

Kurt Heyns, Tiemchandr Chiemprasert und Werner Baltes

Über nichtenzymatische Bräunungsreaktionen, VI¹⁾

Über den Effekt ω -ständiger Substituenten auf *N*-Glykosid-Bildung und Amadori-Umlagerung bei *D*-Glucosen

Aus dem Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Hamburg

(Eingegangen am 14. Mai 1970)



Die *N*-Glykosid-Bildung und die Amadori-Umlagerung von *D*-Glucose, 6-Desoxy-*D*-glucose, *D*-Glucuronsäureamid und Kalium-*D*-glucuronat mit *p*-Toluidin wurde vergleichend untersucht. *N*-Glykosid-Bildung und -Hydrolyse sind Gleichgewichtsreaktionen, deren Geschwindigkeiten nicht allein von der ω -ständigen Gruppe des Zuckermoleküls abhängen. Die durch Essigsäure katalysierte Amadori-Umlagerung, die in der Gesamtreaktion offenbar den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt, wird durch elektronenziehende, ω -ständige Gruppen beschleunigt. 3.5-Di-*O*-methyl-*D*-glucofuranuronsäureamid reagiert viel schneller mit *p*-Toluidin und zeigt größere Umlagerungsbereitschaft als die entsprechende nicht-methylierte Pyranose.

Contributions to Non-enzymic Browning Reactions, VI¹⁾

Effects of Substituents in the ω -Position of *D*-Glucosides on *N*-Glycoside Formation and Amadori Rearrangement

N-Glycoside formation and Amadori rearrangement of *D*-glucose, 6-deoxy-*D*-glucose, *D*-glucuronamide and potassium-*D*-glucuronate with *p*-toluidine have been compared. Formation and hydrolysis of *N*-glycosides are equilibrium reactions, the rates of which are not simply dependent on the group at the ω -position of the sugar-molecule. The acetic acid-catalyzed Amadori rearrangement, which is evidently the rate determining process, is accelerated by electron attracting groups in the ω -position. 3.5-Di-*O*-methyl-*D*-glucofuranuronamide reacts much more rapidly with *p*-toluidine and undergoes rearrangement more easily than the corresponding non methylated pyranose.



Die Reaktion von Aldosen wie **1** mit Aminen führt in erster Reaktionsstufe zu *N*-Glykosiden (**2**), die durch katalytische Einwirkung von Protonen unter Amadori-Umlagerung in die hydrolysebeständigen 1-Amino-1-desoxy-ketosene (**3**) umgewandelt werden können²⁾. ω -Ständige Substituenten haben auf diese Reaktion einen erheblichen Einfluß³⁾. So reagiert *D*-Glucuronsäure mit Aminen schneller als Glucose und läßt sich mit einigen besonders schwach basischen, aromatischen Aminen, deren Reaktion mit Glucose nur zu *N*-Glykosiden führt, zu Amadori-Produkten umsetzen. Der Befund von Micheel und Frowein⁴⁾, daß die

¹⁾ V. Mitteil.: K. Heyns, J. Heukeshoven und K. H. Brose, Angew. Chem. 80, 627 (1968); Angew. Chem. internat. Edit. 7, 628 (1968).

²⁾ F. Weygand, Ber. dtsch. chem. Ges. 73, 1259 (1940).

³⁾ K. Heyns und W. Baltes, Chem. Ber. 93, 1616 (1960).

⁴⁾ F. Micheel und A. Frowein, Chem. Ber. 90, 1599 (1957).

Einführung einer Benzylidengruppe in 4.6-*O*-Stellung von Glucose die Umlagerungsreaktion fördert, deutet darauf hin, daß eine leichtere Öffnung des Halbacetalringes die Amadori-Umlagerung begünstigt.

Um die Einflüsse der in ω -Stellung von Aldohexopyranosen befindlichen Gruppen auf Bildung, Hydrolyse und Amadori-Umlagerung von *N*-Glykosiden vergleichen zu können, wurde eine Reihe von Zuckern gleicher Konfiguration untersucht, um sterische Effekte⁵⁾ zu eliminieren. Günstig erschienen Aldosen mit *D*-gluco-Konfiguration, da diese Verbindungen in wäßriger Lösung in der C1-Konformation vorliegen, in der alle Hydroxylgruppen äquatorial angeordnet sind. Wir haben *D*-Glucose (**1b**), *D*-Glucuronsäureamid (**1c**), Kalium-*D*-glucuronat (**1d**) und 6-Desoxy-*D*-glucose (Chinovose, **1a**) mit *p*-Toluidin umgesetzt und die Geschwindigkeiten von Bildung und Hydrolyse der *N*-Glykoside sowie ihrer mit Eisessig katalysierten Amadori-Umlagerung ermittelt.

Da eine gleichzeitige Bestimmung der *N*-Glykoside und ihrer Umlagerungsprodukte nicht möglich war, wurden *N*-Glykosid-Bildung und Amadori-Umlagerung in getrennten Versuchsreihen gemessen. Die *N*-Glykosid-Bildung bzw. -Spaltung wurde polarimetrisch bestimmt, wobei der mittlere relative Meßfehler etwa $\pm 2\%$ betrug. Hierbei konnte die die optische Drehung beeinflussende Konfiguration am glykosidischen Kohlenstoffatom unbeachtet bleiben, da die Mutarotation unter den gewählten Bedingungen in wenigen Minuten vollständig ablief, so daß der Aldose- und *N*-Glykosid-Gehalt nach Aufstellung von Eichkurven mittels entsprechender Eichsubstanzen befriedigend aus der optischen Drehung ermittelt werden konnte. Amadori-Umlagerung und Bräunung konnten ohne Essigsäure im Reaktionsgemisch vernachlässigt werden.

Zur quantitativen Bestimmung der durch Umlagerung gebildeten Amadori-Verbindungen wurde ihre im Vergleich zu den *N*-Glykosiden und Aldosen wesentlich verstärkte Reduktionswirkung in alkalischem Medium herangezogen. Allerdings verlaufen die üblichen Nachweisreaktionen mit *o*-Dinitrobenzol, Methylenblau, 2.6-Dichlor-phenolindophenol oder Kaliumhexacyanoferrat(III)⁶⁾ nicht stöchiometrisch, da bei weiteren Enolisierungen im Zuckermolekül mehrfache Oxydationen eintreten können⁷⁾. Durch ein streng standardisiertes Verfahren, bei dem die Einwirkung des alkalischen Mediums zeitlich genau begrenzt war, ließen sich die Produkte der Amadori-Umlagerung mit Kaliumhexacyanoferrat(III) jedoch gut bestimmen. Die sehr empfindliche Methode zeigte schon 10^{-7} Mol der umgelagerten Substanz an. Die durchschnittliche Abweichung vom Mittelwert lag bei $\pm 0.85\%$, der maximale Fehler betrug $\pm 2.1\%$.

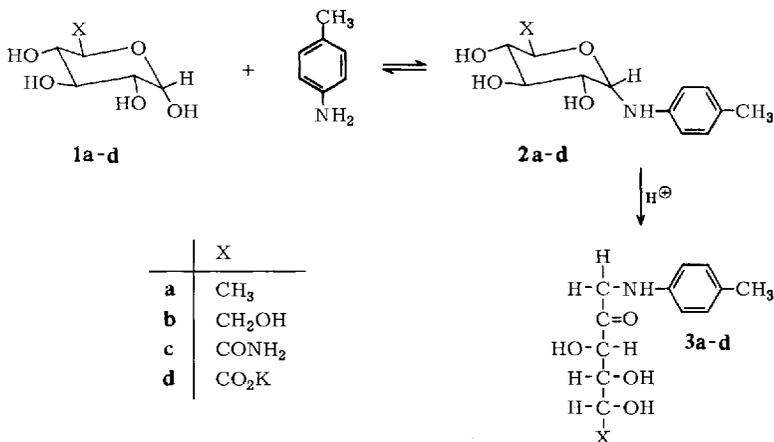
Das Reduktionsvermögen verschiedener 1-Amino-1-desoxy-ketosen hängt sowohl von der Amin- als auch der Zuckerkomponente ab. Daher wurden die Messungen der Amadori-Umlagerung durch Eichkurven der jeweiligen Amadori-Verbindungen ausgewertet.

⁵⁾ B. Capon und W. G. Overend, *Advances Carbohydrate Chem.* **15**, 47 (1960); F. Shafizadeh, ebenda **13**, 9 (1958); W. G. Overend, C. W. Rees und J. S. Sequeira, *J. chem. Soc. [London]* **1962**, 3429; B. N. Stepanenko, V. A. Ignatyuk-Maistrenko und M. G. Chentsova, *Doklady Akad. Nauk. SSSR* **154**, 650 (1964); C. A. **60**, 12096 (1964); C. Bamford, B. Capon und W. G. Overend, *J. chem. Soc. [London]* **1962**, 5138.

⁶⁾ R. Kuhn und F. Weygand, *Ber. dtsch. chem. Ges.* **69**, 1969 (1936); **70**, 769 (1937); H. Brossok, A. Abrams und P. H. Lowy, *J. biol. Chemistry* **215**, 113 (1955).

⁷⁾ R. Kuhn und L. Birkofer, *Ber. dtsch. chem. Ges.* **71**, 621 (1938).

Das *N*-Glykosid des *D*-Glucuronsäureamids (**2c**) wurde durch Umsetzung von **1c** mit *p*-Toluidin in kristallisierter Form dargestellt. Durch dieselbe Reaktion in Gegenwart von Eisessig als Katalysator wurde das Amadori-Produkt **3c** kristallisiert erhalten. Nach der C=O-Bande im IR-Spektrum bei 1740/cm liegt **3c** in der offenen Form vor. Das *N*-Glykosid der 6-Desoxy-*D*-glucose (**2a**) ließ sich in guten Ausbeuten gewinnen. Schwieriger erwies sich dessen Umlagerung zu **3a**, die sehr langsam verlief. Selbst nach mehrstündigem Erhitzen waren nur geringe Ausbeuten an **3a** in Form eines Sirups zu gewinnen, während **2a** in größeren Mengen zurückgewonnen wurde. Nach



dem IR-Spektrum (C=O 1740/cm) liegt auch 1-*p*-Toluidino-1.6-didesoxy-*D*-fructose (**3a**) in der Ketoform vor. Nachdem wir bereits früher⁸⁾ nachgewiesen hatten, daß auch das durch Umsetzung von Kaliumglucuronat mit *p*-Toluidin erhaltene Amadori-Produkt (**3d**) in der offenen Form vorliegt, sind wir der Meinung, daß derartige Verbindungen diese Struktur der Bildung eines Furanose-halbacetal-Ringes vorziehen.

Bildung und Hydrolyse der *N*-Glykoside sind reversibel, da die polarimetrischen Werte bei beiden Reaktionen einem etwa gleichen Enddrehwert zustreben. Die aus den Konzentrationsverhältnissen berechneten Gleichgewichtskonstanten wurden befriedigend reproduziert, wenn beliebige Gemische aus Aldose und ihrem *N*-Glykosid unter Einhaltung der molaren Konzentrationsbedingungen bis zur Gleichgewichtseinstellung erhitzt wurden.

Folgende Gleichgewichtskonstanten *K* wurden für die *p*-Tolyl-*N*-glykoside **2** erhalten:

		<i>K</i>
<i>D</i> -Glucose	(2b)	1.8
<i>D</i> -Glucuronsäureamid	(2c)	2.2
Kalium- <i>D</i> -glucuronat	(2d)	2.3
6-Desoxy- <i>D</i> -glucose	(2a)	4.1

Im Gleichgewicht mit 6-Desoxy-*D*-glucose und *p*-Toluidin ist das *N*-Glykosid im Vergleich zu den anderen untersuchten Glucohexosen begünstigt. Bildung und Zersetzung dieses *N*-Glykosides erfolgen dagegen langsamer als bei Kalium-*p*-tolyl-*N*-

⁸⁾ K. Heyns und W. Baltes, Chem. Ber. **91**, 622 (1958).

D-glucuronid. Da die Kinetik dieser Reaktionsfolge durch die Anzahl der Parameter schwierig zu berechnen ist, geben wir Schätzwerte für die relativen Geschwindigkeiten an, um den Trend der Effekte zu veranschaulichen:

		relative Geschwindigkeit von	
		<i>N</i> -Glykosidbildung	<i>N</i> -Glykosidhydrolyse
6-Desoxy-D-glucose	(2a)	1.8	1.1
D-Glucose	(2b)	= 1 ($\times k_B$)	= 1 ($\times k_H$)
D-Glucuronsäureamid	(2c)	1.8	1.2
Kalium-D-glucuronat	(2d)	15.1	10.3

Offenbar wirkt die Carboxylatgruppe besonders beschleunigend auf die Reaktion. Hier liegen die Verhältnisse umgekehrt, wie sie für die Hydrolyse von *O*-Glykosiden beobachtet wurden⁹⁾. Wahrscheinlich beeinflussen mehrere Effekte die Reaktionsgeschwindigkeit.

Um die Geschwindigkeit der Amadori-Umlagerung einheitlich verfolgen zu können, wurden die eingesetzten Mengen an Aldose, *p*-Toluidin und Eisessig bei allen Ansätzen konstant gehalten, wobei die Umsetzungen **1** \rightarrow **3** in 50proz., wäßrigem Äthanol in 5-ccm-Ampullen bei 80° durchgeführt wurden.

Während die 6-Desoxy-D-glucose (**1a**) die geringste Tendenz zum Eingehen der Amadori-Umlagerung aufzuweisen schien und sich nur etwa halb so schnell wie Glucose umlagern ließ, reagierten die Derivate der Glucuronsäure wesentlich schneller.

In der angezeigten Reihenfolge wurden die Reaktionen durch die nichtenzymatische Bräunung gestört. Sie führte bei Kaliumglucuronat nach 40 Minuten zum Abbruch der Reaktion, während sie sich bei Glucuronsäureamid erst nach 80 Minuten, bei Glucose nach 180 Minuten dadurch bemerkbar machte, daß die Mengen an Umlagerungsprodukt einen Endwert erreichten. Daher wurden die Messungen nur an ungebräunten Lösungen durchgeführt, um Störungen durch die *Maillard*-Reaktion zu eliminieren. Die Schätzwerte für relative Geschwindigkeiten, bezogen auf den Wert von Glucose, betragen bei

6-Desoxy-D-glucose	(2a)	0.4
D-Glucose	(2b)	= 1.0
D-Glucuronsäureamid	(2c)	4.4
Kalium-D-glucuronat	(2d)	7.7

Die Amadori-Umlagerung scheint umso schneller abzulaufen, je stärker elektro-negativ die ω -ständige Gruppe am Zuckerrest ist. Die gemessenen Geschwindigkeiten wurden reproduziert, wenn statt der Monosaccharide ihre *p*-Tolyl-*N*-glykoside umgelagert wurden (Reaktionsschritt **2** \rightarrow **3**). Das spricht ebenso wie der Befund, daß bei der Umsetzung von 6-Desoxy-D-glucose unter Umlagerungsbedingungen neben wenig Amadori-Produkt viel *N*-Glykosid erhalten wurde, dafür, daß im gesamten Reaktionsablauf **1** \rightarrow **3** der Schritt **2** \rightarrow **3**, d. h. die Amadori-Umlagerung, geschwindigkeitsbestimmend ist. In Übereinstimmung damit ist ihr Ablauf auch von der Gleichgewichtslage der *N*-Glykoside unabhängig.

Der Einsatz überschüssiger Mengen an Amin bewirkt eine Steigerung der Umlagerungsgeschwindigkeit. So ergab sich bei der Umsetzung von D-Glucose mit der

⁹⁾ T. E. Timell, W. Enter, F. Spencer und E. J. Soltes, *Canad. J. Chem.* **43**, 2296 (1965); E. Dyer, C. P. J. Glaudemans, M. J. Koch und R. M. Marchessault, *J. chem. Soc. [London]* **1962**, 3361.

4fach molaren Menge *p*-Toluidin unter Umlagerungsbedingungen eine mehr als 5 mal so große Umlagerungsgeschwindigkeit als mit äquimolaren Mengen. Da auch tertiäre Amine ähnlicher Basenstärke (z. B. *N,N*-Dimethyl-anilin, *N,N*-Diäthyl-anilin) eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit bewirken, ist eine zusätzliche Basenkatalyse bei der Amadori-Umlagerung anzunehmen.

Auf die Wirksamkeit des Halbacetal-Sauerstoffs bei der Amadori-Umlagerung weist die stark erhöhte Reaktionsfähigkeit von 3,5-Di-*O*-methyl-*D*-glucuronsäureamid¹⁰⁾ hin. Diese Verbindung mit Furanosestruktur mutarotiert in 0.001 *n* HCl etwa 40 mal so schnell wie die entsprechende nicht methylierte Pyranose. Eine Geschwindigkeitsmessung der *N*-Glykosid-Bildung und -Hydrolyse sowie der Amadori-Umlagerung war nicht möglich, da das *p*-Tolyl-*N*-glykosid bereits beim Zusammengeben der Reaktionspartner bei 0° spontan ausfiel und unter Umlagerungsbedingungen sofort Zersetzung eintrat. Bei 23° verlief die Amadori-Umlagerung etwa 10 mal so schnell wie bei *D*-Glucuronsäureamid, wobei die Reaktion der Furanose von starker Bräunung begleitet war. Somit wird deutlich, daß *N*-Glykosid-Bildung und Amadori-Umlagerung bei Aldosen mit Furanosestruktur wesentlich schneller verlaufen als bei den entsprechenden Pyranosen.

Beschreibung der Versuche

1. 6-Desoxy-*D*-glucose (**1a**): Die Vorschrift in l. c.¹¹⁾ wurde modifiziert: 19.5 g 1,2-*O*-Isopropyliden-3,5-*O*-benzyliden-6-desoxy-*D*-glucose wurden in 1.5 l 0.2 *n* H₂SO₄ 5 Stdn. unter Rückfluß auf 80° erhitzt. Nach Ausäthern und Verdampfen von gelöstem Äther i. Vak. wurde die wäßrige Lösung mit 450 ccm Ionenaustauscher Dowex-1 (HCO₃[⊖]-Form) behandelt, bis keine Sulfat-Ionen mehr nachweisbar waren. Nach Absaugen des Ionenaustauschers und Waschen wurde wie beschrieben¹¹⁾ verfahren. Ausb. nach Umkristallisieren 8.1 g (73%).

2. *N*-Glykosid aus *p*-Toluidin und 6-Desoxy-*D*-glucose (**2a**): 1.0 g **1a**, 800 mg *p*-Toluidin und 0.5 ccm dest. Wasser wurden unter Umrühren 5 Min. im Wasserbad bei 85–90° zusammengeschmolzen, die zusammengebackene Substanz in einem Gemisch aus 6 ccm Äther und 12 ccm absol. Äthanol heiß gelöst und mit Petroläther bis zur Gel-Bildung versetzt. Nach Absaugen wurde mehrere Male mit Äther und Petroläther nachgewaschen, in viel Essigester gelöst, abfiltriert, das Filtrat mit wenig Wasser ausgeschüttelt, die Essigesterlösung dann i. Vak. auf etwa 10 ccm eingengt, mit der gleichen Menge Benzol versetzt und anschließend Petroläther bis zur Trübung zugefügt. Nach Stehenlassen bei 0–5° hatte sich **2a** mikrokristallin abgeschieden. Ausb. 1.1 g (71%); Schmp. 145–147° (Zers.), $[\alpha]_D^{20}$: –53.25° → 62.22° (*c* = 1.6 in 50proz. Äthanol).

C₁₃H₁₉NO₄ (253.3) Ber. C 61.64 H 7.56 N 5.53 Gef. C 61.38 H 7.61 N 5.49

3. *N*-Glykosid aus *p*-Toluidin und *D*-Glucuronsäureamid (**2c**): 10.0 g *D*-Glucuronsäureamid (**1c**) in 250 ccm Wasser wurden mit 20 g *p*-Toluidin in 200 ccm Äther 2 Stdn. geschüttelt. Nach mehrtägigem Stehenlassen bei +3° im Kühlschrank waren farblose, durchsichtige Nadeln ausgefallen, die mehrere Male mit Äther und absol. Äthanol gewaschen wurden. Ausb. 8.4 g, Schmp. 138–140°, $[\alpha]_D^{20}$: –140.2° → 60.0° (*c* = 0.5 in Methanol), $[\alpha]_D^{20}$: –32.6° → 9.2° (*c* = 0.5 in 50proz. Äthanol).

C₁₃H₁₈N₂O₅·H₂O (300.3) Ber. C 51.99 H 6.71 N 9.33 Gef. C 51.60 H 6.76 N 9.22

¹⁰⁾ K. Heyns und W. Balthes, Chem. Ber. **99**, 3477 (1966).

¹¹⁾ P. Karrer und A. Boettcher, Helv. chim. Acta **36**, 571 (1953).

4. *1-p-Toluidino-1,6-didesoxy-D-fructose (3a)*: 5.0 g **1a** wurden 2 Stdn. in 100 ccm Methanol mit 6.5 g *p-Toluidin* und 1 ccm *Eisessig* unter Rückfluß erhitzt. Nach Abkühlen und Eindampfen i. Vak. wurde der dunkle Sirup in 500 ccm Benzol gelöst. Dabei fiel **2a** als gelatinöser Niederschlag aus. Nach Absaugen wurde das Benzol. Filtrat mit 3 mal 150 ccm Wasser ausgeschüttelt, die wäbr. Phase i. Vak. auf 30 ccm eingengt und auf eine Säule mit 50 ccm Ionenaustauscher Dowex-50 (H^{\oplus} -Form) gegeben. Nach Elution mit 0.5 *n* HCl wurden die mit *o*-Dinitrobenzol positiv reagierenden Fraktionen mit Ionenaustauscher Dowex-1 (HCO_3^{\ominus} -Form) neutralisiert. Eventuell adsorbierte Substanz brachte man durch Schütteln des abgetrennten Austauschers mit 50proz. wäßrigem Äthanol wieder in Lösung. Nach Eindampfen der vereinigten Filtrate i. Vak. zur Trockne und Auflösen in wenig Wasser wurde mit Essigester ausgeschüttelt und die Essigesterphase durch Gefriertrocknung zum Sirup eingedampft. Ausb. 250 mg (3.3%).

$C_{13}H_{20}NO_4$ (254.3) Ber. C 61.46 H 7.88 N 5.51 Gef. C 61.95 H 7.72 N 5.32

5. *N-p-Tolyl-D-isoglucoaminuronsäureamid (3c)*: 10 g **1c** (0.05 Mol), 21 g *p-Toluidin* (0.2 Mol) und 5 ccm *Eisessig* wurden in 600 ccm 50proz. Äthanol 2 Stdn. unter einem Stickstoffstrom im Wasserbad auf 80° erhitzt. Nach Abkühlen im Eisbad wurde das Äthanol i. Vak. abgedampft, die wäbr. Lösung 8–9 mal mit Äther ausgeschüttelt, die i. Vak. stark eingengte wäbr. Phase danach auf eine Säule mit Ionenaustauscher CG 50 (H^{\oplus} -Form) aufgetragen und mit dest. Wasser eluiert. Die mit *o*-Dinitrobenzol positiv reagierenden Fraktionen wurden i. Vak. auf dem Wasserbad bei 30–40° eingengt und anschließend im Kühlschrank stengelassen. Der Zucker fiel als mikrokristalliner Niederschlag aus. Ausb. 4.1 g (29%), Schmp. 150° (Zers.), $[\alpha]_D^{20}$: -17.0° ($c = 0.25$ in 50proz. Äthanol), keine Mutarotation.

$C_{13}H_{18}N_2O_5$ (282.3) Ber. C 55.27 H 6.42 N 9.91 Gef. C 55.11 H 6.44 N 9.83

6. *N-Glykosid aus p-Toluidin und 3,5-Di-O-methyl-D-glucuronsäureamid*: Die Lösungen aus 1.0 g *3,5-Di-O-methyl-D-glucuronsäureamid* in 9 ccm Äthanol/Wasser (1:1) sowie von 0.48 g *p-Toluidin* und 0.27 g *Eisessig* in 9 ccm 50proz. Äthanol wurden bei 0° zusammengegeben und die ausgeschiedenen farblosen Kristalle sofort abgesaugt. Nach zweimaligem Waschen mit wenig 50proz. Äthanol und wenig Äther wurde getrocknet. Aus der Mutterlauge wurde nach Eintauchen in Eiswasser weitere Substanz gewonnen. Man löste die vereinigten Niederschläge in wenig warmem Methanol und gab warmen Essigester bis zur ersten Trübung hinzu. Nach 16stdg. Stehenlassen bei 0–5° wurde abgesaugt und getrocknet. Ausb. 700 mg (50%), Schmp. 127–132°, $[\alpha]_D^{20}$: $+30.9^{\circ} \rightarrow +26.0^{\circ}$ ($c = 1$ in Methanol).

$C_{15}H_{22}N_2O_5$ (310.4) Ber. C 58.05 H 7.15 N 9.03 Gef. C 57.94 H 7.07 N 9.08

7. *Messung der N-Glykosid-Bildung*: Lösungen in Wasser/Äthanol (1:1), die jeweils $\frac{1}{16}$ m an Aldose und *p-Toluidin* waren, wurden in einem thermostatisierten 1-dm-Drehrohr auf 80° gehalten und die Drehwerte in einem Polarimeter, Modell Perkin-Elmer 141, bis zum Erreichen konstanter Werte abgelesen. Die diesen Werten entsprechenden Mengen an Aldose und Glykosid im Reaktionsgemisch wurden an Hand von Eichkurven ausgewertet. U. a. wurden folgende Umsätze gemessen (wobei die Drehwerte z. T. durch Lösen entsprechender Mengen Aldose und *p-Tolyl-N-glykosid* reproduziert wurden):

<i>t</i> (Min)	Mol-% N-Glykosid			
	2a	2b	2c	2d
4				3.7
6				5.3
8				6.9
40	4.7	2.7	4.7	
60	6.9	3.3	6.9	
80	8.7	4.2	7.8	

8. Messung der Hydrolyse von *N*-Glykosiden: $1/16$ m Lösungen von *N*-Glykosiden in 50proz. wäßrigem Äthanol wurden wie oben anhand von Eichkurven gemessen:

<i>t</i> (Min)	Mol-% <i>N</i> -Glykosid			
	2a	2b	2c	2d
4				29.3
8				15.7
16				11.5
40	32.7	31.0	25.8	
60	23.1	21.3	16.3	
80	19.0	15.3	11.1	

9. Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten *K* von *N*-Glykosiden: Wäßrige alkoholische Lösungen (1:1), die je $1/16$ m an Aldohexose und Amin bzw. $1/16$ m an *N*-Glykosid waren (Kalium-*p*-tolyl-*N*-*D*-glucuronid kristallisiert mit 1 Mol *p*-Toluidin⁸⁾), wurden bei 80° (thermostatisiert) bis zur Einstellung eines konstanten Enddrehwertes im Polarimeter erhitzt. Ebenso wurden Lösungen behandelt, die anteilig an Ausgangszucker und *N*-Glykosid $1/16$ Mol/l enthielten, wobei die molare Menge an ersterem und an *p*-Toluidin stets gleich waren. Die Berechnung erfolgte nach:

$$K = \frac{\text{Mol-\% } N\text{-Glykosid} \cdot 1600}{\text{Mol-\% Aldohexose} \cdot \text{Mol-\% } p\text{-Toluidin}}$$

U. a. wurden folgende Werte gemessen:

Eingesetztes Gemisch (Mol-%)		Gleichgewichtskonzentration (Mol-%)		<i>K</i>
1a	2a	1a	2a	
50	50	90.7	9.3	4.05
20	80	85.7	14.3	4.08
1b	2b	1b	2b	
80	20	98.0	2.0	1.81
0	100	90.7	9.3	1.82
1c	2c	1c	2c	
50	50	94.0	6.0	2.32
20	80	91.3	8.7	2.13
1d	2d	1d	2d	
60	40	90.7	9.3	2.33
0	100	79.4	20.7	2.32

10. Quantitative Bestimmung von 1-*p*-Toluidino-1-desoxy-*D*-ketohehexosen: 0.2, 0.4, 0.6 . . . 2 ccm einer $1/2$ millimolaren Lösung *Amadori-Produkt* wurden in einem Reagenzglas mit 50proz. Äthanol auf 2 ccm aufgefüllt und mit 2 ccm einer 0.1proz. wäßr. $K_3[Fe(CN)_6]$ -Lösung versetzt. Die weitere Bestimmung wurde unter thermokonstanten Bedingungen nach folgendem Zeitplan vorgenommen:

Zeitpunkt 0: Zugabe unter Schütteln von 10 Tropfen 0.25 *n* NaOH aus einer Mikrobürette, die bei allen Bestimmungen wieder verwendet wurde. Nach 20 Sekunden wurden 2 ccm Ferrisulfat-Lösung (nach Folin und Malmros¹²⁾) hinzugefügt, wobei die Bildung von Berliner Blau eintrat. Anschließend wurde mit 10 ccm bidest. Wasser verdünnt.

Nach genau 20 Min.: Ablesen der Extinktion bei 690 m μ in 1-cm-Küvetten gegen eine Bezugslösung von 2 ccm 50proz. Äthanol, die ebenso wie die Proben behandelt wurde.

¹²⁾ O. Folin und H. Malmros, J. biol. Chemistry **83**, 119 (1929).

11. *Messung der Umsetzung von 6-Desoxy-D-glucose (1a), D-Glucose (1b), D-Glucuronsäureamid (1c) und Kalium-D-glucuronat (1d) mit p-Toluidin bei 80° unter den Bedingungen der Amadori-Umlagerung:* Je $\frac{1}{16}$ Mol Aldose, p-Toluidin und Eisessig wurden in einen 25-ccm-Meßkolben eingewogen und mit 50proz. Äthanol zur Marke aufgefüllt. Von dieser Lösung wurde je 1 ccm in etwa 5 ccm fassende Ampullen pipettiert. Die Ampullen wurden in Trockeneis/Methanol eingefroren, zugeschmolzen, bei -80° aufbewahrt und 1 Stde. vor Umsetzung auf Raumtemp. gebracht. Anschließend wurden sie in einem Thermostaten auf $+80^\circ$ erhitzt, zu festgesetzten Zeiten je 2 Ampullen entnommen und diese auf -80° abgekühlt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 50proz. Äthanol so verdünnt, daß nach Entnahme von jeweils 1 ccm und Anfärbung Extinktionswerte zwischen 0.3 und 0.8 erhalten wurden. Die Mengen an umgelagertem Produkt wurden von den entsprechenden Eichkurven abgelesen.

Folgende Umsätze wurden erzielt:

<i>t</i> (Min)	Mol-% umgelagertes Produkt			
	3a	3b	3c	3d
2	2.5	3.9	7.7	10.8
22	7.4	12.8	38	46.8
52	13.6	24.2	51.8	52.5
Umsatz bei Reaktionsende	27.4	44.9	55.2	56.1

[169/70]