

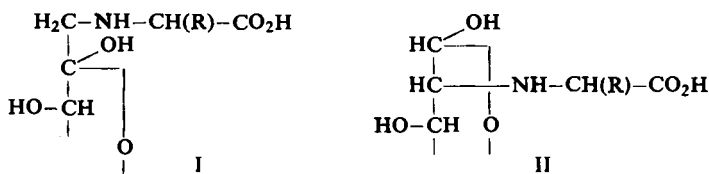
KURT HEYNS und HELMUT NOACK

Die Umsetzung von D-Fructose mit L-Lysin und L-Arginin und deren Beziehung zu nichtenzymatischen Bräunungsreaktionen¹⁾

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

Die Umsetzung von D-Fructose mit L-Lysin liefert α,ϵ -Di-D-Glucose-L-Lysin, ϵ -D-Glucose-L-Lysin und ϵ -D-Fructose-L-Lysin. Aus Fructose und L-Arginin werden α -D-Glucose-L-Arginin und α -D-Fructose-L-Arginin erhalten. Die Umsetzung von D-Glucose mit L-Lysin ergibt α,ϵ -Di-D-Fructose-L-Lysin und ϵ -D-Fructose-L-Lysin. — α -D-Fructose-L-Lysin ist durch Umsetzung von ϵ -Carbobenzoxy-L-Lysin mit D-Glucose und anschließende Abspaltung des Restes erhältlich. Bei Proteinen reagiert die ϵ -Aminogruppe des L-Lysins in gleicher Weise zu Hexose-Aminosäure. Die Guanidinogruppe des Arginins reagiert nicht.

Bei der als „nichtenzymatische Bräunungsreaktion“ gekennzeichneten „Maillard-Reaktion“ entstehen durch Umsetzung von Aminosäuren oder Aminen mit Kohlenhydratkomponenten über komplizierte Reaktionsfolgen stark braun gefärbte Produkte in mehr oder weniger großen Anteilen^{2,3)}. In erster Stufe reagiert dabei der Aminogruppendonator mit der reduzierenden Aldehyd- oder Ketogruppe des Kohlenhydrats. Glucose bildet mit Aminosäuren zunächst ein *N*-Glykosid, das unter Amadori-Umlagerung zu 1-*N*-Aminosäure-1-desoxy-D-fructose (I), kurz „Fructose-Aminosäure“ genannt, umgewandelt wird. Fructose bildet entsprechend eine Ketosyl-Aminosäure, die unter Ketosylamin-Umlagerung vorwiegend in 2-*N*-Aminosäure-2-desoxy-D-glucose (II), kurz „Glucose-Aminosäure“ genannt, übergeht.



In Proteinen liegen freie Aminogruppen in den Endgruppen und als ϵ -Aminogruppen des eingebauten Lysins vor (in Gelatine z. B. 8% als Endgruppe und 92% als ϵ -Aminogruppe).

UMSETZUNGEN MIT LYSIN

Modellreaktionen mit Lysin sind im Hinblick auf die Vorgänge bei den Bräunungsreaktionen von Bedeutung, insbesondere, da gefunden wurde, daß basische Aminosäuren sehr viel schneller mit Monosacchariden reagieren als alle anderen Aminosäuren. Ferner ist es wichtig, festzustellen, ob Lysin dabei zerstört wird oder nicht.

¹⁾ Vorhergehende Mitteil.: K. HEYNS, H. PAULSEN und H. SCHROEDER, Tetrahedron [London] 13, 247 [1961].

²⁾ G. P. ELLIS, Advances Carbohydrate Chem. 14, 63 [1959].

³⁾ J. E. HODGE, Advances Carbohydrate Chem. 10, 169 [1955].

Die Umsetzung der Na-Salze des Lysins mit Glucose führt nach F. MICHEEL und A. KLEMER⁴⁾ zu einer *N*-Glucosylverbindung. Lysin-hydrochlorid, in Methanol mit Glucose erhitzt, ergibt nach H. BORSOOK⁵⁾ eine Verbindung, deren Eigenschaften und Analyse mit den für Monofructose-Lysin erwarteten übereinstimmt, jedoch ist nicht nachgewiesen, welche der beiden primären Aminogruppen des Lysins mit Glucose reagiert hat.

Wir fanden, daß Lysin-dihydrochlorid sich mit Glucose beim Erhitzen in Methanol sehr leicht zu stabilen Fructose-Aminosäure-Verbindungen umsetzt, wobei stets ein Gemisch von Mono- und Di-Fructose-Lysin erhalten wurde. Bei längerer Reaktionszeit ließ sich das Mono-Produkt vollständig in das Di-Produkt umwandeln. Eine leichte Trennung des Mono-, Di-Produktes und der Ausgangsstoffe war mittels Ionenaustauscher-Säulenchromatographie möglich, da sich nach unserer Erfahrung alle drei Substanzen entgegen den Angaben BORSOOKS⁵⁾ vollständig getrennt von Dowex 50 eluieren lassen.

Bei neutralen Aminosäuren haben wir gezeigt⁶⁾, daß ω -Aminogruppen, wie sie in der ϵ -Amino-capronsäure, γ -Amino-buttersäure und im β -Alanin vorliegen, schneller als α -Aminogruppen reagieren. Für das bei der Umsetzung von Glucose mit Lysin isolierte Mono-Produkt war demnach eine an der ϵ -Aminogruppe des Lysins substituierte Verbindung zu erwarten. Zum Vergleich wurde die an der α -Aminogruppe des Lysins substituierte Hexose-Verbindung durch Umsetzung von ϵ -Carbobenzoxy-L-lysin mit Glucose dargestellt. Das auf diesem Wege erhaltene α -Fructose- ϵ -Carbobenzoxy-L-lysin lieferte nach Abhydrierung des Carbobenzoxyrestes α -Fructose-L-Lysin, welches chromatographisch gegenüber dem direkt aus Glucose und L-Lysin erhaltenen ϵ -Fructose-L-Lysin Unterschiede im R_F -Wert und in der Anfärbbarkeit mit Ninhydrin aufwies. Auch nach der von P. O. LARSEN und A. KJAER⁷⁾ angegebenen Methode zur Unterscheidung zwischen α -Aminosäuren und anderen ninhydrinpositiven Substanzen auf Papierchromatogrammen ließen sich α -Fructose-L-Lysin und ϵ -Fructose-L-Lysin im gleichen Sinne zuordnen. Dieser Befund konnte von K. HEYNS und W. SCHULZ⁸⁾ bei der Umsetzung von L-Lysin mit Glucuronsäure bestätigt werden.

Die Umsetzung von Fructose mit L-Lysin-dihydrochlorid führt zu einem Gemisch von Mono- und Di-Hexose-Lysin-Verbindungen. Die Reaktion greift primär ebenfalls an der ϵ -Aminogruppe des Lysins unter Bildung des entsprechenden *N*-Fructosids an, welches unter Ketosylaminumlagerung in die beiden erwarteten Isomeren ϵ -Glucose-L-Lysin und ϵ -Mannose-L-Lysin übergeht. Daneben wird auf einem noch nicht geklärten Wege ϵ -Fructose-L-Lysin gebildet, welches direkt nur aus Glucose und Lysin darstellbar ist. Alle drei Monohexose-Lysin-Verbindungen können mit weiterer Fructose an der noch freien α -Aminogruppe des Lysins zu entsprechenden *N*-Fructosiden reagieren, die durch Ketosylaminumlagerung ein Gemisch von gleichsinnig oder gemischt substituierten Dihexose-Lysin-Verbindungen liefern, dessen Auf-

4) Chem. Ber. 89, 1242 [1956].

5) H. BORSOOK, A. ABRAMS und P. LOWY, J. Amer. chem. Soc. 77, 4794 [1955].

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

7) Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 38, 148 [1960]; Angew. Chem. 72, 388 [1960].

8) Chem. Ber. 95, 709 [1962], vorstehend.

trennung in Einzelkomponenten schwierig ist. Eine Einschränkung der zahlreichen Isomeren läßt sich dadurch erreichen, daß die Reaktion in Dimethylsulfoxyd durchgeführt wird, da in diesem Lösungsmittel die Ketosylumlagerung zu Mannose-Aminosäuren nahezu vollständig unterdrückt ist. In Dimethylsulfoxyd entsteht bevorzugt ϵ -Glucose-L-Lysin neben ϵ -Fructose-L-Lysin und als disubstituiertes Produkt hauptsächlich α,ϵ -Diglucose-L-Lysin neben wenig gemischt-substituiertem Glucose-Fructose-Produkt und wenig α,ϵ -Difructose-L-Lysin.

Das erhaltene Gemisch von Mono- und Dihexose-Lysin-Verbindungen kann durch Säulenchromatographie an Ionenaustauschern durch Elution mit Trichloroessigsäure aufgetrennt werden. Von den zuerst eluierten Dihexose-Lysin-Verbindungen fand sich α,ϵ -Diglucose-L-Lysin in den ersten Fraktionen; es konnte nach erneuter Austauschertrennung als analysenreines amorphes Pulver isoliert werden. Anschließend wurden die monosubstituierten Produkte in der Reihenfolge Mannose-, Glucose- und Fructose-Lysin eluiert. Letzteres war identisch mit der durch Umsetzung von Glucose mit Lysin dargestellten Substanz. Die Verbindung reduziert in der Kälte eine alkalische Lösung von Kaliumhexacyanoferrat(III) und gibt mit *o*-Dinitrobenzol, die für Amadori-Produkte charakteristische Blaufärbung. ϵ -Glucose-L-Lysin und ϵ -Mannose-L-Lysin werden durch $2n$ Essigsäure bei 100° in Lysin und Fructose gespalten, eine für Aldose-Aminosäuren charakteristische Reaktion. Die Zuordnung beider Isomere erfolgte auf Grund ihrer spezif. Drehung durch Vergleich mit den einfachen Aminozuckern.

Vergleich der spezif. Drehwerte der Hexose-L-Lysin- und L-Arginin-Verbindungen mit den entsprechenden Aminozuckern

ϵ -Glu-L-Lys $\cdot 2\text{HCl}$	+42°	α -Glu-L-Arg	+25°	D-Glucosamin $\cdot \text{HCl}$	+72.5°
ϵ -Man-L-Lys $\cdot 2\text{HCl}^{*)}$	$\sim +10^\circ$	α -Man-L-Arg $^{*)}$	$\sim +3^\circ$	D-Mannosamin $\cdot \text{HCl}$	-5.2°
ϵ -Fru-L-Lys $\cdot 2\text{HCl}$	-28°	α -Fru-L-Arg	-13°	D-Isoglucosamin $\cdot \text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$	-59°

^{*)} α -Mannose-Aminosäure wurde nicht analysenrein isoliert.

Mono-hexose-L-Lysin-Verbindungen sind als Mono- und Dihydrochloride nur wenig haltbar. Sie neigen zur schnellen Bräunung und zerfließen alsbald zu einem Sirup. Bei längerem Aufbewahren zersetzt sich der Sirup und ergibt einen weiteren ninhydrinpositiven, reduzierenden, schneller laufenden Fleck. Die in der Monoverbindung noch vorhandene freie Aminosäuregruppierung dürfte in der Lage sein, eine Rückumlagerung zu katalysieren und die Labilität der Verbindung zu fördern. Ist die zweite Aminogruppe ebenfalls mit einem Hexoserest besetzt, wie z. B. beim α,ϵ -Diglucose- oder α,ϵ -Difructose-L-Lysin, so erhält man eine stabile, nur noch schwach hygroskopische Verbindung.

F. MICHEEL und A. KLEMER⁹⁾ erhielten durch Umsetzung von Glucose mit Gelatine bzw. Pferdeserumalbumin ein Produkt, welches 1.4% nicht hydrolysierbare Kohlenhydrate enthielt. Nach unseren Ergebnissen bei der Umsetzung mit L-Lysin ist anzunehmen, daß Glucose mit den freien ϵ -Aminogruppen des Lysins zu ϵ -Fructose-L-Lysin reagiert und demnach ϵ -Fructose-L-Lysin-Bausteine in die Proteinkette eingefügt werden.

⁹⁾ Chem. Ber. 89, 1238 [1956]; 85, 1083 [1952].

K. HEYNS und M. ROLLE¹⁰⁾ fanden bei der Umsetzung von Gelatine mit Fructose unter verschiedenen Bedingungen, daß in Dimethylsulfoxyd 50–60% und in Eisessig 15% der ϵ -Aminogruppen des Lysins unter Ketosylaminumlagerung zu ϵ -Glucose-L-Lysin reagieren. Das ϵ -Glucose-L-Lysin wird damit ein Baustein des auf diese Weise veränderten Proteins. Die saure Hydrolyse dieses Proteins liefert dann als Spaltstück freies ϵ -Glucose-L-Lysin, welches mit dem direkt aus Fructose und L-Lysin dargestellten Produkt identisch ist.

Damit ist erwiesen, daß die ϵ -Aminogruppen in Proteinen mit Fructose in der gleichen Weise wie einfache Aminosäuren unter Ketosylaminumlagerung zu entsprechenden Glucose-Aminosäure-Resten reagieren können. Mit Glucose dürfte eine entsprechende Umsetzung zu Fructose-Aminosäure-Resten erfolgen.

UMSETZUNGEN MIT ARGININ

BORSOOK⁵⁾ erhielt aus L-Arginin·HCl und Glucose in Methanol ein Fructose-L-Arginin, bei dem die Art der Bindung der Kohlenhydratkomponente nicht bekannt ist; nach K. MAEKAWA und K. ISHIMOTO¹¹⁾ soll die α -Aminogruppe des Arginins die Bindung vermitteln.

Wir erhielten bei der Umsetzung von L-Arginin·HCl mit D-Fructose in Methanol als Hauptprodukte α -Glucose-L-Arginin und α -Mannose-L-Arginin neben wenig α -Fructose-L-Arginin. Mit der Verlängerung der Reaktionszeit nimmt die Menge an α -Fructose-Verbindung zu. Dies deutet darauf hin, daß diese Verbindung durch eine Sekundärreaktion von α -Glucose-L-Arginin und α -Mannose-L-Arginin mit überschüssigem L-Arginin über eine zweite, einer Amadori-Umlagerung ähnliche Reaktion gebildet wird. In Dimethylsulfoxyd führt die Umsetzung von L-Arginin mit D-Fructose fast ausschließlich zu α -Glucose-L-Arginin.

Durch eine kombinierte Säulentrennung an Austausch- und Cellulosesäulen ließen sich reines α -Glucose-L-Arginin und α -Fructose-L-Arginin isolieren. Letztere Verbindung war identisch mit dem nach BORSOOK⁵⁾ erhältlichen Produkt und gibt alle für Amadori-Verbindungen charakteristischen Reaktionen. α -Glucose-L-Arginin und α -Mannose-L-Arginin zeigten die für eine Rückumlagerung typische Aufspaltung durch 2*n* Essigsäure zu Fructose und Arginin. Die Zuordnung der Verbindung erfolgte wie beim Lysin durch Vergleich der spezifischen Drehungen mit denen der einfachen Aminozucker (s. Tabelle). Die Verbindungen sind schwach hygroskopisch und bedeutend unbeständiger als die Lysinderivate. Beim Aufbewahren als getrockneter Sirup oder beim Stehenlassen der Lösung bzw. der Suspension nach der Fällung bei Raumtemperatur entsteht Arginin. Die Aldose-Arginin-Verbindungen bilden daneben in einer echten Rückspaltung Fructose, während das Fructosederivat andere silbernitratpositive Substanzen bildet. Die von MAEKAWA und ISHIMOTO¹¹⁾ beschriebene Säurehydrolyse der Fructose-Verbindung in Arginin und Fructose können wir nicht bestätigen. Hält man ein Gemisch von Aldose-Arginin und Arginin in Dimethylsulfoxyd unter den Bildungsbedingungen, so kann man Fructose-Arginin nachweisen.

Zur Klärung der Struktur der erhaltenen Hexose-Arginin-Verbindungen haben wir α -Glucose-L-Arginin und α -Fructose-L-Arginin mit Arginase bei pH 9.2 behandelt.

¹⁰⁾ Chem. Ber. **92**, 2439 [1959].

¹¹⁾ J. chem. Soc. Japan, pure Chem. Sect. **80**, 565 [1959]; C. **1960**, 11308.

Als Spaltprodukte wurden bei beiden Verbindungen Harnstoff erhalten. Die Glucose-Verbindung lieferte ferner als zweites Spaltstück α -Glucose-L-Ornithin, die Fructose-Verbindung entsprechend α -Fructose-L-Ornithin. Damit ist gezeigt, daß bei den Hexose-Arginin-Verbindungen die Kohlenhydratkomponente an der α -Aminogruppe des Arginins gebunden ist.

Diese Umsetzungen sind von Bedeutung für die Beurteilung der biologischen Wertigkeit des Nahrungseiweißes bezüglich seines Lysingehaltes¹²⁾, da Lysin als essentielle Aminosäure im Eiweiß des Getreides und der Kartoffel in suboptimaler Menge vorkommt. Bei der Verarbeitung der Nahrungsmittel kann ein erheblicher Teil des Lysins in der oben beschriebenen Weise verändert werden. Ein Teil dieses Lysins wird der Weiterreaktion unter Bräunung unterliegen, wobei nach S. SENTESHANMUGANATHAN und A. A. HOOVER¹³⁾ weitgehende Zerstörung eintritt. Die im Proteinverband noch verbleibenden Hexose-Aminosäure-Reste, die wahrscheinlich einen erheblichen Teil des Lysins binden, setzen bei der enzymatischen Hydrolyse des Gesamtproteins bei der Verdauung ϵ -Glucose-L-Lysin und ϵ -Fructose-L-Lysin in Freiheit. Es ist bisher nicht geklärt, ob es Enzyme gibt, die diese Hexose-Aminosäuren spalten und evtl. über einen Rückumlagerungsmechanismus das Lysin für den Organismus verwertbar machen können oder ob es durch diese Reaktion mit dem Kohlenhydratrest verloren geht.

Die Guanidinogruppen des Arginins reagierten unter den angegebenen Versuchsbedingungen nicht mit Hexosen. Es ist daher keine Reaktion des in der Proteinkette gebundenen Arginins mit Kohlenhydraten zu erwarten, sondern erst nach der hydrolytischen Freisetzung des Arginins.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Alle Reaktionen wurden papierchromatographisch auf Schleicher & Schüll-Papier 602 h:p verfolgt; die Chromatogramme der Lysinderivate wurden absteigend unter Verwendung von n-Butanol/Eisessig/Wasser (70:7:23) 3–4 Tage, die der Arginin-Verbindung in Pyridin/Amylalkohol/Wasser (40:30:37) 2–3 Tage entwickelt. Angefärbt wurde durch Besprühen mit ammoniakal. Silbernitrat-Lösung, Ninhydrin in wassergesätt. n-Butanol, nach der Methode von P. G. W. SMITH¹⁴⁾ mit Chlor/o-Toluidin und mit Kalium-perjodatocuprat¹⁵⁾.

Zur Isolierung der Produkte aus den TCE-haltigen Lösungen wurde im Extraktionsapparat nach KUTSCHER und STEUDEL mit Äther extrahiert, i. Vak. eingengt, im Falle der Lysinverbindung mit 0.5 ccm konz. Salzsäure versetzt und erneut extrahiert. Nach Einengen zum Sirup wurde mit Tierkohle behandelt. Aus methanol. Lösung fiel durch Versetzen mit Isopropylalkohol bis zur Trübung und anschließende Ätherzugabe ein weißer amorpher Niederschlag, der meist durch erneute fraktionierte Fällung analysenrein erhalten wurde. Auch die pyridin- und amyalkoholhaltigen Lösungen wurden nach Zugabe einer entsprechenden Menge Wasser im Extraktionsapparat mit Äther extrahiert und, wie oben beschrieben, aufgearbeitet. Ein längeres Stehenlassen bei Raumtemperatur sollte vermieden werden.

Hexose-L-Lysin-Verbindungen in Dimethylsulfoxyd

4.6 g L-Lysin-dihydrochlorid und 45 g gut getrocknete D-Fructose wurden in 310 ccm frisch dest. Dimethylsulfoxyd (DMSO) 6 Stdn. unter kräftigem Rühren auf 70° erwärmt. Anschließend wurde das DMSO i. Hochvak. bei ca. 40–50° abdestilliert, der zurückbleibende

¹²⁾ K. LANG, Dtsch. Lebensmittel-Rdsch. 1959, 165.

¹³⁾ Biochem. J. 68, 621 [1958].

¹⁴⁾ J. chem. Soc. [London] 1957, 3985.

¹⁵⁾ T. G. BONNER, Chem. and Ind. 1960, 345.

braune Sirup in wenig Wasser gelöst und auf eine Austauschersäule (Dowex 50, 200–400 mesh, H⁺-Form, 390 × 35 mm) gegeben. Die neutralen Bestandteile wurden mit 3 l dest. Wasser ausgewaschen. Die basischen Produkte wurden mit 0.9*n* Trichloressigsäure (TCE) eluiert, das Eluat in 25-ccm-Fractionen gesammelt und wie angegeben chromatographiert.

Das Gemisch der Dihexose-Produkte wurde in Teilen aufgearbeitet. Die Fraktion 76–86 ergab 320 mg analysenreines Dihexose-Produkt, $[\alpha]_D^{20}$: +56° (*c* = 3, in Wasser).

C₁₈H₃₄N₂O₁₂ · 2HCl (543.2) Ber. C 39.8 H 6.63 N 5.15 Gef. C 39.6 H 6.63 N 5.10

Aus den Fraktionen 87–112 konnten 180 mg Substanz isoliert werden, $[\alpha]_D^{20}$: +29°.

Das Produkt der Fraktionen 76–86 wurde durch erneute Austauscherentrennung auf seine Einheitlichkeit geprüft. 270 mg wurden auf eine Austauschersäule (Dowex 50, H⁺-Form, 230 × 20 mm) gegeben. Mit 0.9*n* TCE wurde eluiert und in 25-ccm-Fractionen aufgefangen. Die Fraktionen 12–24 reagierten gegen ammoniakalische Silbernitrat-Lösung positiv. Sie wurden in drei Teilen aufgearbeitet. Ausb. 15.8 mg (Frakt. 12–15), $[\alpha]_D^{20}$: +61° (*c* = 2.4, in Wasser).

C₁₈H₃₄N₂O₁₂ · 2HCl (543.2) Ber. N 5.15 Gef. N 5.12

Ausb. 16.4 mg (Frakt. 16–18), $[\alpha]_D^{20}$: +61° (*c* = 2.6, in Wasser).

Ber. N 5.15 Gef. N 5.10

Ausb. 10 mg (Frakt. 19–23), $[\alpha]_D^{20}$: +35° (*c* = 1, in Wasser).

Bei den Produkten der Fraktionen 12–18 handelt es sich um 2-*N*-L-Lysin-2-desoxy- α -*D*-diglucose-dihydrochlorid (Diglucose-L-Lysin-dihydrochlorid), $[\alpha]_D^{20}$: +61°, *R*_{Fru} 0.08.

Die Verbindung gibt keine der beschriebenen Reaktionen auf Amadori-Produkte. Chromatographisch reines 2-*N*-L-Lysin-2-desoxy- ϵ -*D*-glucose-dihydrochlorid (ϵ -*D*-Glucose-L-Lysin-dihydrochlorid) konnte aus den Fraktionen 116–141 gewonnen werden. Ausb. 250 mg, $[\alpha]_D^{20}$: +42° (*c* = 2, in Wasser).

Auf konstante Drehung wurde durch erneute Ionenaustauscherentrennung (Dowex 50, H⁺-Form, 245 × 18 mm) geprüft. Es wurden 35 mg analysenreines Produkt mit $[\alpha]_D^{20}$: +42° erhalten. *R*_{Lys} 0.68.

C₁₂H₂₄N₂O₇ · 2HCl (381.1) Ber. C 37.82 H 6.83 N 7.35 Gef. C 38.20 H 6.91 N 7.18

1-*N*-L-Lysin-1-desoxy- ϵ -*D*-fructose-dihydrochlorid (ϵ -*D*-Fructose-L-Lysin-dihydrochlorid) wurde aus den Fraktionen 242–270 isoliert. Ausb. 150 mg, $[\alpha]_D^{20}$: –28° (*c* = 3, in Wasser). *R*_{Lys} 0.57.

C₁₂H₂₄N₂O₇ · 2HCl (381.1) Ber. C 37.82 H 6.83 N 7.35 Gef. C 38.15 H 6.98 N 6.88

Zur Kontrolle der spezif. Drehung wurde die Substanz nochmals einer Ionenaustauscherentrennung unterworfen (Dowex 50, H⁺-Form, 230 × 18 mm). Die ersten positiven Fraktionen wurden verworfen. Aus den übrigen wurden 88 mg ϵ -*D*-Fructose-L-Lysin-dihydrochlorid gewonnen, $[\alpha]_D^{20}$: –28° (*c* = 2.5, in Wasser).

Ber. N 7.35 Gef. N 7.02

Hexose-L-Lysin-Verbindungen in Methanol

10 g L-Lysin-dihydrochlorid, 130 g gut getrocknete D-Fructose wurden in 1 l Methanol 3 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Unter allmählicher Braunfärbung ging dabei die Aminosäure in Lösung. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel abdestilliert. Die weitere Aufarbeitung geschah, wie beim Ansatz in DMSO beschrieben. Es gelang nicht, ein reines Di-Produkt zu isolieren. Eine Auftrennung der Mono-Produkte durch die erste Ionenaustauscherentrennung war nicht eingetreten. Alle Fraktionen, die Aminosäure-Zucker-Verbindung enthielten, wurden, wie eingangs beschrieben, aufgearbeitet. Ca. 1 g der Substanz wurde auf eine Ionenaustauschersäule (Dowex 50, H⁺-Form, 350 × 35 mm) gegeben und mit

0.9*n* TCE eluiert. Auch hier gelang keine wesentliche Auftrennung der Isomeren. Lediglich eine geringe Menge sehr stark angereichertes, aber nicht analysenreines ϵ -*D*-Mannose-*L*-Lysin-dihydrochlorid konnte isoliert werden. $[\alpha]_D^{20}$: $\sim +10^\circ$.

ϵ -*D*-Glucose-*L*-Lysin-monohydrochlorid: 800 mg des Isomerengemisches wurden auf eine Cellulosesäule gebracht. Als Cellulosepulver dienten 100 g Whatman Standard, chromatographiert wurde mit wassergesättigtem *n*-Butanol. Die chromatographisch einheitlichen Glucose-Lysin-Fractionen wurden vereinigt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert und die Substanz wie üblich gefällt. Ausb. 27 mg. $[\alpha]_D^{20}$: $+47^\circ$ ($c = 2$, in Wasser).

$C_{12}H_{24}N_2O_7 \cdot HCl$ (344.6) Ber. C 41.82 H 7.25 N 8.13 Gef. C 41.65 H 7.32 N 7.83

Rechnet man den Drehwert auf das Dihydrochlorid um, so ergibt sich ein Wert von $[\alpha]_D^{20}$: $+42^\circ$.

Es zeigte sich, daß eine Auftrennung größerer Mengen wegen der geringen R_F -Wert-Unterschiede nicht möglich ist. Bei der Trennung durch Ionenaustauscher störte der Gehalt des Gemisches an Mannose-Produkt, der im Ansatz in DMSO vermieden wurde.

2-*N*-*L*-Arginin-2-desoxy- α -*D*-glucose (α -*D*-Glucose-*L*-Arginin): 5 g fein gepulvertes *L*-Arginin-HCl und 50 g gut getrocknete *D*-Fructose wurden in 500 ccm frisch destilliertem DMSO 25 Tage im Brutschrank aufbewahrt. Während sich die Lösung braun färbte, ging das Arginin in Lösung. Anschließend wurde das DMSO i. Hochvak. abdestilliert und der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen.

Die Lösung wurde langsam auf eine stark saure Ionenaustauschersäule (Lewatit S 100, H^+ -Form, 28×420 mm) gebracht. Die Säule wurde mit dest. Wasser fructosefrei gewaschen und dann mit 1*n* TCE eluiert. Alle silbernitratpositiven Fraktionen wurden vereinigt und aufgearbeitet. Es wurden ca. 7 g Sirup erhalten, der zum größten Teil aus α -Glucose-*L*-Arginin bestand. Daneben konnten α -Fructose- und α -Mannose-Arginin nachgewiesen werden. Der Sirup wurde in Wasser gelöst und unter Rühren mit Dowex 1 (OH^- -Form) bis pH 10 versetzt. Es wurde abfiltriert und mit 100 ccm Wasser nachgewaschen. Das Cl^- -freie Filtrat wurde eingeengt. 2.6 g des Sirups wurden auf eine Cellulosesäule (Chro Max LKB Nr. 3502) gegeben und mit Pyridin/Amylalkohol/Wasser (40:30:37) entwickelt. Das Eluat wurde in 25-ccm-Fractionen aufgefangen. Frakt. 158–170 enthielt eine Substanz mit dem R_{Fu} -Wert 0.44. Nach der Aufarbeitung wurden 50 mg α -*D*-Glucose-*L*-Arginin erhalten. $[\alpha]_D^{20}$: $+25^\circ$ ($c = 2.3$, in Wasser).

$C_{12}H_{24}N_4O_7$ (336.1) Ber. C 42.87 H 7.14 N 16.66 Gef. C 42.23 H 7.67 N 16.21

1-*N*-*L*-Arginin-1-desoxy- α -*D*-fructose (α -*D*-Fructose-*L*-Arginin): Aus den Fraktionen 175–192 konnten 80 mg α -*D*-Fructose-*L*-Arginin erhalten werden. $[\alpha]_D^{20}$: -13° ($c = 1.66$, in Wasser). R_{Fu} 0.35.

$C_{12}H_{24}N_4O_7$ (336.1) Ber. C 42.87 H 7.14 N 16.66 Gef. C 42.49 H 7.52 N 16.38

2-*N*-*L*-Arginin-2-desoxy- α -*D*-mannose (α -*D*-Mannose-*L*-Arginin): Aus Fraktion 112–120 konnten 17 mg nicht analysenreines α -*D*-Mannose-*L*-Arginin isoliert werden. Es gelang nicht, die Substanz zu reinigen. Die spezif. Drehung betrug $[\alpha]_D^{20}$: $\sim +3^\circ$. R_{Fu} 0.50. Frakt. 121–157 bestand zum größten Teil aus α -*D*-Glucose-*L*-Arginin und etwas α -*D*-Mannose-*L*-Arginin. Die optische Drehung der isolierten Substanz betrug $[\alpha]_D^{20}$: $+9^\circ$.

1-*N*-*L*-Lysin-1-desoxy- α -*D*-fructose-dihydrochlorid (α -*D*-Fructose-*L*-Lysin-dihydrochlorid): 4 g ϵ -Cbo-*L*-Lysin-HCl¹⁶⁾ und 40 g *D*-Glucose wurden in 600 ccm gut getrocknetem Methanol 6 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Es wurde zur Trockne eingedampft, in wenig Wasser gelöst

¹⁶⁾ A. NEUBERGERG und F. SANGER, Biochem. J. 37, 515 [1943].

und vom Unlöslichen abfiltriert. Die Lösung wurde auf eine stark saure Ionenaustauschersäule (Lewatit S 100, H[⊕]-Form, 28 × 350 mm) gegeben und mit 3 l dest. Wasser gewaschen. Die Aminosäure-Zucker-Verbindung wurde mit 0.5 n TCE eluiert. Alle silbernitratpositiven Fraktionen wurden aufgearbeitet. Es wurden 3.4 g Sirup erhalten.

Der Sirup wurde in 200 ccm Äthanol, 40 ccm Wasser und 40 Tropfen Eisessig gelöst. Es wurden 0.5 g Pd/C-Katalysator zugegeben und hydriert. Nach der Aufarbeitung, bei der HCl zugesetzt wurde, erhielt man ca. 1 g Sirup, der in der üblichen Weise gefällt wurde. $[\alpha]_D^{20}$: -27° ($c = 1.6$, in Wasser); R_{Lys} 0.52.

$C_{12}H_{24}N_2O_7 \cdot 2HCl$ (381.3) Ber. C 37.8 H 9.1 N 7.34 Gef. C 37.6 H 9.5 N 7.1

1-N-L-Lysin-1-desoxy- α,ϵ -di-D-fructose-dihydrochlorid (α,ϵ -Di-D-Fructose-L-Lysin-dihydrochlorid): 8 g L-Lysin-dihydrochlorid und 50 g D-Glucose wurden in 750 ccm trockenem Methanol 1 1/2 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Anschließend wurde das Methanol abdestilliert, in wenig Wasser gelöst und auf eine stark saure Ionenaustauschersäule (Dowex 50, H[⊕]-Form, 28 × 45 mm) gegeben. Nach dem Waschen mit 3 l dest. Wasser wurde mit 0.8 n TCE eluiert. Alle nur silbernitratpositiven Fraktionen wurden vereinigt und aufgearbeitet. Ausb. ca. 10 g Sirup, der wie üblich aufgearbeitet wurde. $[\alpha]_D^{20}$: -37° ($c = 2.1$, in Wasser); R_{Fru} 0.08.

$C_{18}H_{34}N_2O_{12} \cdot 2HCl$ (543.4) Ber. C 39.7 H 6.67 N 5.14 Gef. C 40.1 H 6.92 N 5.10

1-N-L-Lysin-1-desoxy- ϵ -D-fructose-dihydrochlorid (ϵ -Fructose-L-Lysin-dihydrochlorid): Die Fraktionen mit einer reduzierenden ninhydrinpositiven Substanz wurden aufgearbeitet und ergaben ca. 6 g Sirup, der aus methanolischer Lösung gefällt wurde. $[\alpha]_D^{20}$: -28° ($c = 2.2$, in Wasser).

$C_{12}H_{24}N_2O_7 \cdot 2HCl$ (381.3) Ber. C 37.8 H 9.1 N 7.3 Gef. C 37.5 H 9.3 N 7.0

Die Substanz ist identisch mit der aus L-Lysin-dihydrochlorid und Fructose erhaltenen.

Bei den Spaltungsversuchen wurden etwa 5-proz. Lösungen der Substanzen in 2 n Essigsäure im Einschlußkölbchen 2—4 Stdn. bei 115° gehalten. Die Spaltprodukte wurden durch papierchromatographischen Vergleich mit authent. Stoffen identifiziert.

Spaltung der Arginin-Zucker-Verbindungen durch Arginase: 9 mg Aldose- bzw. Ketose-Arginin und 1.4 mg Arginase wurden in 1 ccm Pufferlösung (Borax-Monokaliumphosphat nach KOLTHOFF) bei pH 9.2 1 Stde. bei 37° gehalten. Anschließend wurden die Spaltungsprodukte papierchromatographisch nachgewiesen. Die Aktivität der Arginase betrug 20 units/mg.