-[1-D, T] erniedrigt wurde. Wir stellten dabei fest, daß teilweise der von F. WEYGAND<sup>2)</sup> für die Glucosazonbildung angegebene Weg B beschriftet wird (vgl. das folgende Schema). Für den außerdem ablaufenden Mechanismus konnte der von WEYGAND angegebene Weg A wahrscheinlich gemacht werden.



Entsprechende Untersuchungen wurden nun für die Osazonbildung aus Mannose-[1-T] durchgeführt. Da im Gegensatz zum Glucosephenylhydrazon das Mannose-

1) I. Mittell.: F. WEYGAND, H. SIMON und J. F. KLEBE, Chem. Ber. 91, 1567 [1958].

2) Ber. deutsch. chem. Ges. 73, 1284 [1940].

phenylhydrazon schwer löslich ist, wurde die Mannosazonbildung in einer solchen Verdünnung vorgenommen, daß intermediär kein Mannosephenylhydrazon ausfiel.

Überraschenderweise trat dabei ein Tritiumverlust von 6% im Osazon auf (Tab. 3, Vers. 14). Es erhob sich nun die Frage, ob dieser Befund auf einen Unterschied zwischen Mannose und Glucose zurückzuführen ist, oder wie weit die geänderten Konzentrationsverhältnisse dafür verantwortlich sind. Es wurden daher eine Reihe von kinetischen Versuchen zur Osazonbildung mit Glucose-[1-T] und Mannose-[1-T] bzw. mit nichtmarkierter Glucose und Mannose in tritiumhaltigem Wasser unter verschiedenen Bedingungen ausgeführt. Die verschiedenen angewandten Reaktionsbedingungen zeigt Tab. 1.

Tab. 1. Übersicht über die fünf verschiedenen Konzentrationsbedingungen

Reaktionsbedingung	a*)	b	c	d	e
mMol Glucose bzw. Mannose	10.6	1	1	1	1
mMol Phenylhydrazin-hydrochlorid	35	3.3	33	3.3	3.3
mMol Natriumacetat wasserfrei	57	5.3	53	53	53
ccm Lösungsmittel (H <sub>2</sub> O, D <sub>2</sub> O, bei a auch Glykol-monomethyläther und Eisessig)	35	35	35	35	35
mMol Eisessig	—	—	—	50	116
pH-Wert bei 20°. Lösungsmittel Wasser	5.1	5.1	—	4.6	4.2

\*) Ein Teil der Versuche wurde in Glykol-monomethyläther und Eisessig durchgeführt (s. Versuchsteil).

Die Reaktionsbedingungen a in H<sub>2</sub>O bzw. D<sub>2</sub>O wurden für Glucose-[1-T] bei den in der I. Mitteil. beschriebenen Versuchen verwendet. Unter den Bedingungen b ist die Konzentration sämtlicher Reaktionspartner etwa 1/10 von a. Bei c ist die Konzentration des Phenylhydrazin-hydrochlorids und des Natriumacetats gegenüber b auf das 10-fache erhöht und damit wie bei a. Die Zuckerkonzentration ist dagegen wie bei b und somit 1/10 der von a. Die Bedingungen d sind so gewählt, daß die Konzentration des Zuckers und des Phenylhydrazin-hydrochlorids 1/10 der von a ist, jedoch die Natriumacetatkonzentration gleich der von a ist. Es wurde die notwendige Menge Essigsäure zugegeben, um den pH-Wert auf 4.6 zu bringen. Unter Reaktionsbedingung e wurde der pH durch weiteren Eisessigzusatz auf 4.2 erniedrigt, im übrigen entsprechen die Bedingungen e denen von d.

Da nach Arbeiten von W. T. HASKINS, R. M. HANN und C. S. HUDSON<sup>3)</sup> die Ausbeute von Arabinosephenylosazon beim Übergang von wäßrigem Reaktionsmedium in wasserfreien Glykol-monomethyläther stark ansteigt, haben wir die Glucosazonbildung auch in diesem Lösungsmittel studiert. Dabei wurden die Konzentrationsverhältnisse a angewendet. Auf der Suche nach anderen Lösungsmitteln stellten wir fest, daß die Glucosazonbildung bei Versuchsbedingung a in wasserfreiem Eisessig ca. 30mal schneller als in Wasser erfolgt.

Es zeigte sich, daß die Tritiumverluste bzw. der Tritiumeinbau sehr von den angewandten Bedingungen abhängig waren, während zwischen Glucose und Mannose kein typischer Unterschied auftrat. Die Ergebnisse sind in Tab. 2 und 3 zusammengestellt.

Die relativen Phenylsazonbildungsgeschwindigkeiten aus Glucose unter verschiedenen Versuchsbedingungen und aus Mannose unter Versuchsbedingung b zeigt Abbild. 1 (s. S. 20).

<sup>3)</sup> J. Amer. chem. Soc. 68, 1766 [1946].

Tab. 2. Übersicht über die Radioaktivitätsverteilung bei der fraktionierten Osazonbildung

Hexose Reaktions- bedingungen	Ver- such Nr.	Osazon aus C-1-T-markierter Aldohexose			Rohprod. Gesamt- ausb. % d. Th.	Ver- such Nr.	Osazon aus Aldohexose in H <sub>2</sub> O-T bzw. in D <sub>2</sub> O-T				
		1. Frakt.	mittl. Frakt.	letzte Frakt.			Radioakt.-Einbau i. % d. halben mol. H <sub>2</sub> O- bzw. D <sub>2</sub> O-Radioaktivität in ( ) %-Anteil d. Gesamtroh- ausb.	1. Frakt.	letzte Frakt.	Gesamt- ausb. % d. Th.	
Glucose a <sup>1)</sup> in H <sub>2</sub> O	1*)	1.4 (0-17)††)	0.6 (36-57)	2.2 (73-100)	58	—	—	—	—	—	—
Glucose a in D <sub>2</sub> O	2*)	3.7 (0-13)	2.7 (22-42)	11.2 (76-100)	55	—	—	—	—	—	—
Mannose a in D <sub>2</sub> O	—	—	—	—	—	9	13 (0-33)	60 (88-98)	32	36**)	—
Glucose b in H <sub>2</sub> O	3	9.1 (0-22)	2.9 (57-70)	0.4 (85-100)	32	10	8 (0-19)	27 (89-100)	15	32	—
Mannose b in H <sub>2</sub> O	4	9.5 (0-33)	0 (63-74)	0 (86-100)	25	11	8 (0-31)	24 (90-100)	15	22	—
Mannose b in D <sub>2</sub> O	5	15.5 (0-13)	2.7 (32-53)	5.0 (74-100)	23	—	—	—	—	—	—
Glucose c in H <sub>2</sub> O	6	0.5 (0-33)	0 (59-73)	1.5 (88-96)	58	12	7 (0-25)	68 (83-96)	30	63	—
Glucose d in H <sub>2</sub> O	7	11.6 (0-29)	12.0 (47-75)	27.6 (95-100)	57	13	10 (0-25)	76 (95-100)	25	59	—
Glucose e in H <sub>2</sub> O	8	10.1 (0-21)	10.6 (31-62)	18.7 (81-100)	52	—	—	—	—	—	—

\*) a, b, c, d, e sind die in Tab. 1 angegebenen Reaktionsbedingungen.  
 ††) Die in Spalte 3, 4 und 5 bzw. in 8 und 9 in Klammern angegebenen Werte sind die %-Anteile der einzelnen Fraktionen, bezogen auf die Gesamtroh-  
 = 100%.

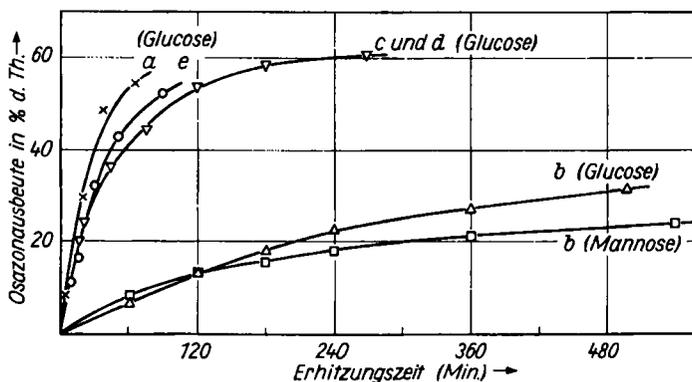
\*\*

\*) Diese Versuche wurden aus der I. Mittell. übernommen.  
 \*\*) Bei diesem Versuch fiel intermediär Mannosephenylhydrazon aus (Rohausbeute ungenau).

Tab. 3. Übersicht über die im Text beschriebenen Einzelversuche und deren Ergebnisse

Vers. Nr.	Reaktion	Reaktions- bedingung *)	% Radioaktivität des Ausgangs- produktes
14	Mannose-[1-T] → Osazon-[1-T]	b	94.1
15	Mannose-[1-T]-phenylhydrazon → Osazon-[1-T]	b	93.9
16	Glucose-[1-T] → Osazon-[1-T]	a in Glykol-monomethyläther	99.5
17	Glucose-[1-T] → Osazon-[1-T]	a in absol. Eisessig	99.7
18	1-Desoxy-1-p-toluidino-D-fructose → Osazon	in D <sub>2</sub> O-T**)	2.3% T-Einbau, bezogen auf D <sub>2</sub> O-T
19	Glucose-[1-T] → Osazon-[1-T]	d in D <sub>2</sub> O	

\*) Angaben entspr. Tab. 1. \*\*) Ausgeführt von Herrn J. F. KLEBE.



Abbild. 1. Vergleich der relativen Osazonbildungsgeschwindigkeiten unter verschiedenen Reaktionsbedingungen

Aus Tab. 2 und Abbild. 1 läßt sich folgendes ersehen: Bei der Osazonbildung aus Glucose wie Mannose wird Tritium an C-1 eingebaut, falls man in tritiummarkiertem Wasser arbeitet (Vers. 9–13). Es handelt sich dabei nicht um einen unspezifischen Austausch, sondern die eingebaute Tritiumaktivität geht mit der gebildeten Osazonmenge parallel und ist unabhängig von der Erhitzungszeit. Dies zeigt insbesondere ein Vergleich der Versuche 10 und 12. Die dabei gemessenen Osazonbildungsgeschwindigkeiten sind neben anderen in Abbild. 1 dargestellt.

Es ist zu ersehen, daß unter Versuchsbedingung b nach 8 Stdn. 32% Glucosazon erhalten werden. Diese enthalten 15% der maximal möglichen Tritiumaktivität (bezogen auf den Gehalt von TOH im Reaktionswasser). Unter Versuchsbedingung c erhält man nach 4½ Stdn. 63% Osazon, die 30% der maximal möglichen Tritiumaktivität aufweisen. Damit werden die in der I. Mitteil. gezogenen Schlußfolgerungen bestätigt, d. h. daß bei fortschreitender Umsetzung die Osazonbildung über Weg B zunimmt. Dies ist ohne weiteres einzusehen, da die Schlüsselverbindung für Weg A die Form II und für Weg B die Form IV ist. Form II ist gleichzeitig ein Gabelungspunkt, von dem die Reaktion in zwei Richtungen irreversibel fortschreiten kann. Dabei müssen auf dem Weg B zwei Stufen mehr durchlaufen werden.

In der I. Mitteil. wurde ferner gezeigt, daß unter den Osazonbildungsbedingungen praktisch keine Rückreaktion von IV nach II stattfindet. Dies wurde in einem weiteren Versuch bestätigt, in dem festgestellt wurde, daß, ausgehend von 1-Desoxy-1-*p*-toluidino-D-fructose, bei der Osazonbildung in D<sub>2</sub>O-T nur 2.3% der möglichen Radioaktivität eingebaut werden (Tab. 3, Vers. 18).

Überraschend sind die starken Unterschiede des Tritiumverlustes unter den verschiedenen Bedingungen, die nicht mit den Bildungsgeschwindigkeiten konform gehen.

So tritt unter Bedingung a (diese Bedingungen wurden in sehr ähnlicher Form auch von F. FRIEDBERG und L. KAPLAN<sup>4)</sup> gewählt) praktisch kein Tritiumverlust auf (Tab. 2, Vers. 1). Unter den Bedingungen c, d, e ist zumindest die anfängliche Osazonbildungsgeschwindigkeit der von a sehr ähnlich (Abbild. 1). Dabei tritt bei d und e (hohe Acetationenkonzentration) ein starker Tritiumverlust auf (Tab. 2, Vers. 7 und 8), der bei fortlaufender Fraktionierung zunächst konstant bleibt und gegen Schluß noch zunimmt, während unter Bedingung c wie bei a praktisch kein Verlust auftritt (Tab. 2, Vers. 6). Unter Versuchsbedingung b zeigt sowohl das aus Mannose-[1-T] wie aus Glucose-[1-T] erhaltene Osazon starke Tritiumverluste, die bei fortlaufender Fraktionierung kleiner werden (Tab. 2, Vers. 3 und 4). In D<sub>2</sub>O sind die Verluste erwartungsgemäß größer (vgl. I. Mitteil. sowie Vers. 5 Tab. 2 und 19 Tab. 3). Die Versuche der Glucosazonbildung in Glykol-monomethyläther bzw. in wasserfreiem Eisessig unter den Konzentrationsverhältnissen a zeigen keinen Tritiumverlust (Tab. 3, Vers. 16 und 17). Somit ist nicht das Lösungsmittelsystem, sondern das Konzentrationsverhältnis für den Tritiumverlust ausschlaggebend. Die Zahl der Faktoren, die hier von Einfluß sein können, ist sehr groß, da allein schon die Reaktion einer Carbonyl- mit einer NH<sub>2</sub>-Gruppe eines Carbonylreagenzes recht komplex ist (vgl. z. B. W. P. JENCKS<sup>5)</sup>). Die Ergebnisse lassen sich jedoch auf keinen Fall mit dem Mechanismus von E. FISCHER, auch nicht in seinen abgeänderten Formen, erklären.

Durch die Amadori-Umlagerung kann man zu einer qualitativen Erklärung kommen:

Unter Versuchsbedingung a tritt kein Tritiumverlust auf, weil die Amadori-Umlagerung reaktionsgeschwindigkeitsbestimmend ist und der intramolekulare Isotopeneffekt sehr hoch ist. Außerdem läuft nur ein Bruchteil bei der Osazonbildung über Weg B. Bei Versuchsbedingung b verläuft die Amadori-Umlagerung durch die geringe Natriumacetatkonzentration langsamer (vgl. W. PIGMAN und Mitarbb.<sup>6)</sup>). Die mit steigendem Umsatz geringer werdenden Tritiumverluste zeigen das Vorhandensein eines kinetischen Isotopeneffektes. Es kann daher ein Wechsel im reaktionsgeschwindigkeitsbestimmenden Schritt angenommen werden. In einer gesonderten Untersuchung, über die an anderer Stelle berichtet wurde<sup>7)</sup>, ist der kinetische Isotopeneffekt bei der Phenylhydrazonbildung aus Mannose-[1-T] bestimmt worden. Aber dieser Effekt spielt hier keine Rolle, da bei der Osazonbildung aus Mannose-[1-T]-phenylhydrazon der gleiche Tritiumverlust von 6% (Tab. 3, Vers. 15) wie bei der Osazonbildung aus Mannose-[1-T] auftritt. Die Mannosephenylhydrazonbildung ist bereits abgeschlossen, bevor nennenswerte Mengen Osazon entstehen.

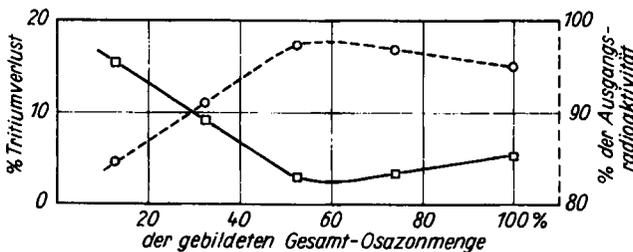
<sup>4)</sup> J. Amer. chem. Soc. **79**, 2600 [1957].      <sup>5)</sup> J. Amer. chem. Soc. **81**, 475 [1959].

<sup>6)</sup> L. ROSEN, J. WOODS und W. PIGMAN, J. Amer. chem. Soc. **80**, 4697 [1958].

<sup>7)</sup> H. SIMON und D. PALM, Chem. Ber. **93**, 1289 [1960].

Das Auftreten eines starken kinetischen Isotopeneffektes bei der Osazonbildung zeigt, daß hier ein primärer Isotopeneffekt vorliegen muß. Dieser kann aber nur durch den Übergang von einem  $-\text{CH}_2-$  zu einem  $=\text{CH}_1$ -Körper zustande kommen. Die Mannose und Glucose verhalten sich praktisch gleich, was auch zu erwarten ist, da das Amadori-Umlagerungsprodukt beider Hexosen identisch ist.

Aus der näheren Betrachtung der Isotopeneffektskurve ergibt sich, daß ihr Verlauf vom Normalfall abweicht. Dies zeigt sich besonders deutlich bei Versuch 5, Tab. 2. Bei diesem Versuch wurde die Osazonbildung in Deuteriumoxyd durchgeführt, dadurch werden die Tritiumverluste höher und der Effekt wird deutlicher. In Abbild. 2 ist der prozentuale Tritiumverlust bzw. der Prozentgehalt der Tritiumaktivität des Osazons, bezogen auf den Tritiumgehalt der Mannose, in Abhängigkeit vom Umsatz dargestellt.



Abbild. 2. Verlauf des Tritiumverlustes in Abhängigkeit vom Umsatz bei der Osazonbildung aus Mannose in  $\text{D}_2\text{O}$  unter Versuchsbedingung b ——— und die sich daraus ergebende Isotopeneffektskurve - - - -

Die anomale Isotopeneffektskurve läßt sich wie folgt erklären: Beim Übergang von Konzentrationsbedingung a auf b wird bei Weg B der reaktionsgeschwindigkeitsbestimmende Schritt nicht einfach von der Amadori-Umlagerung auf die C-H-Spaltung übergehen, sondern es ist möglich, daß beide Reaktionsschritte nun vergleichbar schnell verlaufen. In einem solchen Fall tritt nach Berechnungen von K. HEYNS und H. SCHULTZE<sup>8)</sup> eine anomale Isotopeneffektskurve auf, die je nach den Verhältnissen der Geschwindigkeitskonstanten sehr verschieden sein kann. Eine solche an und für sich schon anomale Isotopeneffektskurve wird nun noch durch die Konkurrenzreaktion des Weges A verzerrt, da letzterer keinen Radioaktivitätsverlust des Osazons hervorruft und außerdem mit steigendem Umsatz abnimmt. Als Folge dieser Überlagerung können sich Isotopeneffektskurven ergeben, die den erhaltenen entsprechen.

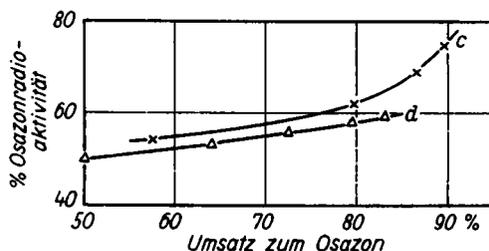
Unter Versuchsbedingung c haben wir praktisch die gleichen absoluten Konzentrationen an Phenylhydrazin und Natriumacetat wie unter a, die Zuckerkonzentration ist jedoch  $\frac{1}{10}$ . Erwartungsgemäß tritt auch hier kein Tritiumverlust auf (vgl. Tab. 2, Vers. 1 und 6). Wie aus Abbild. 1 hervorgeht, ist die anfängliche Reaktionsgeschwindigkeit mit der von a gleich.

Unter Versuchsbedingungen d und e liegt im Vergleich zu allen anderen drei Bedingungen, insbesondere aber gegenüber der Bedingung b, eine wesentlich höhere

<sup>8)</sup> Liebigs Ann. Chem. 611, 40 [1958].

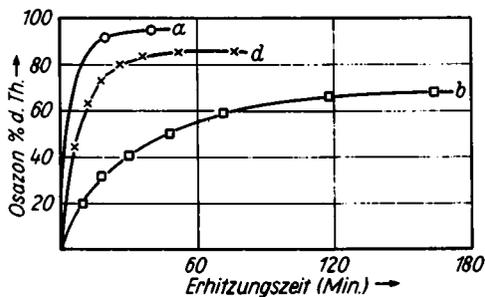
Essigsäure- bzw. Acetatkonzentration vor. Außerdem ist der pH-Wert wesentlich niedriger. Dies kann gegenüber b bewirken, daß die Wasserstoffabspaltung an C-1 nicht mehr reaktionsgeschwindigkeitsbestimmend ist, wodurch kein kinetischer Isotopeneffekt auftreten kann. Darüber hinaus kann die Erhöhung der Essigsäure- bzw. Acetatkonzentration gegenüber a und c eine Erleichterung der C-H-Spaltung bedingen, die eine Verkleinerung des intramolekularen Isotopeneffekts zur Folge hat.

Die Frage, ob sich der *intramolekulare Isotopeneffekt* beim Übergang von den Bedingungen c auf d tatsächlich verkleinert, wurde bei der Osazonbildung von 1-Desoxy-1-*p*-toluidino-D-fructose-[1-T] studiert. Abbild. 3 zeigt den Verlauf der Isotopeneffektkurven unter Bedingungen c und d. Aus dem Kurvenverlauf bei hohen Ausbeuten zeigt sich, daß unter Bedingung d ein wesentlich kleinerer intramolekularer Isotopeneffekt auftritt. Es ist bekannt, daß die Größe des Isotopeneffekts stark von den Reaktionsbedingungen abhängt<sup>9)</sup>.



Abbild. 3. Radioaktivität des Osazons aus 1-Desoxy-1-*p*-toluidino-D-fructose-[1-T] unter Versuchsbedingungen c und d in Abhängigkeit vom Umsatz, bezogen auf die Radioaktivität des Ausgangsmaterials

Versuche über den Einfluß der Essigsäure-Acetat-Konzentration bei der Osazonbildung von Amadori-Umlagerungsprodukten zeigten im Falle der 1-Desoxy-1-*p*-



Abbild. 4. Abhängigkeit der Osazonbildungsgeschwindigkeit von 1-Desoxy-1-*p*-toluidino-D-fructose von verschiedenen Konzentrationsverhältnissen. a, b und d entsprechen den in Tab. 1 angegebenen Werten

toluidino-D-fructose eine starke Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit mit zunehmender Acetatkonzentration, wie in Abbild. 4 dargestellt wird. Das läßt erwarten, daß sich hierbei die intramolekularen Isotopeneffekte ändern.

<sup>9)</sup> D. B. DENNEY und P. P. KLEMCHUK, J. Amer. chem. Soc. 80, 6014 [1958].

Die Essigsäurekonzentration ist also sowohl auf die Amadori-Umlagerung als auch auf die C—H-Spaltung bei der Osazonbildung von Einfluß. Dieser ist jedoch in quantitativer Hinsicht verschieden, was nicht verwunderlich ist, da es sich um zwei verschiedene Reaktionsschritte handelt.

Vergleicht man die Osazonbildungsgeschwindigkeit von Mannose und Glucose (Abbild. 1), so ergibt sich, daß sie unter Bedingung b zunächst gleich ist. Die im Endeffekt im allgemeinen um  $\frac{1}{3}$  geringere Osazonausbeute aus Mannose hat offensichtlich im stärkeren Auftreten von Nebenreaktionen ihren Grund. Sie machen sich bei der Mannose durch wesentlich stärkere Braunfärbung der Reaktionslösung bemerkbar.

Wie die mitgeteilten Versuche und ihre Diskussion zeigen, werden die Schlußfolgerungen der I. Mitteil.<sup>1)</sup> bestätigt und es wird weiterhin wahrscheinlich gemacht, daß die beiden Wege der Osazonbildung, von denen einer mit Sicherheit Weg B ist, in Abhängigkeit voneinander stehen, womit der Weg A als Alternative plausibel ist.

Inzwischen ist eine Arbeit von E. M. BAMDAS, K. M. ERMOLAEV, V. J. MAIMIND und M. M. SCHEMYAKIN<sup>10)</sup> erschienen, in der im Gegensatz zu einer früheren Arbeit<sup>11)</sup> gefolgert wird, daß nicht Weg B, sondern Weg A bei der Osazonbildung aus Benzoin beschriftet wird. Es muß dies aus den <sup>15</sup>N-Verteilungen geschlossen werden. Hier unterscheiden sich die Analysenzahlen von der früheren Arbeit um nahezu 100%. Wie weit das durch andere Reaktionsbedingungen bewirkt wird, läßt sich aus der Arbeit nicht ersehen. Bei der Osazonbildung aus Cyclohexanolon sind die Analysenwerte nicht eindeutig, was folgende Überlegung zeigt: Im Laufe der Osazonbildung aus Cyclohexanolon-*p*-nitrophenylhydrazon- $[\beta\text{-}^{15}\text{N}]$  sinkt der Prozentgehalt an <sup>15</sup>N im nicht umgesetzten Phenylhydrazon von 39.6% auf 23.8% ab. Das dabei entstandene Ammoniak enthält 23.4% <sup>15</sup>N; falls nur Weg A abläuft, müßte es jedoch 39.6–23.8% enthalten. — Einen Beweis, daß ausschließlich Weg A beschriftet wird, sehen die Autoren darin, daß beim Erhitzen von Cyclohexanolon-*p*-nitrophenylhydrazon in Eisessig in Gegenwart von 2.2 Moll. Acetanhydrid und ohne Phenylhydrazin das *N*-Acetyl-Derivat des  $\alpha$ -Di-ketomonimins isoliert werden konnte. In diesem Fall kann allerdings Weg B kaum in Betracht kommen, da hierzu ein zweites Mol. Phenylhydrazin notwendig ist.

Dem BUNDESMINISTERIUM FÜR ATOMKERNENERGIE UND WASSERWIRTSCHAFT danken wir für finanzielle Unterstützung und Fräulein I. ZUHRT für die Tritiumbestimmungen.

## BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

1. *D*-Mannose-[1-T] wurde aus *D*-Mannonsäurelacton in ähnlicher Weise<sup>12)</sup> erhalten wie Glucose-[1-T]<sup>1)</sup>. In 40 ccm tritiumhaltigem Wasser (Radioaktivität = 0.6 mC/ccm) wurden 3 g Benzoesäure und 356 mg Mannonsäurelacton (2 mMol) unter Eiskühlung verrührt, sofort mit 9.2 g 5-proz. Natriumamalgam in Plätzchen versetzt und  $1\frac{1}{2}$  Stdn. bei 0° stark gerührt. Sodann wurden nach Entfernung des Quecksilbers erneut 2.4 g Benzoesäure und 9.2 g Natriumamalgam zugegeben. Nach weiterem 2stdg. Reduzieren wurde das Reduktionswasser

<sup>10)</sup> Chem. and Ind. 38, 1195 [1959] und Ber. Akad. Wiss. UdSSR 128, 564 [1959].

<sup>11)</sup> M. M. SCHEMYAKIN und W. I. MAIMIND, Ber. Akad. Wiss. UdSSR 102, 1147 [1955], C. A. 50, 4872b [1955].

<sup>12)</sup> 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 d. organ. Chemie (Houben-Weyl), Bd. 4/2, S. 676, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart 1955.

i. Vak. abdestilliert und für weitere Ansätze verwendet. Der Destillationsrückstand wurde in 50 ccm Wasser in der Hitze gelöst und mit 1.07 g nichtmarkierter Mannose versetzt. Nach der Einstellung auf pH 2–3 mit verd. Salzsäure wurde die Benzoesäure in der Kälte abfiltriert, das Filtrat mit verd. Natronlauge auf pH 5–6 eingestellt und i. Vak. zur Trockne gebracht. Der Rückstand wurde mit 80 ccm siedendem Methanol  $\frac{1}{2}$  Stde. extrahiert, nach Einengen auf 20 ccm vom Natriumchlorid abfiltriert, und die Mannose als *p*-Nitranilin-*N*- $\beta$ -mannosid isoliert<sup>13)</sup>: Schmp. 215–217° (aus Wasser). Die Radioaktivitätsbestimmung<sup>14)</sup> ergab eine Reduktionsausbeute von ca. 15%.

In weiteren Reduktionsansätzen gewonnene 6 g *p*-Nitranilin-*N*- $\beta$ -*D*-mannosid-[1-T] wurden 1 Stde. mit 1-proz. Essigsäure erhitzt. Die Isolierung der Mannose-[1-T] erfolgte, wie bei der Glucose-[1-T] angegeben<sup>1,13)</sup>. Ausb. 2.6 g (72% d. Th.). Nach Verdünnung mit 4 g nicht-radioaktiver Mannose ergaben sich nach Umkristallisation aus absol. Methanol 6.5 g *Mannose*-[1-T], Schmp. 128° (Radioaktivität: 104000 ipm/mMol).

2. *Calciummannonat aus D-Mannose*-[1-T] wurde nach C. S. HUDSON und H. S. ISBELL<sup>15)</sup> dargestellt. Ausb. 17% d. Th. Die Radioaktivitätsbestimmungen ergaben, daß 1% des Tritiums nicht am C-1 der Mannose-[1-T] gebunden waren. Dies wurde bei den Untersuchungen berücksichtigt.

3. *D-Glucose*-[1-T]-phenylosazon aus *D-Glucose*-[1-T] in Glykol-monomethyläther (Versuchsbedingung a): 180 mg Glucose-[1-T] (1 mMol), 356 mg Phenylhydrazin (3.3 mMol) und 318 mg Eisessig (5.3 mMol) wurden in 3.3 ccm Glykol-monomethyläther („O-Methylglykol reinst f. chrom. Zwecke“ d. Fa. Theodor Schuchardt) 90 Min. auf dem Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlung und Zugabe von 10 ccm Wasser wurde abgesaugt und mit wenig Wasser, Äthanol und Äther gewaschen. Rohausb. 234 mg (65% d. Th.). Die Umkristallisation erfolgte durch Lösen in wenig heißem Dioxan, Zusatz der gleichen Menge heißem Wasser und Abkühlung; Schmp. 205–207°.

4. *D-Glucose*-[1-T]-phenylosazon aus *D-Glucose*-[1-T] in absol. Eisessig (Versuchsbedingung a): 180 mg Glucose-[1-T] und 356 mg Phenylhydrazin wurden in 3.3 ccm absol. Eisessig 3 Min. auf dem Wasserbad erhitzt, der Ansatz mit 10 ccm Eiswasser versetzt und auf 0° abgekühlt. Nach Filtration wurde analog Vers. 3 aufgearbeitet. Rohausb. 215 mg (60% d. Th.).

5. *D-Mannose*-[1-T]-phenylosazon aus *D-Mannose*-[1-T] bzw. aus *D-Mannose*-[1-T]-phenylhydrazon (Versuchsbedingung b): 180 mg Mannose-[1-T] bzw. 270 mg Mannose-[1-T]-phenylhydrazon (1 mMol) wurden in 35 ccm Wasser zusammen mit 435 mg wasserfreiem Natriumacetat und 477 mg Phenylhydrazin-hydrochlorid (3.3 mMol) bzw. 333 mg Phenylhydrazin-hydrochlorid (2.3 mMol) unter Stickstoff 8 Stdn. auf dem Wasserbad erhitzt. Rohausb. 79 bzw. 82 mg (22 bzw. 23% d. Th.). Die Umkristallisation erfolgte wie bei Vers. 3.

6. *Fraktionierte Bildung von D-Glucose*-[1-T]-phenylosazon aus *D-Glucose*-[1-T] bzw. *D-Mannose*-[1-T] bei verschiedenen Reaktionsbedingungen: Die Reaktionslösungen wurden mit jeweils 4 mMol Glucose bzw. Mannose in den in Tab. I angegebenen Konzentrationsverhältnissen hergestellt. Bei Versuchsbedingung d und e fügte man die Glucose-[1-T] den Reaktionslösungen zu, nachdem diese bei 20° mit Eisessig auf die in Tab. I angegebenen Werte von pH 4.6 und 4.2 gebracht worden waren (pH-Messung mit der Glaselektrode). Die Reaktionslösungen wurden auf dem Wasserbad unter Stickstoff erhitzt. Zu bestimmten Zeiten, die aus Abbild. 1 ersichtlich sind, wurde mit Eiswasser abgekühlt, vom jeweils gebildeten Osazon abgesaugt und wie bei Vers. 3 umkristallisiert.

<sup>13)</sup> F. WEYGAND, W. PERKOW und P. KÜHNER. Chem. Ber. 84, 594 [1951].

<sup>14)</sup> H. SIMON, H. DANIEL und J. F. KLEBE, Angew. Chem. 71, 303 [1959].

<sup>15)</sup> J. Amer. chem. Soc. 51, 2225 [1929].

7. *Fraktionierte Bildung von D-Glucose-[1-T]-phenylosazon aus nicht radioaktiver D-Glucose bzw. D-Mannose in tritiumhaltigem Wasser bzw. Deuteriumoxyd:* Die Osazonfraktionen wurden wie bei Versuch 6 gewonnen. Bei der fraktionierten Bildung von Mannose-[1-T]-phenylosazon in D<sub>2</sub>O-T unter Versuchsbedingung a (Vers. 9) wurden die einzelnen Osazonfraktionen vom mitausgefallenen Mannosephenylhydrazon durch Lösen in wenig heißem absol. Dioxan abgetrennt. Das unlösliche Mannosephenylhydrazon wurde der Reaktionslösung wieder zugefügt, ehe erneut erhitzt wurde. Bei allen Versuchen wurde das labil gebundene Tritium in den Osazonen durch dreimalige Umkristallisation in Dioxan/Wasser restlos ausgetauscht.

8. *Die fraktionierte Osazonbildung aus 1-Desoxy-1-p-toluidino-D-fructose (=DTF) bei verschiedenen Konzentrationsbedingungen* erfolgte mit je 2.5 mMol DTF unter den aus Tab. 1 ersichtlichen Bedingungen a, b und d in der unter Vers. 6 angegebenen Weise, jedoch nicht unter Stickstoff (vgl. Abbild. 4 für Ausbeuten und Erhitzungszeiten).

9. *Fraktionierte Bildung von D-Glucose-[1-T]-phenylosazon aus 1-Desoxy-1-p-toluidino-D-fructose-[1-T] zur Bestimmung der Isotopeneffektskurven bei den Reaktionsbedingungen c und d (Abbild. 3):* Zu der heißen Lösung von 940 mg DTF (3.5 mMol) in 122.5 ccm Wasser wurden nacheinander die den Bedingungen c und d entsprechenden Mengen Eisessig, Natriumacetat und Phenylhydrazin-hydrochlorid gegeben. Die klaren Reaktionslösungen wurden auf dem Wasserbad erhitzt und nach Bildung einer gewissen Osazonmenge mit Eis/Kochsalz-Mischung abgekühlt, die ersten Fraktionen wurden nach 2 Min., die letzten Fraktionen nach 35 Min. abgesaugt. Die Radioaktivität der einzelnen Osazonfraktionen wurde nach zweimaliger Umkristallisation aus Dioxan/Wasser bestimmt. Aus den so erhaltenen Werten berechnete man die Radioaktivität des nach einem bestimmten Umsatz (s. Abbild. 3) gebildeten Gesamtosazons.

---