

**HELMUT SIMON, HANS DIETER DORRER und ACHIM TREBST**

Untersuchungen über den Mechanismus der Osazonbildung  
in der Zuckerreihe, III<sup>1)</sup>

**Fructosazonbildung mit an C-1 stereospezifisch T-markierten  
Fructosen**

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Technischen Hochschule München

(Eingegangen am 10. November 1962)

Durch die stereospezifische Reaktion der Glucose-6-phosphat-isomerase werden die zwei möglichen Fructosen-[1-T] dargestellt. Die damit unter verschiedenen Bedingungen durchgeführten Osazondarstellungen zeigen: Die Spaltung der C—H-Bindung ist reaktionsgeschwindigkeitsbestimmend, die beiden Wasserstoffe an C-1 der Fructose sind bei der Osazonbildung nicht gleichwertig. Daraus lassen sich Folgerungen für den Ablauf der Reaktion ziehen.

Bei der Phenylosazonbildung aus Fructose sind Einzelheiten des Mechanismus unbekannt. Es sollten folgende Fragen geklärt werden:

1. Ist die Spaltung der C—H-Bindung an C-1 reaktionsgeschwindigkeitsbestimmend?
2. Verläuft die Osazonbildung unter Aufhebung des Halbacetalrings aus einer offenkettigen Form unter Ausbildung einer C=N-Doppelbindung?
3. Besteht bei der Osazonbildung in bezug auf die beiden Wasserstoffe an C-1 eine Stereospezifität?

Wir stellten die zwei möglichen an C-1 stereospezifisch T-markierten Fructosen dar. Diese kann man auf enzymatischem Wege gewinnen, da, wie von Y. J. TOPPER<sup>2)</sup> gefunden, die von Glucose-6-phosphat-Isomerase katalysierte Umwandlung von Glucose-6-phosphat in Fructose-6-phosphat stereospezifisch verläuft. Daher wird das Wasserstoffatom (und nur dieses), das bei Übergang Glucose → Fructose an C-1 der Fructose gebunden wird, bei der Rückreaktion wieder entfernt. Stellt man daher einmal Fructose-6-phosphat aus nicht markiertem Glucose-6-phosphat in tritiummarkiertem Wasser dar und das andere Mal aus Glucose-[1-T]-6-phosphat in nichtmarkiertem Wasser, so erhält man zwei stereospezifisch an C-1 tritiummarkierte Fructosen (I, II).

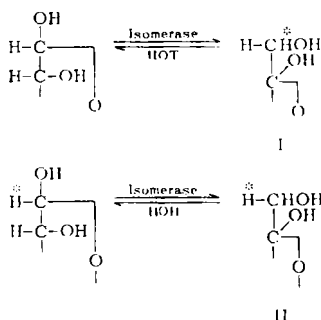
Bei der Reaktion in HOT erhält man außerdem durch die Rückreaktion Glucose-[2-T]-6-phosphat.

Wir überprüften diese Stereospezifität, indem wir die in HOT gebildete Glucose, deren gesamte T-Aktivität an C-2 gebunden sein muß, der Osazonbildung unterwarfen. Der T-Gehalt des Osazons betrug <0.4% von dem der Glucose.

<sup>1)</sup> Frühere Arbeiten: F. WEYGAND, H. SIMON und J. F. KLEBE, Chem. Ber. **91**, 1567 [1958]; H. SIMON, K. D. KEIL und F. WEYGAND, ebenda **95**, 17 [1962].

<sup>2)</sup> J. biol. Chemistry **225**, 419 [1957].

Die gebildeten Fructose-6-phosphate wurden dephosphoryliert, papierchromatisch isoliert und mit nichtmarkierter Fructose passend verdünnt.



Die unter verschiedenen Bedingungen aus I und II gebildeten Phenyllosazone zeigten stets einen unterschiedlichen Tritiumverlust.

Die Tabelle zeigt drei Versuche, die unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt wurden und bei verschieden hohen Ausbeuten an Osazon beendet wurden.

Vergleich der Tritiumverluste bei der Osazonbildung aus Fructose I und II bei verschiedenen Bedingungen und verschiedenen Ausbeuten

Fructose	I		II		Verhältnis des T-Verlustes I : II
	Ausb.	% T-Verlust d. Osazons	Ausb.	% T-Verlust d. Osazons	
Bedingungen a *)	77	50	77	33	3.0 : 2.0
Bedingungen b *)	37	64	40	42.5	3.0 : 2.0
Bedingungen c *)	95	33	94	23.5	3.0 : 2.1

\*) s. Versuchsteil.

Die Abbildung gibt das Ergebnis eines Versuchs wieder, in dem die beiden Fructosen unter gleichen Bedingungen zum Osazon umgesetzt wurden, wobei zu verschiedenen Zeiten das bis dahin gebildete Osazon abgetrennt wurde. Das verschiedene Verhalten der beiden Fructosen ist hier besonders deutlich zu sehen. Wiederum verhalten sich die T-Verluste durchweg wie 3:2. Im einzelnen läßt sich folgendes aus den Ergebnissen schließen. Die C—H-Spaltung ist reaktionsgeschwindigkeitsbestimmend. Dies entspricht den Befunden bei der Osazonbildung aus Amadori-Umlagerungsprodukten wie 1-*p*-Toluidino-1-desoxy-D-fructose<sup>1,2)</sup>.

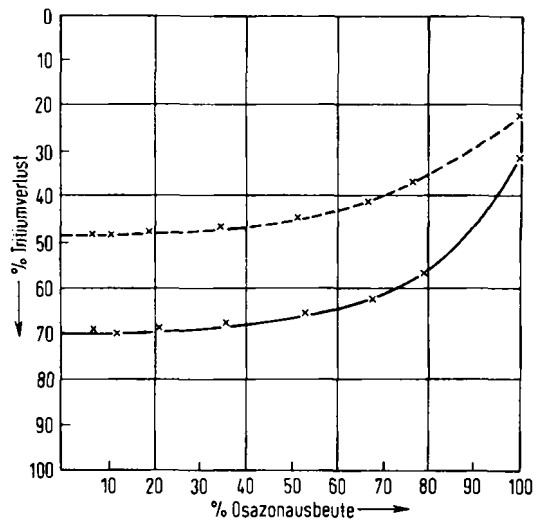
Die Zunahme des T-Gehaltes im Osazon mit zunehmender Ausbeute zeigt das Vorliegen eines kinetischen Isotopeneffektes, der in dieser Größe nur auftreten kann, wenn die C—H-Spaltung an C-1 der reaktionsgeschwindigkeitsbestimmende Schritt ist.

Die unterschiedlichen T-Verluste zeigen, daß die beiden Wasserstoffe an C-1 bei der Osazonbildung nicht gleichwertig sind. Diese Reaktionslenkung muß durch die Asymetrie von C-2 bewirkt werden, da ein Einfluß des Asymetriezentrums an C-3 wegen der kleinen Gruppen (H und OH) nicht zu erwarten ist<sup>3)</sup>.

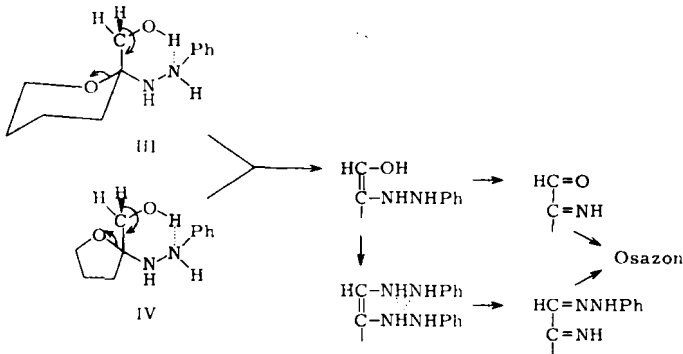
<sup>3)</sup> Vgl. V. PRELOG, Bull. Soc. chim. France 7, 987 [1956].

Eine C=N-Doppelbindung an C-2 kann damit ausgeschlossen werden. Die Osazonbildung muß daher aus der Ringform III oder IV bzw. aus einer offenkettigen Aminol-

Verlauf des T-Verlustes bei der Osazonbildung aus Fructose I (—) und Fructose II (---). Die erhaltene Gesamtausbeute wurde gleich 100% gesetzt



form erfolgen. Letztere ist jedoch auszuschließen, da sie rasch Wasser unter Ausbildung der C=N-Doppelbindung abspalten würde.



Das Verhältnis des Tritium-Verlustes von 3:2 könnte durch den Anteil von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Fructose in der Lösung bedingt sein. Zwar sind die Formen der Fructose, die in wässriger Lösung neben der  $\beta$ -Pyranose vorliegen, nicht mit Sicherheit bekannt. Es gibt jedoch eine Reihe von Hinweisen dafür, daß die Mutarotation u. a. auf dem Übergang  $\beta$ -Fructopyranose in Fructofuranose beruht<sup>4,5</sup>.

Man kann annehmen, daß insbesondere in der Furanoseform sowohl die  $\alpha$ - wie die  $\beta$ -Form schnell mit Phenylhydrazin zum Fructosid reagieren. In jedem Fructosid kann die primäre OH-Gruppe durch eine Wasserstoffbrücke zum einsamen Elektro-

- <sup>4</sup>) H. S. ISBELL und W. W. PIGMAN, J. Res. nat. Bur. Standards **20**, 773 [1938]; s. auch C. P. BARRY und J. HONEYMAN, Advances Carbohydrate Chem. **7**, 55 [1952].  
<sup>5</sup>) R. KUHN und H. GRASSNER, Liebigs Ann. Chem. **610**, 122 [1957].

nenpaar des  $\beta$ -ständigen Stickstoffs fixiert werden (III, IV). Von C-1 wird dann wahrscheinlich derjenige Wasserstoff abgespalten, der mit der Bindung des Ringsauerstoffs in einer Ebene liegt und *trans*-ständig ist. Der Wasserstoff, der diese Voraussetzung z. B. in der  $\alpha$ -Form erfüllt, erfüllt diese nicht mehr in der  $\beta$ -Form und umgekehrt, d. h. das Verhältnis der Tritiumverluste kann durch die Anteile von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Form in der Fructose bedingt sein.

Herrn Prof. Dr. F. WEYGAND danken wir für sein Interesse an der Arbeit. Der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT und dem BUNDESMINISTERIUM FÜR ATOMKERNENERGIE sind wir für finanzielle Unterstützung dankbar. Fräulein H. PÖHLMANN führte die T-Analysen mit großer Sorgfalt aus.

### BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

*Fructose-[1-T] aus Glucose-6-phosphat in tritiummarkiertem Wasser:* 100  $\mu$ Mol *Glucose-6-phosphat*<sup>6)</sup> als Natriumsalz wurden in 1.0 ccm *HOT* (67 mC/ccm) mit 0.5 ccm Trispuffer (pH 7.5) und 16 Einheiten *Glucose-6-phosphat-Isomerase*<sup>6)</sup> (1 Einheit = 1  $\mu$ Mol Umsatz pro Min.) versetzt und für 3 Stdn. bei Raumtemperatur belassen. Danach wurde das Wasser durch Gefriertrocknung entfernt, der Rückstand mit 10-proz. Essigsäure aufgenommen, kurz aufgekocht und abermals lyophilisiert. Der Rückstand wurde in wenig Wasser gelöst, mit verd. Natronlauge neutralisiert und mit 0.2 *m* Acetatpuffer (pH 5.4) versetzt. Mit einer aus *Polidase*<sup>7)</sup> angereicherten *Phosphatase* wurde dephosphoryliert und in Phenol/Wasser (4:1) absteigend chromatographiert. Die Positionen von *Glucose-T* und *Fructose-T* auf dem Papierchromatogramm wurden unter einem Durchflußzähler bestimmt und die Zucker eluiert.

Das Fructoseeluat wurde mit 10 mMol nichtmarkierter Fructose verdünnt. Zur Bestimmung der molaren Radioaktivität wurde das *p*-Nitro-phenylhydrazon dargestellt. 198.3 ipm/ $\mu$ Mol.<sup>8)</sup> Schmp. 178–180°.

*Fructose-[1-T] aus Glucose-[1-T]:* *Glucose-[1-T]*<sup>9)</sup> (0.8  $\mu$ Mol; 200  $\mu$ C) wurde in 0.4 ccm Trispuffer (0.1 molar, pH 7.5) 90 Min. lang mit 30 Einheiten *Hexokinase*<sup>10)</sup> und 2  $\mu$ Mol *ATP* phosphoryliert. Nach Chromatographie in Butanol/Essigsäure/Wasser (52:14:35) wurde *Glucose-[1-T]-6-phosphat* in 66-proz. Ausb. isoliert. (Der Rest wurde durch den Isomerasegehalt der Kinase bereits zu *Fructose-[1-T]-6-phosphat* umgewandelt, das mit der aus *Glucose-[1-T]-6-phosphat* gewonnenen Fructose vereinigt wurde.) Nachdem mit 20  $\mu$ Mol nichtmarkiertem *Glucose-6-phosphat* versetzt worden war, wurde analog wie oben weiter gearbeitet. Radioaktivität des *p*-Nitro-phenylhydrazons 324.8 ipm/ $\mu$ Mol. Schmp. 178–180°.

*Fructosazon:* Bedingungen a) 1 mMol *Fructose* wurde mit 3.5 mMol *Phenylhydrazinhydrochlorid* und 5.7 mMol Natriumacetat in 3.5 ccm Wasser erhitzt.

Bei Bedingungen b) wurden 1 mMol *Fructose* zusammen mit 3.3 mMol *Phenylhydrazinhydrochlorid*, 53 mMol Natriumacetat und 50 mMol Eisessig in 35 ccm Wasser erhitzt.

Bei der fraktionierten Osazonbildung (Bedingungen c) wurden 2.5 mMol *Fructose*, 75 mMol Natriumacetat, 75 mMol Eisessig und 8.35 mMol *Phenylhydrazin* in 36 ccm Wasser bei 80.0° im Thermostaten erhitzt. Im Verlauf von 120 Min. wurden 7 mal die jeweils gebildeten Osazonmengen abgetrennt.

6) Fa. C. F. Boehringer, Mannheim.

7) Fa. Schwarz Laboratories Mount Vernon, N. Y.

8) Alle T-Messungen wurden in Proportional-Gaszählrohren durchgeführt. Vgl. H. SIMON, H. DANIEL und J. F. KLEBE, *Angew. Chem.* **71**, 303 [1959]; und H. SIMON und F. BERTHOLD, *Atomwirtschaft* **1962**, 498.

9) Amersham, England.

10) Fa. Sigma, Typ IV.