

KURT HEYNS und WILHELM SCHULZ

Die Umsetzung von D-Glucuronsäure und D-Galakturonsäure mit Aminosäuren zu 1-N-Aminosäure-1-desoxy-fructuronsäuren und 1-N-Aminosäure-1-desoxy-tagaturonsäuren („Fructuron- und Tagaturon-Aminosäuren“¹⁾)

Aus dem Chemischen Staatsinstitut, Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg
(Eingegangen am 21. August 1961)

Monoamino- und Diamino-monocarbonsäuren setzen sich mit D-Glucuronsäure und D-Galakturonsäure über die bisher nicht faßbaren N-Uronoside unter anschließender Umlagerungsreaktion zu den entsprechenden 1-N-Aminosäure-1-desoxy-D-fructuron- bzw. D-tagaturonsäuren (D-Fructuron- bzw. D-Tagaturon-Aminosäuren¹⁾) um.

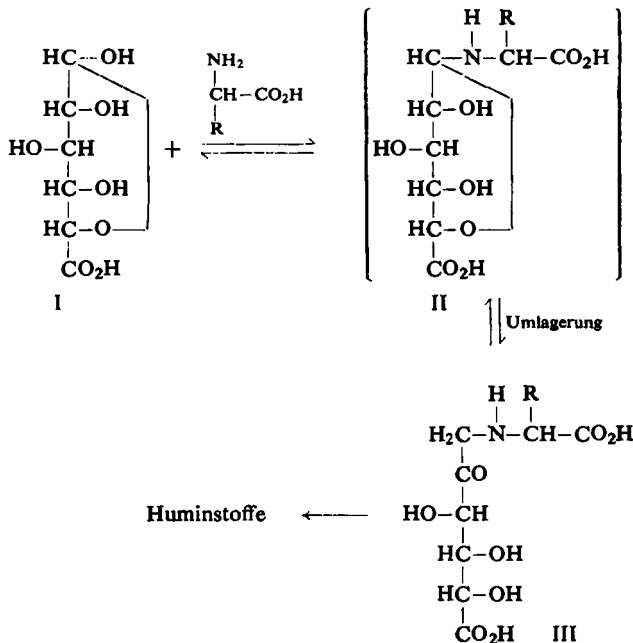
Die Umsetzung von Natriumglucuronat mit Glycin und Alanin führt, wie wir kürzlich zeigen konnten¹⁾, über eine Amadori-Umlagerung zu 1-N-Aminosäure-1-desoxy-fructuronsäuren (abgekürzt Fructuron-Aminosäuren). In der vorliegenden Arbeit wird die Reaktion weiterer Aminosäuren mit Natriumglucuronat, Glucuronsäure, Glucuronsäurelacton und Galakturonsäure untersucht. Von Bedeutung sind derartige Reaktionen als Primärstufen der nichtenzymatischen Bräunung, insbesondere der Maillard-Reaktion. Gerade die Umsetzungen von Uronsäuren mit Aminosäuren und Peptiden führen sehr viel schneller zu intensiv dunkelbraunen Sekundärprodukten als die vergleichbare Reaktion mit Glucose.

UMSETZUNG VON NATRIUM-D-GLUCURONAT, D-GLUCURONSÄURE UND D-GLUCURONOLACTON MIT AMINOSÄUREN

Freie D-Glucuronsäure oder ihr Natriumsalz reagieren mit Aminosäuren in methanolischer Lösung bereits bei Raumtemperatur unter spontaner Amadori-Umlagerung der instabilen, nicht faßbaren N-Glykoside (II) zu Fructuron-Aminosäuren (III). Vor allem bei basischen Aminosäuren lassen sich Fructuron-Aminosäuren schon nach einigen Stunden deutlich nachweisen, α -Monoamino-monocarbonsäuren reagieren langsamer, und bei sauren Aminosäuren ist auch bei Neutralisierung einer Carboxylgruppe keine Reaktion zu beobachten. In siedendem Methanol sind bei den meisten Aminosäuren bereits nach wenigen Minuten umgelagerte Verbindungen erkennbar. Gleichzeitig mit der Umlagerung geht eine fortschreitende Braunfärbung der Lösung einher, so daß die Verfärbung durch Huminstoffe als Maß für die Menge der gebildeten Amadori-Verbindung dienen kann. Da jedoch bei längeren Reaktionszeiten Fructuron-Aminosäuren wieder zersetzt werden und die huminartige Neben-

¹⁾ Zur Nomenklatur siehe K. HEYNS und W. SCHULZ, Chem. Ber. 93, 128 [1960], Fußnote 1. In Analogie zu den Fructuron-Aminosäuren wurden die 1-N-Aminosäure-1-desoxy-tagaturonsäuren vereinfacht „Tagaturon-Aminosäuren“ benannt.

produkte eine Isolierung der Fructuron-Aminosäuren erheblich erschweren, ist es notwendig, die Reaktion vorzeitig abubrechen.



Das Gleichgewicht bei der *N*-Glykosidbildung ist weitgehend nach links verschoben, so daß nur geringe Mengen an *N*-Glykosid (II) jeweils zur Umlagerung vorliegen. Zur Beschleunigung der Reaktion ist es deshalb vorteilhaft, eine der beiden Komponenten in zwei- bis fünffachen molaren Mengen einzusetzen, um die *N*-Glykosidmenge zu erhöhen. Eine Reaktionsbeschleunigung durch Säurezusatz oder andere Protonendonatoren läßt sich nicht nachweisen. Die Carboxylgruppe der Aminosäure dürfte genügend für die Umlagerung erforderliche Protonen liefern. Säurezusätze verschieben nur das Gleichgewicht bei der *N*-Glykosidbildung nach links und katalysieren die Abbaureaktionen.

Da Na-Glucuronat und einige Aminosäuren in absol. Methanol wenig löslich sind, muß Wasser als Lösungsvermittler zugesetzt werden. Dieser Wasserzusatz fördert jedoch die *N*-Glykosidspaltung und die Bräunungsreaktionen; es ist daher günstiger, als Ausgangsprodukt die in Methanol gut lösliche freie Glucuronsäure zu verwenden. Freie Carboxylgruppen von Uronsäuren stören offensichtlich die Reaktion nicht, denn die Umsetzung von freier Glucuronsäure mit Aminosäuren verläuft schneller und glatter als die Umsetzung des Na-Salzes. Dieses gilt jedoch nur für die Umsetzung in absol. Methanol. Bei Wasserzusätzen wird die Dissoziation der Uronsäure so weit erhöht, daß die erhöhte Protonenkonzentration die *N*-Glykosidbildung zurückdrängt.

Setzt man Aminosäuren mit Glucuronsäurelacton in Methanol um, so werden die Lösungen schnell dunkelbraun und im Reaktionsgemisch sind keine Amadori-Verbindungen

zu finden. Einzig im Falle des stark basischen Lysins konnten geringe Mengen an Fructuron-Lysin chromatographisch nachgewiesen werden, die offensichtlich durch Öffnung des Lactonringes und anschließende Umlagerung entstehen. Amadori-Derivate des Glucuronsäurelactons scheinen nicht beständig zu sein, sondern die Reaktion verläuft vollständig in Richtung der Bildung von Bräunungsprodukten. Diese Befunde decken sich mit den Ergebnissen von K. HEYNS und W. BALTES²⁾, die bei der Umsetzung von Glucuronsäurelacton mit aromatischen Aminen auch nur dunkel gefärbte Abbauprodukte erhielten, bei den stärker basischen aliphatischen Aminen jedoch eine Aufspaltung des Lactonringes mit anschließender Umlagerung feststellen konnten.

DAS VERHALTEN DER EINZELNEN AMINOSÄUREN BEI DER UMSETZUNG MIT GLUCURONSÄURE

Glycin, L-Alanin und L-Valin reagieren glatt zu den entsprechenden Fructuron-Aminosäuren (III). Fructuron-L-Valin konnte als erste Fructuron-Aminosäure kristallin gewonnen werden. L-Leucin zeigt ein wesentlich schlechteres Reaktionsvermögen, das Fructuron-L-Leucin war nicht rein erhältlich. Sehr gut läßt sich L- β -Phenylalanin mit Glucuronsäure zu dem kristallin erhaltenen Fructuron-L-Phenylalanin umsetzen. Tyrosin ist unter den gleichen Bedingungen nicht zur Reaktion zu bringen. Eine Umsetzung von Tyrosin mit Glucuronsäure in Dimethylsulfoxyd analog der Darstellung von Glucose-Tyrosin nach K. HEYNS und H. BREUER³⁾ führt nach einer bei etwa 70° spontan einsetzenden Reaktion zu stark dunkel gefärbten Zersetzungsprodukten.

Mit Serin entsteht die Ketose nur in geringem Ausmaß. Beim Threonin kompensiert die Methylgruppe den negativen Einfluß der OH-Gruppe vollständig, denn Threonin reagiert mit am besten von allen untersuchten Aminosäuren.

Auch Aminosäuren mit sekundären Aminogruppen, wie beispielsweise das Prolin, führen zur Amadori-Umlagerung. Die Umlagerung erfolgt langsamer und mit schlechterer Ausbeute als bei Aminosäuren mit primärer Aminogruppe. Acylierte Aminosäuren wie Hippursäure, bei der die Benzoylgruppe die Basizität der Aminogruppe sehr herabsetzt, reagieren nicht mit Glucuronsäure.

Von den basischen Aminosäuren wurde das Verhalten des L-Lysins genauer untersucht. Es war zu erwarten, daß bei der Reaktion mit Glucuronsäure zwei Monofructuron-Lysin-Verbindungen mit Verknüpfung des Kohlenhydratrestes an der α - oder ϵ -Aminogruppe des Lysins und Diffructuron-Lysin, bei dem sich beide Aminogruppen umgesetzt haben, gebildet werden. Es entstehen tatsächlich alle drei Lysinverbindungen, von denen das ϵ -D-Fructuron-L-Lysin und das α,ϵ -Di-D-Fructuron-L-Lysin isoliert wurden. Die Mengenverteilung der drei Verbindungen hängt von den angewendeten Reaktionsbedingungen ab. ϵ -Fructuron-Lysin ist stets die primär auftretende Verbindung. Daneben entsteht in wasserfreiem Methanol α -Fructuron-Lysin, wenn ausreichend Lysin im Reaktionsgemisch vorhanden ist. In wasserhaltigem Methanol wird fast ausschließlich die ϵ -Verbindung gebildet. Bei einem Überschuß an Glucuronsäure bildet sich in absol. Methanol anfangs sowohl die ϵ - wie auch die α -Verbindung, die beide dann in das Diffructuron-Lysin übergehen. In wäßrigem Methanol ergibt die Umsetzung mit Na-Glucuronat nur die ϵ -Verbindung, die schnell in die Diverbindung

²⁾ Chem. Ber. 93, 1616 [1960].

³⁾ Chem. Ber. 91, 2750 [1958].

übergeht. Freie Glucuronsäure ergibt dagegen unter diesen Bedingungen vorwiegend ϵ -Fructuron-Lysin, wenig α -Fructuron-Lysin und keine Weiterreaktion zu Diffructuron-Lysin. Unter ähnlichen Bedingungen ist Diffructuron-Lysin auch unter Rückumlagerung zur Monofructuronverbindung spaltbar.

Tab. 1. Reaktion von Lysin mit Glucuronsäure bzw. Na-Glucuronat

	<i>Na-Glucuronat</i>		<i>Glucuronsäure</i>	
	absol. Methanol	Methanol/Wasser	absol. Methanol	Methanol/Wasser
Lysin im Überschuß	B c	B	a b C	B (c)
Lysin im Unterschuß	A B C *)	A B	A B C *)	b c

*) nach längerer Reaktionszeit nur noch A

A = α , ϵ -Di-D-Fructuron-L-Lysin; B = ϵ -D-Fructuron-L-Lysin; C = α -D-Fructuron-L-Lysin; kleine Buchstaben (a, b, c) bedeuten untergeordnete Mengen

ϵ -D-Fructuron-L-Lysin ist kristallin, α , ϵ -Di-D-Fructuron-L-Lysin amorph. Die Struktur des ϵ -D-Fructuron-L-Lysins ließ sich durch folgende Reaktion beweisen: Ein L-Lysin-Ni-Komplex, in dem die α -Aminogruppe durch das Metall blockiert ist, wurde mit Glucuronsäure zum ϵ -Fructuron-Lysin-Ni-Komplex umgesetzt, wobei nur die ϵ -Aminogruppe des Lysins reagieren kann. Die durch Zersetzung dieses Komplexes erhaltene Fructuron-Lysin-Verbindung erwies sich als identisch mit der aus Glucuronsäure und Lysin direkt erhältlichen Monofructuron-Lysin-Hauptkomponente. Dieses Ergebnis stimmt überein mit den Erfahrungen bei den Umsetzungen von Lysin mit Glucose und Fructose⁴⁾, bei denen primär nur die ϵ -Aminogruppe reagiert.

Arginin setzt sich mit Glucuronsäure unter Bildung eines Fructuron-Arginins um, bei dem es sich wohl um den über die α -Aminogruppe verknüpften Aminozucker handelt. Die Guanidinogruppe dürfte unter diesen Bedingungen mit Glucuronsäure nicht unter Umlagerung reagieren. Es konnten auch bei der Umsetzung von Kreatin mit Glucuron- und Galakturonsäure keine Amadori-Zucker nachgewiesen werden.

Die sauren Aminosäuren Glutaminsäure und Asparaginsäure bilden bei der Umsetzung mit Na-Glucuronat in wasserhaltigem Methanol auch nach langen Reaktionszeiten keine Umlagerungsprodukte. Infolge der beiden Carboxylgruppen scheint die H-Ionenkonzentration für eine N-Glykosidbildung zu groß zu sein. In absol. Methanol verläuft die Umsetzung wegen zu geringer Löslichkeit ebenfalls negativ. Die Neutralisierung einer Carboxylgruppe mit NaOH, die bei der Umsetzung von Fructose mit diesen Aminosäuren das gewünschte Produkt liefert³⁾, führte hier nicht zu einer befriedigenden Umsetzung zum Fructuronsäurederivat. — Bei den sauren Aminosäuren dürften zwei negative Einflüsse die Reaktion beeinflussen: die zu hohe Acidität vor allem in wasserhaltigem Medium verschiebt das Gleichgewicht bei der N-Glykosidbildung nach links, und die sich negativ auswirkenden Effekte der beiden Carboxylgruppen auf die Aminogruppe beeinflussen die Umlagerung ungünstig.

Asparagin, bei dem durch die Carbonamidgruppe die Acidität herabgesetzt ist, läßt sich mit Glucuronsäure ohne Schwierigkeiten zu kristallinem D-Fructuron-L-Asparagin umsetzen.

⁴⁾ K. HEYNS und H. NOACK, Chem. Ber. 95, 720 [1962], nachstehend.

Fructuron-Aminosäuren von Monoamino-monocarbonsäuren und basischen Aminosäuren lassen sich über saure Austauschersäulen (Lewatit S 100, Dowex 50H) durch Elution mittels Trichloressigsäure isolieren und reinigen. Fructuron-Aminosäuren saurer Aminosäuren sind auf diesem Wege nicht rein erhältlich; eine Reinigung über Cellulosesäulen ist möglich.

DIE UMSETZUNG VON D-GALAKTURONSÄURE MIT AMINOSÄUREN

Die D-Galakturonsäure entspricht in ihrem Verhalten bei der Umsetzung mit Aminosäuren weitgehend der D-Glucuronsäure. Sie lagert wie diese in die entsprechenden Amadori-Verbindungen um. Man gelangt so zu den 1-N-Aminosäure-1-desoxytagaturonsäuren, den Tagaturon-Aminosäuren. Aus einer großen Anzahl von Vergleichsversuchen läßt sich ersehen, daß die D-Galakturonsäure etwas schneller und besser umlagert als die D-Glucuronsäure. Entsprechend sind Neben- und Folgereaktionen wie z. B. Huminbildung gegenüber der Glucuronsäure begünstigt, so daß man bei der Umsetzung von Galakturonsäure mit Aminosäuren kürzere Reaktionszeiten einhalten muß, da huminartige Sekundärprodukte sonst eine Aufarbeitung der Ansätze unmöglich machen.

DL-Alanin, L-Valin, L-Leucin, L-Phenylalanin, DL-Serin, DL-Threonin, L-Arginin, L-Lysin, ϵ -D-Fructuron-L-Lysin wurden in Methanol mit D-Galakturonsäure umgesetzt und die Reaktionen papierchromatographisch verfolgt. In allen Fällen entstehen die der D-Glucuronsäure analogen Verbindungen. An dem Beispiel der Umsetzung von ϵ -D-Fructuron-L-Lysin mit D-Galakturonsäure, bei der sich das ϵ -D-Fructuron- α -D-Tagaturon-L-Lysin bildet, konnte gezeigt werden, daß auch gemischte Zucker beim Vorliegen mehrerer reaktionsfähiger Aminogruppen darstellbar sind.

Die Isolierung der Tagaturon-Aminosäuren machte erhebliche Schwierigkeiten, da Tagaturon-Aminosäuren relativ instabil sind und stets teilweise in die Ausgangskomponenten zurückgespalten wurden. Bei diesen Verbindungen wurde erstmalig beobachtet, daß auch die Amadori-Umlagerung ähnlich wie die Ketosylumlagerung voll reversibel sein kann. Lösungen mit chromatographisch reinen Tagaturon-Aminosäuren enthielten nach kurzer Zeit neben der Ausgangsverbindung wieder die freie Aminosäure und eine Uronsäure. Die Tagaturon-Aminosäuren ließen sich aus diesem Grunde nicht rein gewinnen. Tagaturon-L-Valin spaltete sich bei der Aufarbeitung teilweise, Tagaturon-L-Phenylalanin nahezu völlig. ϵ -Fructuron- α -Tagaturon-L-Lysin bildet durch teilweise Spaltung ϵ -Fructuron-L-Lysin und Uronsäure. Einzig Tagaturon-Alanin scheint etwas stabiler zu sein und konnte als chromatographisch reines, amorphes Pulver isoliert werden.

EIGENSCHAFTEN DER FRUCTURON- UND TAGATURON-AMINOSÄUREN

Fructuron- und Tagaturon-Aminosäuren besitzen die für Amadori-Verbindungen typischen reduzierenden Eigenschaften. In kristallisierter Form sind sie stabil, amorph halten sie hartnäckig Lösungsmittel zurück, sie sind hygroskopisch, thermisch instabil und können in leicht zersetzliche Sirupe übergehen.

Im Verhalten gegen Wasser, Säuren und Alkalien ergeben sich einmal zwischen den Fructuron- und Tagaturon-Aminosäuren, zum anderen zwischen den verschiedenen

Aminosäuren am Zuckerrest nur graduelle Unterschiede. Verdünnte Natronlauge führt in jedem Fall binnen weniger Minuten zur völligen Zersetzung der Amadori-Zucker. Gegenüber Wasser, 1 *n* Essig- oder Salzsäure sind die Zucker-Aminosäureverbindungen bei 20° relativ beständig. 20-proz. Salzsäure bewirkt bei 20° in wenigen Stunden deutlich nachweisbare Zersetzung, bei 80° erfolgt innerhalb von 2 Stdn. völliger Abbau. Wasser und Essigsäure zeigen bei 80° im allgemeinen geringere Einwirkungen, doch sind Zersetzungsprodukte und Spaltungsprodukte nach 2 Stdn. in den meisten Fällen deutlich nachweisbar.

Die Fructuron-Aminosäuren sind stabiler als die Tagaturon-Aminosäuren. Im Hinblick auf die Aminosäurekomponente scheinen die Derivate einfacher Aminosäuren, wie Glycin und Alanin, die größte Stabilität zu besitzen. Besonders gut darstellbare Uron-Aminosäuren, wie die des Valins und Phenylalanins, sind wesentlich zersetzlicher. Aus dem Verhalten der Fructuron-Lysine ergibt sich, daß vorzugsweise Zersetzung und Spaltung des Zuckerrestes an der α -Aminogruppe eintritt, der ϵ -Aminozucker ist erheblich beständiger.

Tab. 2. Verhalten von D-Fructuron-DL-Alanin und D-Tagaturon-DL-Alanin bei 80° gegen Wasser, Säuren und Alkalien

Min.	Fructuron-DL-Alanin			Tagaturon-DL-Alanin		
	30	60	120	30	60	120
Wasser	—	—	+	+	++	++
20-proz. Salzsäure	+	++	+++	++++	++++	++++
1 <i>n</i> HCl	(—)	++	+++	+++	++++	++++
1 <i>n</i> Essigsäure	—	—	—	—	++	++
0.5 <i>n</i> NaOH	++++	++++	++++	++++	++++	++++
— keine Einwirkung						
+ geringe Zersetzung oder Spaltung						
++ teilweise Zersetzung oder Spaltung						
+++ weitgehende Zersetzung oder Spaltung						
++++ völlige Zersetzung oder Spaltung, keine Ausgangssubstanz mehr vorhanden						

Die Infrarotspektren der untersuchten Fructuron-Aminosäuren ließen mit Ausnahme des ϵ -D-Fructuron-L-Lysins alle deutlich die Carbonylbanden bei 5.76 μ (1736/cm) erkennen. Sie liegen demnach in der offenen Carbonylform vor. Das ϵ -Fructuron-L-Lysin ähnelt wegen seines beträchtlichen Abstandes der Aminogruppe von der Carbonylgruppe den *N*-Alkyl-isoglucosaminuronsäuren. Diese treten in der Furanoseform auf²⁾, und das Fehlen der Carbonylbande beim ϵ -Fructuron-Lysin läßt gleichfalls auf die Halbacetalform schließen.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

D-Fructuron-L-Valin: 3.0 g *L-Valin* wurden unter Erwärmen in 1.2 l 80-proz. Methanol gelöst und mit 10.0 g *Na-Glucuronat* 7 Stdn. auf dem Wasserbad unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Hierbei wurde der Ansatz tiefgelb und das *Na-Glucuronat* ging langsam in Lösung. Diese wurde i. Vak. nahezu zur Trockne eingedampft, der Rückstand mit etwas Wasser aufgenommen und auf eine mit 350 ccm Ionenaustauscher Lewatit S-100 (H[⊕]) beschickte Säule gegeben. Nach Waschen mit 1.0 l Wasser wurde das adsorbierte Fructuron-Valin mit 0.25 *n* Trichloressigsäure (TCE) eluiert. Nach einem Vorlauf von 120 ccm wurden 1200 ccm einer mit *o*-Dinitrobenzol positiven Fraktion erhalten. Aus diesem positiven Eluat wurde die TCE in der Apparatur nach KUTSCHER-STEUDEL mit Äther extrahiert und die wäbr. Lösung i. Vak. bei 30–35° zur Trockne eingedampft. Durch mehrfaches Aufnehmen mit Methanol und Eindampfen i. Vak. wurden die letzten Wasserreste entfernt und die zurückbleibende trockene sirupöse Masse in 100 ccm Methanol gelöst. Die methanol. Lösung wurde mit etwas *n*-Butanol versetzt, ohne daß eine Trübung auftrat, und i. Vak. vorsichtig eingeeengt. Es schieden sich hierbei 0.5 g einer leicht gelblichen Kristallkruste aus, bei weiterem Einengen fielen 1.0 g eines farblosen, feinkristallinen Pulvers an. Die Substanzen wurden abgesaugt, mit etwas Methanol, dann Methanol/Aceton (1:1) gewaschen und über P₂O₅ getrocknet. Die Mutterlauge lieferte beim Eindunsten in 14 Tagen 0.2 g farblose Säulen von 1–2 mm Länge. Gesamtausb. 1.7 g (23% d. Th.); Schmp. 165° (Zers.); $[\alpha]_D^{25}$: +30.8° (*c* = 1, in Wasser), keine Mutarotation.

C₁₁H₁₉NO₈ (293.3) Ber. C 45.04 H 6.54 N 4.78 Gef. C 45.05 H 6.55 N 4.69

D-Fructuron-L-Phenylalanin: Die Suspension von 5.0 g *L-Phenylalanin* in 1.0 l siedendem Methanol wurde mit 10.0 g *Na-Glucuronat* 2½ Stdn. auf dem Wasserbad unter Rückfluß erhitzt. Die entstandene goldgelbe Lösung wurde i. Vak. eingeeengt, der Rückstand mit etwas Wasser aufgenommen und auf eine Ionenaustauschersäule mit 350 ccm Lewatit S-100 (H[⊕]) gegeben. Die überschüssige Glucuronsäure und saure bzw. neutrale Zersetzungsprodukte wurden mit 600 ccm Wasser herausgewaschen, anschließend mit 1.0 l 0.2 *n* TCE, dann 2.0 l 0.4 *n* TCE eluiert. Nach einem negativen Vorlauf von 1200 ccm wurden 1500 ccm einer Amadori-Zucker enthaltenden Fraktion gewonnen. Die TCE wurde durch Ausäthern im Kutscher-Steudel-Apparat aus dem Eluat entfernt, die Lösung i. Vak. zur Trockne eingedampft, mit etwas Methanol aufgenommen, mit Isopropylalkohol versetzt, vorsichtig eingeeengt, bis die ersten Anteile ausfielen, diese eben wieder mit Methanol in Lösung gebracht und im offenen Erlenmeyer bei Raumtemperatur 48 Stdn. stehengelassen. Die abgeschiedenen winzigen Nadeln wurden abfiltriert, mit etwas Methanol, dann Methanol/Aceton (1:1) gewaschen und über P₂O₅ i. Vak. getrocknet (1.7 g). Die gelatinös erstarrte Mutterlauge wurde in Methanol aufgenommen. Durch Fällung mit Äther wurden noch 2.0 g amorphes und nicht ganz reines *Fructuron-Phenylalanin* gewonnen. Gesamtausb. 3.7 g (35.7% d. Th.). Schmp. 139–141° (Zers.); $[\alpha]_D^{25}$: +21.7° (*c* = 1, in Wasser), keine Mutarotation.

C₁₅H₁₉NO₈ (341.4) Ber. C 52.78 H 5.62 N 4.10 Gef. C 52.71 H 6.04 N 4.17

D-Fructuron-L-Prolin: Einer siedenden Suspension von 3.0 g *L-Prolin* in 1.0 l Methanol wurden auf dem Wasserbad 10.0 g *Na-Glucuronat* zugefügt. Da im Verlauf einer Stunde nur ein Teil in Lösung ging, wurden zum Ansatz 200 ccm Wasser gegeben und 6 Stdn. weiter unter Rückfluß gekocht, wobei sich eine goldgelbe Lösung bildete. Nach Eindampfen i. Vak. zur Trockne wurde der Rückstand mit etwas Wasser aufgenommen und auf eine Austauschersäule mit 350 ccm Lewatit S-100 (H[⊕]) gegeben. Die nicht umgesetzte Glucuronsäure und die Huminstoffe wurden mit 500 ccm Wasser entfernt und anschließend mit 0.25 *n* TCE die Amadori-Verbindung eluiert. Nach 150 ccm Vorlauf wurden 400 ccm positive Fraktion erhalten,

die wie vorstehend zur Entfernung der TCE ausgeäthert und anschließend i. Vak. zur Trockne eingedampft wurde. Der Rückstand wurde mit absol. Methanol aufgenommen. Eine Kristallisation ließ sich nicht erreichen. Durch Äther wurde eine geringe Vorfällung mit Verunreinigungen entfernt, die Hauptmenge wurde mit Isopropylalkohol gefällt, wobei 0.86 g (11.3% d. Th.) als weißes Pulver erhalten wurden. Schmp. 110° (Zers.), $[\alpha]_D^{25}$: -31.9° ($c = 1$, in Wasser).

$C_{11}H_{17}NO_8$ (291.3) Ber. C 45.36 H 5.90 N 4.81 Gef. C 45.08 H 6.28 N 4.69

D-Fructuron-L-Asparagin: Die in der Siedehitze mit 10.0 g *Na-Glucuronat* versetzte Suspension von 3.0 g *L-Asparagin* in 350 ccm 70-proz. Methanol wurde 5½ Stdn. unter Rühren im Sieden gehalten, wobei Lösung und Verfärbung eintrat. Die Lösung wurde i. Vak. zur Trockne eingedampft, der Rückstand mit etwas Wasser aufgenommen und auf eine Austauschersäule mit 250 ccm Lewatit S-100 (H[⊕]) gegeben. Nach Waschen mit 1.0 l Wasser wurde mit 0.25 n TCE eluiert. Hierbei wurden 150 ccm negativer Vorlauf, 300 ccm positive Hauptfraktion und 150 ccm sehr verdünnter Nachlauf, der verworfen wurde, erhalten. Die TCE wurde nach KUTSCHER-STEUDEL ausgeäthert, die Lösung i. Vak. zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 750 ccm Methanol aufgenommen. Hierbei blieb ein beim Eindampfen bereits kristallin ausgefallener Teil des Rückstandes ungelöst (1.4 g), der chromatographisch rein war. Aus der methanol. Lösung kristallisierten beim Einengen 0.27 g reines Produkt als feines Kristallpulver, aus der Mutterlauge wurden nach längerem Stehenlassen nochmals 0.75 g grobkristalline Verbindung gewonnen. Die Kristalle wurden mit Methanol, dann Methanol/Aceton (1:1) gewaschen. Gesamtausbe. 2.4 g (31.4% d. Th.). Das aus Methanol auskristallisierte Produkt enthielt 1 Mol. Kristallalkohol.

$C_{10}H_{16}N_2O_9 \cdot CH_3OH$ (340.3) Ber. C 38.82 H 5.93 N 8.23 Gef. C 38.64 H 5.59 N 8.16

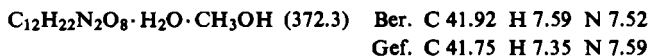
Nach Trocknen bei 57° über P₂O₅ wurde die methanolfreie Verbindung erhalten. $[\alpha]_D^{20}$: $+1.2^\circ$ ($c = 1$, in Wasser), keine Mutarotation.

$C_{10}H_{16}N_2O_9$ (308.3) Ber. C 38.96 H 5.24 N 9.09 Gef. C 39.10 H 5.32 N 8.99

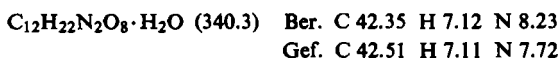
ε-D-Fructuron-L-Lysin: 15.0 g *L-Lysin-HCl* (0.082 Mol) wurden in 2.0 l 75-proz. Methanol unter Rühren und Erhitzen gelöst und mit 30.0 g *Na-Glucuronat* 2 Stdn. unter Rückfluß gekocht, wobei *Na-Glucuronat* unter Goldgelbfärbung in Lösung ging. Chromatographisch wurden neben nicht umgesetzter Glucuronsäure zwei Amadori-Verbindungen mit *o*-Dinitrobenzol und AgNO₃ gefunden; α,ϵ -Di-D-Fructuron-L-Lysin und ϵ -D-Fructuron-L-Lysin, dem der etwas schneller laufende Fleck entsprach. α -Fructuron-Lysin war nicht vorhanden. Der Ansatz wurde i. Vak. zur Trockne eingeengt, mit etwas Wasser aufgenommen und auf eine Ionenaustauschersäule mit 600 ccm Dowex 50 (H[⊕]) gegeben. Nach Waschen mit 1.5 l Wasser wurde mit 500 ccm 0.75 n TCE, darauf mit 1.0 n TCE eluiert. Nach einem negativen Vorlauf von 200 ccm wurden in 300 ccm α,ϵ -Di-D-Fructuron-L-Lysin, unmittelbar danach in 1150 ccm ϵ -D-Fructuron-L-Lysin erhalten. Die zweite Fraktion wurde nach KUTSCHER-STEUDEL ausgeäthert und i. Vak. zur Trockne eingedampft, der sirupöse Rückstand mehrfach mit Methanol wieder aufgenommen und die Lysinverbindung mit Äther ausgefällt. Abgesaugt und getrocknet wurden 6.45 g chromatographisch fast reines, aber noch natriumsalzhaltiges Rohprodukt erhalten.

Dieses wurde erneut auf eine Säule mit 300 ccm Dowex 50 (H[⊕]) gegeben, mit 600 ccm Wasser gewaschen und mit TCE zunehmender Konzentration (0.25—1.0 n) eluiert. Nach einem negativen Vorlauf von 475 ccm wurden 750 ccm positive Fraktion erhalten, die wie vorstehend ausgeäthert und eingedampft wurde. Der Rückstand wurde in Methanol gelöst und mit Äther fraktioniert gefällt. Die ersten Fraktionen waren zwar bereits chromatographisch rein, ergaben aber noch 2.1—8.8% Verbrennungsrückstände. Die letzten Fraktionen wurden in Methanol gelöst, mit etwas *n*-Butanol versetzt und vorsichtig eingeengt, bis eben Eintrübung ein-

trat, diese mit etwas Methanol beseitigt und die Lösung im offenen Kolben stehengelassen. In 2—3 Wochen wuchsen aus der Lösung große Drusen von 2—3 mm langen Säulen. Das verdunstete Methanol wurde hierbei von Zeit zu Zeit ergänzt, um ein völliges Eintrocknen zu vermeiden. Die Kristalle wurden mit etwas Methanol gewaschen und kurz über P_2O_5 i. Vak. getrocknet. Ausbeute an Kristallen 0.2 g, aus der Mutterlauge wurde noch eine Nachkristallisation von 0.45 g gewonnen. Die Kristalle entsprachen einem Monohydrat mit 1 Mol. Kristallalkohol. $[\alpha]_D^{25}$: +22.1° ($c = 1$, in Wasser), keine Mutarotation.

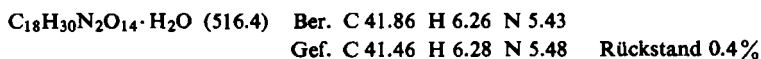


Das Kristallmethanol entweicht bei 37° über P_2O_5 , während das Kristallwasser auch bei 57° über P_2O_5 festgehalten wird.



Aus der ersten Fraktion (300 ccm) der ersten Trennung lassen sich durch entsprechende Aufarbeitung 3.75 g α,ϵ -Di-D-Fructuron-L-Lysin allerdings nicht alkalischfrei gewinnen. Günstiger ist die Darstellung dieser Verbindung aus freier D-Glucuronsäure.

α,ϵ -Di-D-Fructuron-L-Lysin: 3.0 g *Na-Glucuronat* wurden zur Gewinnung freier Glucuronsäure über eine Austauschersäule mit 300 ccm Lewatit S-100 (H^{\oplus}) gegeben. Der Durchlauf wurde i. Vak. eingedampft, mehrfach mit Methanol aufgenommen, um die letzten Wasseranteile zu entfernen. Der sirupöse Rückstand wurde in 300 ccm Methanol gelöst und mit einer Suspension von 1.0 g *L-Lysin* in 200 ccm Methanol 3 Stdn. unter Rühren und Rückfluß erhitzt. Es bildete sich vorwiegend das Difructuron-Lysin neben wenig Monofructuron-Lysin. Die Lösung wurde i. Vak. eingengt und auf eine Austauschersäule mit 250 ccm Lewatit S-100 (H^{\oplus}) gegeben, mit 1.0 l Wasser gewaschen und mit 0.66 *n* TCE eluiert. Es wurden 275 ccm negativer Vorlauf, 325 ccm chromatographisch reine Fraktion des Difructuron-Lysins und 170 ccm einer Fraktion erhalten, die Di- und Monofructuronverbindung enthielt. Die erste Fraktion (325 ccm) wurde nochmals in gleicher Weise durch Säulentrennung an Lewatit S-100 gereinigt. Nach dem Ausäthern und Einengen ließ sich aus Methanol mit Äther ein amorphes, chromatographisch reines Produkt folgender Zusammensetzung ausfällen:



$[\alpha]_D^{25}$: +27.2° ($c = 1$, in Wasser). Das Kristallwasser wurde beim Trocknen nicht abgegeben.

D-Tagaturon-DL-Alanin: Die siedende Suspension von 2.0 g *DL-Alanin* in 450 ccm absol. Methanol wurde mit 1.0 g *D-Galakturonsäure* versetzt und $3\frac{1}{2}$ Stdn. unter Rühren und Rückfluß weitergekocht, wobei völlige Lösung eintrat. Der Ansatz wurde i. Vak. eingengt, mit etwas Wasser aufgenommen und auf eine Austauschersäule mit 75 ccm Lewatit S-100 (H^{\oplus}) gegeben. Nach Waschen mit 0.5 l Wasser zur Entfernung der überschüss. Galakturonsäure und der huminartigen Stoffe wurde das *D-Tagaturon-DL-Alanin* mit 0.25 *n* TCE eluiert. Hierbei fielen 125 ccm negativer Vorlauf und 300 ccm positive Fraktion an, aus der die TCE mit Äther nach KUTSCHER-STEUEDEL extrahiert wurde. Die wäbr. Lösung wurde i. Vak. bei 30° eingedampft, mehrfach mit absol. Methanol aufgenommen, um letzte Wasseranteile zu entfernen. Der Rückstand wurde in Methanol gelöst, das Tagaturon-Alanin mit Äther fraktioniert gefällt. Die ersten Anteile wurden verworfen und die Hauptfraktion nochmals aus Methanol umgefällt. Das gefällte amorphe, sehr hygroskopische Pulver wurde schnell abgesaugt, mit absol. Alkohol, Aceton und Äther gewaschen und i. Vak. über P_2O_5 bei 37° getrocknet. Trocknen bei 57° führte zu Verfärbungen und Stickstoffverlusten.

Reste an Wasser oder Lösungsmittel werden nur schwer abgegeben. Das Produkt war chromatographisch rein. Ausb. 0.6 g (45.3 % d. Th.), Schmp. 98° (Zers.), $[\alpha]_D^{25}$: -6.1° ($c = 2$, in Wasser).

$C_9H_{15}NO_8$ (265.3) Ber. C 40.70 H 5.72 N 5.29 Gef. C 40.66 H 6.06 N 4.67

D-Tagaturon-L-Valin: 1.5 g *L-Valin* wurden unter Erwärmen in 0.5 l 80-proz. Methanol gelöst und mit 5.0 g *Na-Galakturonat* versetzt. Der Ansatz wurde unter Rühren und Rückfluß 5 Stdn. gekocht. Die braune Lösung wurde i. Vak. eingedampft, der Rückstand mit etwas Wasser aufgenommen und auf eine Ionenaustauschersäule mit 220 ccm Lewatit S-100 (H⁺) gegeben. Saure und neutrale Anteile wurden mit 0.5 l Wasser ausgewaschen und das *Tagaturon-Valin* mit 0.25 n TCE eluiert. Nach einem negativen Vorlauf von 175 ccm wurden 250 ccm positives Eluat erhalten. Die TCE wurde nach KUTSCHER-STEUDEL ausgeäthert, die wäbr. Lösung i. Vak. zur Trockne eingedampft, wiederholt mit Methanol abgedampft. Das *Tagaturon-Valin* wurde mehrmals mit Äther aus Methanol gefällt. Es ließ sich nicht zur Kristallisation bringen. Ausb. 0.13 g amorphes Pulver. Das so dargestellte *Tagaturon-Valin* enthielt immer, wie sich chromatographisch zeigen ließ, durch Rückspaltung entstandene Anteile an freiem Valin. Dies drückt sich in den zu hohen C,H und N-Werten aus. Unmittelbar nach dem Säulendurchlauf sind keine Spaltungsprodukte in dem Eluat vorhanden, erst während der Aufarbeitung werden sie gebildet, und es läßt sich Valin nachweisen.

$C_{11}H_{19}NO_8$ (293.3) Ber. C 45.04 H 6.54 N 4.70 Gef. C 46.27 H 7.46 N 5.42

ε-D-Fructuron-L-Lysin-Ni-Komplex: In die Lösung von 1.0 g *L-Lysin* in 25 ccm heißem Wasser wurde so lange frisch gefälltes *Nickelcarbonat* eingetragen, wie sich dieses löste. Die blaue Lösung des Ni-Komplexes wurde filtriert und nach Erkalten mit 50 ccm Aceton versetzt. Der Lysin-Ni-Komplex ging in die Acetonphase über und wurde im Scheidetrichter abgetrennt. Die Acetonlösung wurde mehrfach mit etwas Methanol versetzt und jeweils auf ca. 20 ccm eingengt, um das Aceton zu entfernen. Das Konzentrat des Lysin-Ni-Komplexes wurde mit 300 ccm Methanol zum Sieden erhitzt und 2.0 g *Na-Glucuronat* zugegeben. Der Ansatz wurde 2 Stdn. unter Rühren und Rückfluß gekocht. Die Lösung wurde mit 5 ccm Eisessig angesäuert, um den Ni-Komplex zu zerstören. Von dieser Lösung wurden sofort Chromatogramme angefertigt, bevor nach Zersetzung des Komplexes eine Weiterreaktion erfolgen konnte. Die Chromatogramme (siehe Abbild.) wurden mit $AgNO_3$, Ninhydrin und Dimethylglyoxim entwickelt. Das Chromatogramm 4 (Abbild.) zeigt ein Reaktionsgemisch der Umsetzung freier Glucuronsäure mit Lysin, welches alle drei Fructuron-Lysin-Verbindungen enthält. Der Reaktionsansatz 3 mit dem Lysin-Ni-Komplex enthält nur die als *ε-D-Fructuron-L-Lysin* angesprochene Verbindung und nicht entsprechendes *α-D-Fructuron-L-Lysin*. Der in Nr. 3 zwischen *ε-D-Fructuron-L-Lysin* und *D-Glucuronsäure* liegende Fleck wird dem *Fructuron-Lysin-Ni-Komplex* zugeschrieben; er reagiert mit Ninhydrin und $AgNO_3$ positiv und fluoresziert stark im UV-Licht. Er wurde von drei Chromatogrammen ausgeschnitten, verascht, die

	1	2	3	4	5
<i>α,ε</i> -Difructuron-L-Lysin	→	○		○	
<i>ε-D-Fructuron-L-Lysin</i>	→	○	○	○	
			○	←	<i>α-D-Fructuron-L-Lysin</i>
			○	○	<i>ε-D-Fructuron-L-Lysin-Ni-Komplex</i>
					← <i>D-Glucuronsäure</i>

Vergleichschromatogramme zur Identifizierung des Monofructuron-Lysins

- 3 Reaktionsgemisch der Umsetzung des Lysin-Ni-Komplexes mit *Na-Glucuronat*
- 4 Reaktionsgemisch der Umsetzung von freier Glucuronsäure mit Lysin in absol. Methanol, bei dem alle drei Lysinverbindungen entstanden.

Asche mit etwas Königswasser abgeraucht, mit Essigsäure aufgenommen und mit Dimethylglyoxim Nickel nachgewiesen.

Die *papierchromatographischen Untersuchungen* wurden durchgeführt auf Schleicher & Schüll-Papier Nr. 602, h:p, mit einem Gemisch aus n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5), von dem nach Mischung die obere butanolische Phase als Chromatographiergemisch benutzt wurde. Bei absteigender Chromatographie zeigten die erhaltenen Verbindungen folgende R_F -Werte (entwickelt mit ammoniakalischem Silbernitrat, Ninhydrin oder mit einem Gemisch aus 1 n methanol. KOH und 1-proz. äthanol. o-Dinitrobenzollösung (2:1).

Verbindung	R_F -Wert	Verbindung	R_F -Werte
D-Glucuronsäure	0.15	D-Fructuron-L-Asparaginsäure	0.08
D-Galakturonsäure	0.14	D-Fructuron-L-Glutaminsäure	0.10
D-Fructuron-Glycin	0.07	D-Tagaturon-DL-Alanin	0.14
D-Fructuron-L-Alanin	0.13	D-Tagaturon-L-Valin	0.32
D-Fructuron-L-Valin	0.34	D-Tagaturon-L-Leucin	0.42
D-Fructuron-L-Leucin	0.44	ϵ -D-Tagaturon-L-Lysin	0.05
D-Fructuron-L-Phenylalanin	0.48	α -D-Tagaturon-L-Lysin	0.06
D-Fructuron-L-Prolin	0.16	α,ϵ -Di-D-Tagaturon-L-Lysin	0.02
D-Fructuron-DL-Serin	0.07	ϵ -D-Fructuron- α -D-Tagaturon-L-Lysin	0.02
D-Fructuron-DL-Threonin	0.11	D-Tagaturon-L-Arginin	0.08
D-Fructuron-L-Arginin	0.10	D-Tagaturon-L-Phenylalanin	0.47
ϵ -D-Fructuron-L-Lysin	0.05	D-Tagaturon-DL-Serin	0.07
α -D-Fructuron-L-Lysin	0.06	D-Tagaturon-DL-Threonin	0.10
α,ϵ -Di-D-Fructuron-L-Lysin	0.03	D-Tagaturon-Pseudoleucin	0.42
D-Fructuron-L-Asparagin	0.09	D-Tagaturon-L-Glutaminsäure	0.09