

KURT HEYNS und HELMUT NOACK

Die Umsetzung von L-Tryptophan und L-Histidin mit Hexosen¹⁾

Aus dem Chemischen Staatsinstitut, Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg
(Eingegangen am 10. August 1963)

Die Umsetzung von L-Tryptophan mit D-Fructose liefert kristallisierte 2-N^α-L-Tryptophan-2-desoxy-D-glucose (I), mit D-Glucose 1-N^α-L-Tryptophan-1-desoxy-D-fructose (II). Aus L-Histidin und D-Fructose entsteht 2-N^α-L-Histidin-2-desoxy-D-glucose (III).

D-Glucose reagiert mit Aminosäuren allgemein unter Amadori-Umlagerung zur 1-N-Aminosäure-1-desoxy-D-fructose. D-Fructose reagiert dagegen unter Ketosylamin-Umlagerung mit der Mehrzahl der Aminosäuren und Peptide zu einem Gemisch von 2-N-Aminosäure-2-desoxy-D-glucose bzw. D-mannose und 1-N-Aminosäure-1-desoxy-D-fructose, wobei deren Mengenverhältnis durch die Reaktionsbedingungen zu beeinflussen ist. Am leichtesten reagieren basische Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, mit Monosacchariden zu Produkten, die einer schnellen „nichtenzymatischen Bräunung“ unterliegen können¹⁾. In der vorliegenden Arbeit werden die Reaktionen von L-Tryptophan und L-Histidin mit D-Fructose und D-Glucose untersucht.

Reines L-Tryptophan ist bei Luftausschluß gegen Säuren relativ beständig, wird in Gegenwart von Carbonylverbindungen jedoch rasch unter Bildung von Huminstoffen zersetzt²⁾. Nach W. O. KERMAK und Mitarbb.³⁾, H. R. SNYDER und Mitarbb.⁴⁾ sowie W. A. JACOBS und L. C. CRAIG⁵⁾ erhält man aus Tryptophan und Acetaldehyd 1-Methyl-tetrahydroharman-carbonsäure-(3). R. TSCHESCHE und H. JENSSEN⁶⁾ erhielten Tetrahydroharman-dicarbonsäure-(1.3) aus Tryptophan und Brenztraubensäure und erklärten so das Verschwinden von L-Tryptophan bei der sauren Hydrolyse von Proteinen, da hierbei nach K. HEYNS und W. WALTER⁷⁾ Brenztraubensäure aus L-Serin entsteht. Tryptophan reagiert demnach leicht mit Carbonylverbindungen zu Tetrahydroharman-Derivaten, die weiter zu Carbolin-Derivaten dehydriert werden können und dann durch eine Fluoreszenz mit charakteristischer Absorption bei 360 m μ erkennbar sind. Ob Kohlenhydrate als Carbonylkomponenten für das Verschwinden des Tryptophans bei der Eiweißhydrolyse verantwortlich gemacht werden können, ist nicht bekannt.

L-Tryptophan ergab mit D-Fructose überraschend glatt durch Erhitzen in Methanol oder Dimethylsulfoxid auf 40° definierte Produkte. Unterbricht man die Reaktion,

1) K. HEYNS und H. NOACK, Chem. Ber. **95**, 720 [1962].

2) Hoppe-Seyler/Thierfelder, Handbuch der physiol.- und pathol.-chem. Analyse, 10. Aufl., 3. Bd., 2. Teil, S. 1708, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955.

3) W. O. KERMAK, W. H. PERKIN und R. ROBINSON, J. chem. Soc. [London] **119**, 1617 [1921].

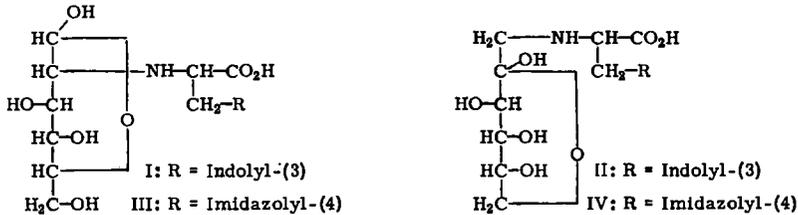
4) H. R. SNYDER, G. H. HANSCH, L. KATZ, S. M. PARMETER und E. C. SPAETH, J. Amer. chem. Soc. **70**, 219 [1948].

5) J. biol. Chemistry **113**, 759 [1935].

6) Chem. Ber. **91**, 1732 [1958].

7) Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **294**, 111 [1954].

bevor eine zu starke Bräunung einsetzt, so erhält man als Hauptprodukt reine 2- N^{α} -L-Tryptophan-2-desoxy-D-glucose (I). L-Tryptophan reagiert demnach wie aliphatische Aminosäuren mit der α -Aminogruppe zum N -Glykosid unter anschließender Ketosylamin-Umlagerung zur substituierten Glucosaminverbindung. Die gleichzeitig zu erwartende isomere 2- N^{α} -L-Tryptophan-2-desoxy-D-mannose ließ sich nicht nachweisen; die Umlagerung verläuft somit beim L-Tryptophan stereospezifisch.



I ist bemerkenswert beständig und zeigt alle Eigenschaften einer 2- N^{α} -Aminosäure-2-desoxy-D-glucose, z. B. die charakteristische Rückumlagerung beim Erhitzen in 2*n* Essigsäure unter Aufspaltung in L-Tryptophan und D-Fructose. Mit Ninhydrin reagiert die Verbindung als N -substituierte α -Aminosäure in der Kälte nicht.

Auch mit D-Glucose setzte sich L-Tryptophan unter sorgfältiger Einhaltung der Reaktionsbedingungen schnell zu 1- N^{α} -Tryptophan-1-desoxy-D-fructose (II) um, die nach Säulenchromatographie kristallisiert erhalten werden konnte. Sie wird durch Amadori-Umlagerung des N -Glucosids des L-Tryptophans gebildet. II findet man auch bei der oben beschriebenen Umsetzung mit D-Fructose in geringer Menge.

Bei der Umsetzung von L-Tryptophan mit D-Fructose und D-Glucose ließen sich in den Reaktionslösungen fluoreszierende Substanzen chromatographisch nachweisen. Carbolinderivate^{3,5)} ließen sich aber nicht isolieren, auch nicht durch Säurebehandlung von I und II.

L-Histidin reagierte gleichfalls sehr rasch mit D-Fructose unter Ketosylamin-Umlagerung des primär gebildeten N -Fructosids. In Dimethylsulfoxyd bei 40° entsteht ausschließlich 2- N^{α} -L-Histidin-2-desoxy-D-glucose (III), die von überschüssiger D-Fructose an saurem Austauscher und von überschüssigem L-Histidin an einer Cellulosesäule befreit wurde.

In Methanol erhält man ein Gemisch von III neben wenig 2- N^{α} -L-Histidin-2-desoxy-D-mannose und 1- N^{α} -L-Histidin-1-desoxy-D-fructose (IV). IV ist schon von BORSOOK⁸⁾ durch Umsetzung von L-Histidin mit D-Glucose dargestellt worden; beide Verbindungen sind nach dem Papierchromatogramm identisch.

Die Zuordnung von III erfolgt in Analogie zu anderen Glucose-Aminosäuren auf Grund der positiven optischen Drehung. III reagiert nicht mit Ninhydrin und ist im Einschlußrohr mit 2 *n* HCl wieder in L-Histidin und D-Fructose unter Rückumlagerung spaltbar.

Bei längerer Reaktion von L-Histidin mit D-Fructose tritt auch in Dimethylsulfoxyd neben der Histidin-Glucose III Histidin-Fructose IV auf. Die Bildung von IV

⁸⁾ P. H. Lowy und H. BORSOOK, J. Amer. chem. Soc. **78**, 3175 [1956].

wird durch Reaktion von überschüssigem L-Histidin mit Histidin-Glucose III gedeutet. Für diese Annahme spricht, daß reine Histidin-Glucose III in Dimethylsulfoxyd gleichfalls mit L-Histidin Histidin-Fructose IV liefert. Die Reaktion dürfte über eine „Amadori-Umlagerung“ des *N*-Glykosids der Histidin-Glucose III und anschließende Abspaltung eines Histidin-Restes erfolgen.

L-Tryptophan und L-Histidin reagieren demnach mit D-Glucose und D-Fructose nur mit der α -Aminogruppe zu den entsprechenden Hexose-Aminosäuren. Eine Reaktion des Indol- oder Imidazolringes ließ sich nicht nachweisen. Die bei der Umsetzung von L-Tryptophan mit Carbonylverbindungen, wie z. B. Brenztraubensäure, ablaufende Reaktion zu Carbolinverbindungen tritt unter den angegebenen Reaktionsbedingungen mit Glucose und Fructose nicht ein.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Histidinverbindungen wurden auf Schleicher & Schüll-Papier 602 h : p und Tryptophanverbindungen auf Papier MN 260 von Macherey und Nagel absteigend mehrere Tage mit *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (B/EE/W) (70 : 7 : 23) chromatographiert, Tryptophan-Derivate außerdem aufsteigend mit wassergesätt. Methyläthylketon/*n*-Propanol/Wasser (MEK/Prop/W) (4 : 1 : 1). Als Cellulosesäule wurde die Chro-Max-Säule Gr. II Typ LKB benutzt. Angefärbt wurde durch Besprühen mit ammoniakalischer Silbernitratlösung bzw. Ninhydrin in wassergesätt. *n*-Butanol.

2-N^α-L-Tryptophan-2-desoxy-D-glucose (D-Glucose-L-Tryptophan) (I): 5 g L-Tryptophan wurden mit 25 g D-Fructose in 500 ccm frisch dest. Dimethylsulfoxyd 5 Tage im Brutschrank bei 37° aufbewahrt, wobei die Lösung sich stark braun färbte. Sie wurde i. Vak. eingengt und einige Tage bei Raumtemperatur stehengelassen. Die sich abscheidenden Kristalle wurden aus Dimethylsulfoxyd/Wasser umkristallisiert, Ausb. 1.5 g Rohprodukt. I ist in 2*n* HCl löslich, in Wasser, Methanol und den meisten organischen Lösungsmitteln unlöslich. $[\alpha]_D^{20}$: +25° (*c* = 1.1, in 2*n* HCl), R_F 0.58 (MEK/Prop/W).

$C_{17}H_{22}N_2O_7$ (366.4) Ber. C 55.68 H 6.05 N 7.65 Gef. C 55.32 H 6.05 N 7.61

D-Glucose-L-Tryptophan (I) und 1-N^α-L-Tryptophan-1-desoxy-D-fructose (D-Fructose-L-Tryptophan) (II): 3 g L-Tryptophan und 30 g D-Fructose wurden in 450 ccm wasserfreiem Methanol 3 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Im Tiefkühlschrank schieden sich 420 mg I ab. Nach Abdestillieren des Methanols, Lösen des Sirups in Wasser und Abtrennen des wasserunlöslichen Anteils wurden weitere 510 mg I erhalten.

Der Rückstand wurde in 80 ccm Wasser gelöst, auf eine Ionenaustauschersäule (Lewatit S 100, H[⊕]-Form, 35 × 320 mm) gegeben, die Säule mit Wasser zur Entfernung der Fructose gewaschen und dann mit 0.6*n* Trichloressigsäure eluiert. Alle reduzierenden Fraktionen wurden vereinigt, im Apparat nach KUTSCHER-STEUDEL mit Äther extrahiert und die wäbr. Phase i. Vak. zum schwarzen Sirup (6 g) eingengt, der auf der Chro-Max-Cellulose-Säule mit wassergesättigtem *n*-Butanol chromatographiert wurde. Die schwarzen Bestandteile wurden mit der Front eluiert. Aus den silbernitratpositiven Fraktionen kristallisierten 150 mg *D-Glucose-L-Tryptophan* (I). Deren Mutterlaugen und alle weiteren silbernitratpositiven Fraktionen wurden vereinigt, das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand in siedendem Methanol aufgenommen. Es wurden 20 mg kristallines *D-Fructose-L-Tryptophan* (II) isoliert. R_F 0.38 (MEK/Prop/W).

1-N^α-L-Tryptophan-1-desoxy-D-fructose (D-Fructose-L-Tryptophan) (II): 5 g L-Tryptophan und 40 g D-Glucose wurden in 650 ccm absol. Methanol 4–5 Stdn. unter Rückfluß gekocht.

Anschließend wurde das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert und der schon leicht kristallisierende Sirup 3 mal mit absol. Methanol extrahiert. Der Rückstand bestand aus reiner Glucose. Die methanolischen Fraktionen enthielten neben Glucose viel II und wenig L-Tryptophan. Die vereinigten Lösungen ergaben nach dem Eindampfen ca. 21 g Sirup, von dem jeweils 2.6 g auf Chro-Max-Cellulose-Säule mit wassergesätt. n-Butanol vollständig getrennt wurden. Die Fraktionen mit II wurden papierchromatographisch ermittelt. II kristallisierte nach dem Einengen aus und wurde aus Methanol umkristallisiert. Gesamtausb. 2 g Rohprodukt. Mehrfaches Umkristallisieren lieferte analysenreines II. $[\alpha]_D^{20}$: -7.2° ($c = 2.6$, in $2n$ HCl), R_F 0.5 (B/EE/W), 0.38 (MEK/Prop/W).

$C_{17}H_{22}N_2O_7$ (366.4) Ber. C 55.68 H 6.05 N 7.65 Gef. C 55.27 H 6.26 N 7.43

2-N^α-L-Histidin-2-desoxy-D-glucose (D-Glucose-L-Histidin) (III): 5 g L-Histidin-hydrochlorid und 25 g D-Fructose wurden in 500 ccm frisch dest. Dimethylsulfoxyd im Brutschrank auf 37° erwärmt. Die Umsetzung wurde papierchromatographisch verfolgt. Nach etwa 12–14 Tagen war reichlich III entstanden. (Es soll nicht zu lange erwärmt werden, da sich dann die Fructose-Verbindung IV bildet und die Abtrennung nicht mehr möglich ist.) Das Dimethylsulfoxyd wird bei 0.01 Torr abdestilliert und der zurückbleibende Sirup in wenig Wasser auf eine Ionenaustauschersäule (Lewatit S 100, H[⊕]-Form, 25 × 450 mm) gegeben. Es wurde mit destilliertem Wasser die Fructose ausgewaschen und mit 0.5n NH₃ eluiert. Nach der papierchromatographischen Untersuchung wurden alle reduzierenden Fraktionen vereinigt und aufgearbeitet. Man erhielt 5.5 g Sirup. 2.6 g wurden auf einer Chro-Max-Cellulose-Säule mit Pyridin/Wasser (3 : 1) entwickelt und die Fraktionen nach chromatographischer Untersuchung entsprechend vereinigt. (Falls die Überlappungszone zu groß ist, muß die Trennung wiederholt werden). Es gelingt eine Trennung von III und L-Histidin. Die geringen Mengen IV gehen bei der verlustreichen Trennung verloren. Durch fraktionierte Fällung des in Methanol gelösten Sirups mit Äther/Isopropylalkohol wurden 50 mg III erhalten. $[\alpha]_D^{20}$: $+37^\circ$ ($c = 2.4$, in Wasser).

$C_{12}H_{19}N_3O_7$ (317.3) Ber. C 45.42 H 6.04 N 13.24 Gef. C 45.23 H 6.36 N 13.07

	R_{Fructose} n-Bu/EE/W (70 : 7 : 23)	R_F Py/W (65 : 35)
D-Fructose-L-Histidin (IV)	0.21	0.74
D-Glucose-L-Histidin (III)	0.28	0.74
L-Histidin	0.4	0.46

D-Fructose-L-Histidin (IV) aus D-Glucose-L-Histidin (III): 5 mg III und 5 mg L-Histidin wurden in 0.5 ccm Dimethylsulfoxyd 4 Tage auf 37° erhitzt. Chromatographisch konnte IV nachgewiesen werden. Nach 14 Tagen war die Substanz völlig zerstört.