

## 2-AMINO-2-DESOXY-6-*O*-(D-GLYKOFURANOSYLURONO-6,3-LACTON)-D-GALAKTOPYRANOSEN\*

ALMUTH KLEMER, GUNTHER MÜLLER UND ALFRED LUDWIG†

*Organisch-Chemisches Institut der Universität Münster, 44 Münster (Deutschland)*

(Eingegangen am 20. Juli 1973, angenommen in revidierter Form am 20. November 1973)

### ABSTRACT

Condensation of 2-amino-2-deoxy-D-galactopyranose with D-glucuronic acid or D-mannurono-6,3-lactone in the presence of hydrochloric acid gave the corresponding 2-amino-2-deoxy-6-*O*-(D-glycofuranosylurono-6,3-lactone)-D-galactopyranoses. The  $\alpha$ -D configuration of the disaccharide derived from D-glucuronic acid was determined by its resistance towards  $\beta$ -D-glucuronidase.

### ZUSAMMENFASSUNG

Aus 2-Amino-2-desoxy-D-galaktopyranose und D-Glucuronsäure oder D-Mannurono-6,3-lacton wurden durch Kondensation in Gegenwart von Salzsäure die entsprechenden 2-Amino-2-desoxy-6-*O*-(D-glykofuranosylurono-6,3-lacton)-D-galaktopyranosen erhalten und in ihre Hexaacetate übergeführt. Die  $\alpha$ -D-Konfiguration des sich von der D-Glucuronsäure ableitenden Disaccharides ergibt sich aus der Resistenz gegenüber  $\beta$ -D-Glucuronidase.

### EINLEITUNG

Wie berichtet<sup>1</sup>, fanden wir im Hydrolysat von Chondroitinsulfatpeptiden aus menschlicher Aorta außer Aminosäuren und 2-Amino-2-desoxy-D-galaktose drei unbekannte Komponenten, die wir seinerzeit als U<sub>1</sub>, U<sub>2</sub> und U<sub>3</sub> bezeichneten (Abb. 1). Modellversuche zu diesem Befund zeigten, daß zwei davon (U<sub>1</sub> und U<sub>3</sub>) auch aus 2-Amino-2-desoxy-D-galaktose- und D-Glucuronsäure unter den Bedingungen der sauren Hydrolyse des Mucopolysaccharids und der Aufarbeitung für die Aminosäure-Analyse entstehen (Abb. 2). Es handelt sich also bei U<sub>1</sub> und U<sub>3</sub> um Sekundärprodukte, die die Bausteinanalyse der Chondroitinschwefelsäure verfälschen. Weitere Versuche ergaben, daß die Ausbeute an U<sub>1</sub> auf etwa 50% und an U<sub>3</sub> auf 25% bezogen auf die eingesetzte 2-Amino-2-desoxy-D-galaktose gesteigert werden kann, wenn man von einem Gemisch aus Aminosucker (1 Teil) und Glucuronsäure (3 Teile)

\*Reaktionen von 2-Amino-2-desoxyhexosen mit Alduronsäuren. Teil II.

†Dipl.-Chem. A. Ludwig verstarb unerwartet am 23. November 1973. Diese Veröffentlichung ist dem Andenken dieses begabten Mitarbeiters gewidmet.

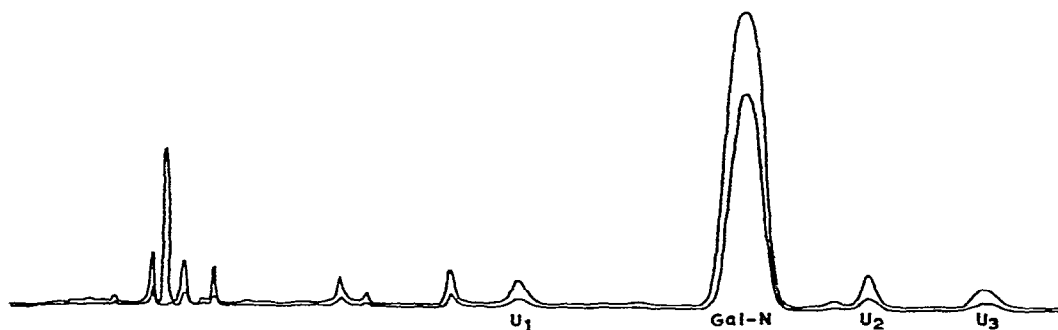


Abb 1 Aminosaurespektrum des Hydrolysats von Chondroitinsäurepeptid aus menschlicher Aorta

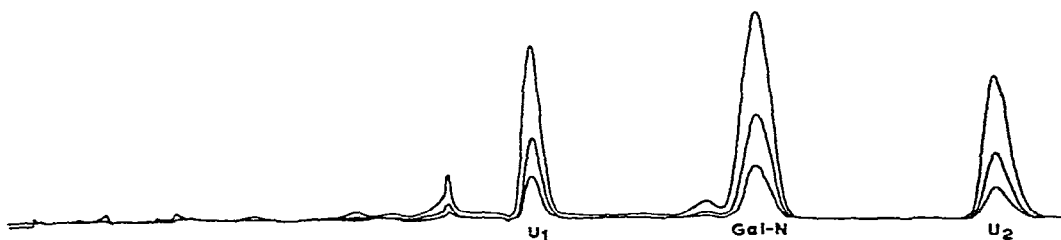
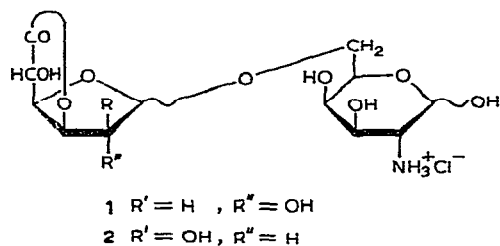


Abb 2 Aminosaurespektrum der Reaktion von 2-Amino-2-desoxy-D-galaktose mit D-Glucuronsäure

ausgeht, dieses mit 6M Salzsäure bei 40° *in vacuo* einengt und den Rückstand *in vacuo* bei Raumtemperatur völlig zur Trockne dampft<sup>2</sup>. Die Verbindungen U<sub>1</sub> und U<sub>3</sub> bilden sich also unter den bekannten Bedingungen der H<sup>+</sup>-katalysierten Dehydratisierung

Auf diesem Wege läßt sich 2-Amino-2-desoxy-D-galaktose auch mit D-Mannuronsäure umsetzen. Es werden ebenfalls zwei neue Produkte gebildet, die in ihren Retentionszeiten etwa U<sub>1</sub> und U<sub>3</sub> entsprechen. Wesentlich schwieriger ist es, 2-Amino-2-deoxy-D-glucose zur Reaktion zu bringen. Hierfür muß man eine Temperatur von 100° wählen. Dabei tritt aber schon Zersetzung ein, und man findet unter einer Reihe von Produkten nur sehr kleine Mengen von U<sub>1</sub>- und U<sub>3</sub>-Analogen



Wie im Folgenden gezeigt wird, handelt es sich bei den Verbindungen des Typs  $U_3$  um (1→6)-verknüpfte Disaccharide und zwar um 2-Amino-2-desoxy-6-( $\alpha$ -D-glucofuranosylurono-6,3-lacton)-D-galaktopyranose (1) und 2-Amino-2-desoxy-6-(D-mannofuranosylurono-6,3-lacton)-D-galaktopyranose (2)

#### ERGEBNISSE UND DISKUSSION

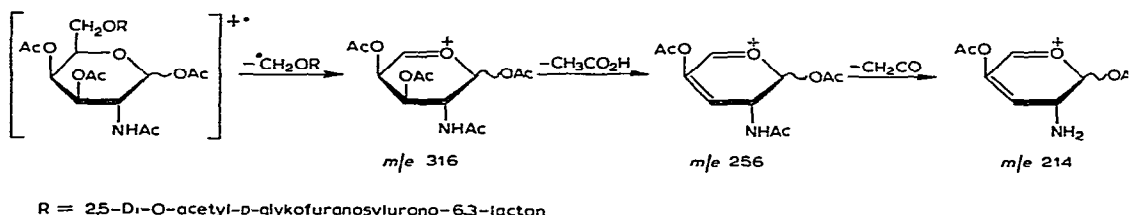
Wie man dem Aminosäurespektrum entnehmen kann (vgl. Abb. 2), haben  $U_1$  und  $U_3$  und 2-Amino-2-desoxy-D-galaktose recht verschiedene Retentionszeiten. Entsprechendes gilt für die D-mannuronsäurehaltigen Produkte. Wir führten deshalb die präparative Trennung unter ähnlichen Bedingungen durch, wie sie im Aminosäure-Analysator vorliegen. Am besten gelingt die Trennung an stark sauren Kationenaustauschern mit 0,1M Salzsäure oder einem Pyridin-Essigsäure-Puffer. Die Verbindungen 1 und 2 wurden so als amorphe, aber analytisch reine und chromatographisch einheitliche Substanzen in Form ihrer Hydrochloride oder Acetate erhalten (über die Isolierung und die Struktur von  $U_1$  und seinem Mannuronsäure-Analogen wird später berichtet).

Die Verbindungen 1 und 2 verhalten sich in den meisten Punkten gleichartig. Beide reduzieren Fehling'sche Lösung. Sie sind recht stabil gegenüber wäßrigen Säuren. Mit 2M Salzsäure tritt bei Raumtemperatur nach einigen Stunden noch keine Spaltung ein, erst mehrstündiges Erhitzen mit 2M Salzsäure auf 100° führt zur vollständigen Hydrolyse unter Bildung von molaren Mengen 2-Amino-2-desoxy-D-galaktose und der betreffenden Uronsäure. Elektrophoretische Untersuchungen zeigen, daß der Uronsäure-Rest lactonisiert vorliegt, denn 1 und 2 verhalten sich wie Basen, die etwa halb so weit wie 2-Amino-2-desoxy-D-galaktose wandern. Mit 0,1M Natriumhydroxyd wird ohne weitere Schädigung des Kondensationsproduktes der Lactonring geöffnet. Die Disaccharid-Säuren erscheinen im Aminosäure-Analysator und Elektropherogramm als einheitliche Substanzen, die sich wie Monoamino-monocarbonsäuren verhalten. Durch Zugabe von 2M Salzsäure läßt sich ohne weiteres der Lactonring wieder schließen und man erhält den Typ  $U_3$  zurück. Insgesamt zeigen diese Befunde, daß es sich bei 1 und 2 um reduzierende Disaccharide aus Aminozucker und Uronsäurelacton handelt.

Die Verbindungen 1 und 2 lassen sich mit Pyridin-Acetanhydrid in guten Ausbeuten in ihre kristallinen Acetate 3 und 4 überführen. Diese enthalten sechs Acetylgruppen. Das bedeutet, daß der Lactonring bei der Acetylierung geschlossen blieb. Dies zeigt auch das IR-Spektrum mit der C=O-Bande bei  $1825\text{ cm}^{-1}$ . Im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum erkennt man fünf *O*-Acetylgruppen im Bereich von  $\tau$  7,9–8 und eine äquatoriale *N*-Acetylgruppe bei  $\tau$  8,17 (cf. Zitat 3).

Aus den Massenspektren der beiden Disaccharid-Acetate 3 und 4 für deren Deutung die gut untersuchten Fragmentierungswege von acetylierten Aminozuckern<sup>4</sup> und acetylierten Hexose-Derivaten<sup>5</sup> herangezogen werden konnten, ergibt sich, daß mit Sicherheit der Uronsäure-Rest nicht am C-1 oder C-3 des Aminozuckers angreift (Schema 1). Vielmehr weisen die Bruchstücke mit den Massenzahlen 316,

256, 214, die überwiegend mit hohen Intensitäten in gleicher Weise in dem Massenspektrum von **3** und **4** auftreten, auf eine (1→6)-Verknüpfung hin. Zur Absicherung dieser Aussage haben wir die Struktur der Disaccharide (**1**, **2**) auf chemischem Wege bewiesen.



Schema 1

Die Reduktion von **2** mit Natriumborhydrid verlief vollständig und ergab 2-Amino-2-desoxy-6-(D-mannofuranosyl)-D-galaktitol (**5**). Verbindung **5** erwies sich im Aminosäureanalysator und im Elektropherogramm als einheitliche Substanz, die deutlich vom Ausgangs-Disaccharid **2** verschieden liegt. Die Hydrolyse von **5** lieferte 2-Amino-2-desoxy-D-galaktitol und D-Mannose. Damit ist sicher, daß in **2** die Disaccharid-Bindung am C-1 des Mannuronsäure-lactons angreift.

Nicht ganz so glatt ließ sich das analog aufgebaute **1** reduzieren. Stets fanden wir im Hydrolysat außer den erwarteten Produkten (2-Amino-2-desoxy-D-galaktitol und D-Glucose) noch etwas D-Glucuronsäure (bzw. das Lacton), was auf eine nicht vermeidbare partielle Verseifung des Lactonringes unter den Reduktionsbedingungen hinweist. Auch die Reduktion des Disaccharid-Methylesters lieferte kein besseres Resultat (für die Beurteilung der Struktur von **1** ist dieser Befund jedoch ohne Bedeutung).

Die (1→6)-Disaccharid-Bindung in **1** wurde weiterhin durch Methylierung bestätigt. Wir gingen dazu von **3** aus und methylierten zunächst mit Methyljodid-Silberoxid lediglich an der N-Acetylgruppierung. Anschließend wurden unter stärker basischen Bedingungen mit Bariumoxid-Bariumhydroxid-Methyljodid alle Hydroxylgruppen freigelegt und vollständig veräthert<sup>7</sup>. Die Hydrolyse des permethylierten **1** lieferte in Übereinstimmung mit der aus dem Massenspektrum abgeleiteten (1→6)-Verknüpfung 2-Desoxy-3,4-di-O-methyl-2-methylamino-D-galaktopyranose, die wir im Aminosäureanalysator bestimmten<sup>8</sup>.

Die Konfiguration der glykosidischen Bindung in **1** läßt sich sehr einfach aus dem Verhalten gegenüber  $\beta$ -D-Glucuronidase ableiten. Wie die Untersuchungen von Yoshida und Kato<sup>9</sup> zeigten, werden  $\beta$ -D-Glykoside der pyranoiden und furanoiden Glucuronsäure in gleicher Weise gespalten, nicht aber die Glykoside des Glucuronolactons. Es wurde daher zunächst mit Base der Lactonring von **1** verseift. Anschließend wurde mit  $\beta$ -D-Glucuronidase bei pH 4,5 inkubiert. Es trat keine Spaltung ein. Zur Absicherung dieses Befundes überzeugten wir uns, daß Methyl- $\beta$ -D-glucofuranosylurono-6,3-lacton nach analoger Vorbehandlung gespalten wird.

Wie bekannt, zeigen 2-Amino-2-desoxyhexosen in saurer Lösung gegenüber Hydroxylverbindungen eine sehr geringe Tendenz zur Glykosidbildung<sup>10</sup>. Dies ist auf den Abschirmeffekt zurückzuführen, den die protonierte Aminogruppe auf das Glykosidzentrum ausübt. So ist es nicht möglich, 2-Amino-2-desoxyzucker mit methanolischer Salzsäure in Glykoside zu überführen<sup>11</sup>. Ebenso erfolglos verliefen Versuche zur  $H^+$ -katalysierten Selbstkondensation von 2-Amino-2-desoxy-D-glucose<sup>12, 13</sup>. Auch eine Umsetzung mit D-Galaktose zu 2-Amino-2-desoxy-D-glucosehaltigen Oligomeren ließ sich nicht erzielen<sup>13</sup>. Demgegenüber zeigen unsere Versuche, daß die C-6-Hydroxylgruppe der 2-Amino-2-desoxy-D-glucose unter ähnlichen Bedingungen durchaus zur Reaktion mit dem C-1-Carboniumion des D-Glucose- oder D-Mannuronsäurelactons befähigt ist. Der Befund steht in gewisser Analogie zu einer Umsetzung von 2-Amino-2-desoxy-D-glucose mit D-Mannose, wobei allerdings unter drastischen Bedingungen (Erhitzen auf 130°) unter anderem 2-Amino-2-desoxy-6-(D-mannosyl)-D-glucopyranose entstand<sup>14</sup>.

#### EXPERIMENTELLER TEIL

*Allgemeine Methoden* — Das Einengen von Lösungen erfolgte im Rotationsverdampfer bei 40–50°, falls nicht anders vermerkt. Schmelzpunkte wurden mit einem Thermopan-Heiztischmikroskop der Firma C. Reichert, Wien, bestimmt, Drehwerte mit einem Perkin-Elmer Polarimeter 141 mit einer 1 dm-Kuvette. Sämtliche Papierchromatogramme wurden nach der absteigenden Methode hergestellt. Als Laufmittel<sup>15</sup> diente Pyridin–Äthylacetat–Eisessig–Wasser (5:5:1:3) und zur Kammersättigung diente Pyridin–Äthylacetat–Wasser (11:40:6), Laufzeit 9 h, Streifenlänge 40 cm. Sonstige reduzierende Aminozucker-Derivate wurden mit Ninhydrin bei 120°, Zucker mit Anilinchthalat bei 120° angefarbt. Analytische elektrophoretische Untersuchungen wurden an einer Apparatur nach Wieland und Pfeleiderer durchgeführt.

Die Untersuchungen der ninhydrinpositiven Substanzen wurden an den Aminosäureanalysatoren Spinco und Unicrom der Firma Beckman vorgenommen. Programm für basische Komponenten: Säulenfüllung 0,9 cm × 6,8 cm, Harzsorte M 81, Puffersystem Natriumcitrat–Salzsäure, 0,5M an Natriumionen, pH 5,28 ± 0,02. Programm für (a) saure und (b) neutrale Komponenten: Säulenfüllung 0,9 cm × 45,5 cm, Harzsorte M 72, (a) Puffer Natriumcitrat–Salzsäure 0,2M an Natriumionen, pH 3,25 ± 0,01, (b) Puffer Natriumcitrat–Salzsäure 0,2M an Natriumionen, pH 4,25 ± 0,02, Pufferwechsel nach 87 min.

Die Analyse von 2-Desoxy-2-methylamino-D-galaktopyranose wurde am Aminosäureanalysator, Modell Unicrom, vorgenommen<sup>8</sup>. Unter diesen Bedingungen betrug die Retentionszeit des Phenylalanins 195 min.

Die Kohlenhydratspektren wurden an einem Auto-Analyser der Firma Technicon, DRW 0048, aufgenommen. Zur Aufnahme der IR-Spektren wurde ein Perkin-Elmer-Infracord-Spektrometer vom Typ 257 benutzt. Die Substanzen wurden in Kaliumbromid-Preßlingen gegen Kaliumbromid gemessen. Die <sup>1</sup>H-

Kernresonanzspektren wurden an Varian A 56/60 und HA 100 Spektrometern gemessen. Als Lösungsmittel diente Chloroform-*d* und Tetramethylsilan als innerer Standard.

Massenspektren wurden mit einem Gerät Typ SM 1 B der Firma Varian-MAT aufgenommen. Für die photometrische Bestimmung wurde das Photometer Spectronic 20 der Firma Bausch und Lomb verwendet. Die Messung erfolgte in Glaskuvetten von 1 × 11 cm Querschnitt.

*2-Amino-2-desoxy-6-O-(α-D-glucofuranosylurono-6,3-lacton)-D-galaktopyranose-hydrochlorid (1)* — 2-Amino-2-desoxy-D-galaktose-hydrochlorid (500 mg) und D-Glucuronsäure (1,0 g) wurden in 6M Salzsäure (10 ml) gelöst, bei 40° und 18 Torr völlig zur Trockne eingedampft und 15 min unter diesen Bedingungen belassen. Sodann wurde der Rückstand erneut mit 6M Salzsäure (10 ml) aufgenommen und das Eindampfen und Trocknen wiederholt. Nach dem Aufnehmen in Wasser und Klären mit Kohle wurde von einem aliquoten Teil die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches im Aminosäure-Analysator quantitativ bestimmt. Die Ausbeute an **1** schwankte zwischen ca. 20% und 25%.

Die wäßrige Lösung des Reaktionsgemisches wurde über den Ionenaustauscher Dowex 50 W-X2 (H<sup>+</sup>, mesh 200–400, Säule 2,2 cm × 120 cm), gegeben und mit 0,1M Salzsäure eluiert. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 100 mg/h. Nach 12 h wurde **1** aufgefangen. Die **1**-enthaltende Fraktion wurde mit Dowex 1 X2 (Ac<sup>−</sup>, mesh 50–100) behandelt, wobei für 5 ml Lösung 1 ml Harz verwendet wurden. Das Eluat wurde mit 2M Salzsäure (2 ml) versetzt, bei 1 Torr und einer Badtemperatur von 10° auf 20 ml eingengt und **1** wurde dann mit Athanol (100 ml) als amorphes Monohydrat gefällt (65 mg, 7,3%),  $[\alpha]_D^{22} + 78^\circ$  (c 1, Wasser).

*Anal.* Ber. für C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>ClNO<sub>11</sub>: C, 36,79, H, 5,66, N, 3,57. Gef. C, 36,68, H, 5,87, N, 3,57.

*2-Amino-2-desoxy-6-O-(D-mannofuranosylurono-6,3-lacton)-D-galaktopyranose-acetat (2)* — 2-Amino-2-desoxy-D-galaktose (300 mg) und D-Mannurono-6,3-lacton (500 mg) wurden in 6M Salzsäure (5 ml) gelöst, bei 18 Torr und 50° weitgehend eingedampft und über Phosphorpentaoxid im Vakuumexsikkator getrocknet. Der halbkristalline Rückstand wurde in 2M Essigsäure (5 ml) gelöst und mit Aktivkohle geklärt (Ausbeute-Bestimmung von **2** im Aminosäure-Analysator 30%). Zur Isolierung von **2** wurde die Lösung an Beckman Kationenaustauscher 50 A (Säule 1,9 cm × 50 cm, Säulentemperatur 35°) mit einem Pyridin-Acetat-Puffer pH 5 (0,455M an Essigsäure) chromatographiert. Die Durchflußmenge betrug etwa 110 ml/h. Die **2**-enthaltende Fraktion erschien nach 260 min. Sie wurde *in vacuo* eingengt und gefriergetrocknet (40 mg, 6,5%),  $[\alpha]_D^{22} + 11^\circ$  (c 1, Wasser).

*Anal.* Ber. für C<sub>14</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>12</sub>: C, 42,30, H, 5,80, N, 3,52. Gef. C, 41,80, H, 6,16; N, 3,58.

*Baustein-Analysen* — Für die Aminosäure-Bestimmung wurden die Verbindungen **1** und **2** (je 5 mg) genau eingewogen und mit 2M Salzsäure (5 ml) 2 h unter Rückfluß hydrolysiert, die Lösung bei 18 Torr im Exsikkator über Kaliumhydroxyd eingedampft, der Rückstand in Citratpuffer (0,2N an Natriumionen, pH 2,28) auf-

genommen und im Meßkolben auf 5 ml aufgefüllt. Der Aminosuckergehalt wurde von 1 ml dieser Lösung im Aminosäureanalysator Beckman Spinco oder Unichrom bestimmt.

Für die Uronsäure-Bestimmung nach Dische<sup>17</sup> wurden 1 und 2 (je 1,0 mg) eingewogen und im Meßkolben in Wasser (10 ml) gelöst. Für die Bestimmung wurde je 1 ml verwendet. Die Eichkurve wurde mit D-Glucurono-6,3-lacton gemessen.

**2-Acetamido-1,3,4-tri-O-acetyl-2-desoxy-(2,5-di-O-acetyl-D-glykofuranosylurono-6,3-lacton)- $\alpha$ -D-galaktopyranose (3 und 4)** — Verbindungen 1 oder 2 (200 mg) wurden in absolutem Pyridin (6 ml) gelöst, gekühlt und unter Eiskühlung Acetanhydrid (6 ml) hinzugegeben. Nach anfänglichem Rühren bis zur vollständigen Lösung wurde 24 h bei Raumtemperatur stengelassen und sodann in Eiswasser (50 ml) gegossen. Verbindung 3 fiel aus Wasser amorph aus. Nach dem Absaugen, Waschen mit Wasser und Trocknen *in vacuo* über Kaliumhydroxid und Schwefelsäure wurde aus Acetonitril (*ca* 10 ml) umkristallisiert (180 mg, 67%), Schmp 278°,  $[\alpha]_D^{22} +135^\circ$  (c 1, Acetonitril), i r -Spektrum 3400 (NH), 1825 (C=O, Lacton), 1750 (OAc), 1675 u 1560 (Amid I, Amid II)  $\text{cm}^{-1}$ , m s (Kathode 300 A, Quelle 200°) *m/e* 546 (26), 529 (27), 487 (27), 470 (10), 427 (31), 367 (14), 316 (11), 303 (10), 286 (11), 256 (50), 243 (32), 214 (28), 114 (100).

*Anal* Ber für  $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{NO}_{16}$  C, 48,89, H, 5,30, N, 2,37 Gef C, 49,07, H, 5,17, N, 2,25

**Aufarbeitung von 4** Die wäßrige Lösung wurde mehrmals mit Essigester extrahiert, die Extrakte mit Natriumsulfat getrocknet und *in vacuo* eingedampft. Der trockene Rückstand wurde in wenig Aceton aufgenommen und durch Zugabe von Äther wurde kristallines 4 erhalten (80 mg, 33%), Schmp 136–138°,  $[\alpha]_D^{22} +67,8^\circ$  (c 1, Essigester), i r -Spektrum In den angegebenen Banden identisch mit 3, m s *m/e* 589 (1,5), 546 (27); 529 (3); 487 (66); 469 (77), 316 (39), 256 (97), 214 (87), 156 (48), 126 (100), 114 (120).

*Anal* Ber für  $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{NO}_{16} \cdot \text{C}$ , 48,89, H, 5,30, N, 2,37 Gef C, 48,30, H, 5,32, N, 2,38

**2-Amino-2-desoxy-6-O-(D-mannofuranosyl)-D-galactitol (5)** — Verbindung 2 (50 mg) wurde in Wasser (5 ml) gelöst und langsam mit Natriumborhydrid (40 mg) versetzt. Nach mehrstündigem Stehenlassen bei Raumtemperatur wurde mit Essigsäure angesäuert, die Lösung eingeeengt und mehrmals mit Methanol *in vacuo* abgedampft. Ein Elektropherogramm in Pyridin-Acetat-Puffer, pH 3,6 (10 ml Pyridin, 100 ml Eisessig, auf 1 l mit Wasser auffüllen) zeigte bei 5 V/cm nach 90 min einen Fleck mit einem  $R_F$  0,48 (2-Amino-2-desoxy-D-galaktose wurde als Bezugssubstanz,  $R_F$  1, aufgetragen). Im Aminosäurespektrum (Programm für basische Aminosäuren) hatte 5 eine Retentionszeit von 18 min (2 zum Vergleich 29 min).

Verbindung 5 (20 mg) wurde mit 6M Salzsäure (5 ml) für 15 min bei 100° hydrolysiert. Das Hydrolysat zeigte eine negative Fehling'sche Probe. Das Hydrolysenprodukt 2-Amino-2-desoxy-D-galaktitol wurde im Aminosäureanalysator (Programm für basische Aminosäuren) als einzige ninhydrinpositive Substanz erfaßt.

(Retentionszeit 22 min) Mit dem Kohlenhydratanalysator konnte im Hydrolysat D-Mannose nachgewiesen werden (Retentionszeit 4,5 h)

*Reduction von 2-Amino-2-desoxy-6-O-(methyl- $\alpha$ -D-glucofuranosyluronat)-D-galactopyranose* — Verbindung 1 (10 mg) wurde in Wasser (1 ml) gelöst, Methanol (5 ml) hinzugefügt und langsam eine ätherische Lösung von Diazomethan zugetropft. Die Hauptreaktion war nach 10 min beendet (Verschwinden der gelben Farbe). Nach 1 und nach 6 h wurde noch jeweils Diazomethanlösung (2 ml) zugefügt. Nach weiteren 3 h wurde *in vacuo* bis auf ca. 3 ml eingeeengt. Die wäßrige Lösung des Esters wurde unter Eiskühlung in eine Lösung von Natriumborhydrid (50 mg) in Wasser (2,5 ml) getropft. Nach 12-stündigem Stehenlassen wurde, wie bei 5 beschrieben, aufgearbeitet und hydrolysiert. Die Bestimmung des 2-Amino-2-desoxy-D-galactitols erfolgte wie bei 5 beschrieben im Aminosäureanalysator. Der Nachweis von D-Glucose, D-Glucuronsäure und D-Glucuronsäurelacton wurde papierchromatographisch im beschriebenen Laufmittel durchgeführt.

*2-Desoxy-3,4-di-O-methyl-2-methylamino-D-galactopyranose* — Verbindung 3 (50 mg) wurde in *N,N*-Dimethylformamid (1 ml) gelöst, mit Methyljodid (0,5 ml) versetzt und bei höchstens 30° unter Rühren Silberoxid (400 mg) eingetragen. Nach 12-stündigem Rühren wurde mit Chloroform (50 ml) versetzt, die ausgefallenen Silbersalze wurden unter Zugabe von etwas Aktivkohle abfiltriert. Die Chloroformlösung wurde 3 mal mit Wasser (je 5 ml) gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und *in vacuo* auf 2–3 ml eingeeengt. Anschließend wurde mit Methyljodid (0,5 ml) und Bariumhydroxid-Öctahydrat (150 mg) bei 0° 5 h methyliert, danach weiteres Methyljodid (0,2 ml) und Bariumoxid (200 mg) hinzugefügt und unter Rühren 2 h bei 0° und sodann 20 h bei Raumtemperatur umgesetzt. Nach Zusatz von *N,N*-Dimethylformamid und wenig Aktivkohle wurde filtriert, mit dem gleichen Lösungsmittel gewaschen und *in vacuo* eingedampft. Der Rückstand wurde mit 2M Salzsäure (2 ml) bei 100° 1 h hydrolysiert, die Säure bei 40° abgezogen und der Rückstand in 2,5 ml Puffer, pH 2,28, gelöst und ein aliquoter Teil zur Bestimmung im Aminosäure-Analysator entnommen. 2-Desoxy-3,4-di-O-methyl-2-methylamino-D-galactopyranose wurde im Aminosäureanalysator durch die Retentionszeit von +12 min (Standard Phenylalanin) identifiziert.

*Einwirkung von  $\beta$ -D-Glucuronidase auf 2-Amino-2-desoxy-6-O-( $\alpha$ -D-glucofuranosylurono-6,3-lacton)-D-galactopyranose (1)* — Das Disaccharid 1 (5 mg) wurde in Wasser (1 ml) gelöst und mit verdünnter Natronlauge deutlich alkalisch gemacht (pH-Papier). Danach wurde mit verdünnter Essigsäure ein pH-Wert von 4–5 eingestellt, 0,2M Acetatpuffer (3,5 ml) zugegeben und die Lösung geteilt. Der eine Teil wurde mit einer Suspension von  $\beta$ -D-Glucuronidase (Fa. Boehringer, Mannheim Nr. 15472) 15 min bei 37° inkubiert, der andere zum Vergleich ohne Enzymlösung den gleichen Bedingungen unterworfen. Es trat keine Spaltung ein. Bestimmung: Im Aminosäure-Analysator ließ sich kein D-Galaktosamin nachweisen.

Die Aktivität des Enzyms wurde an Methyl- $\beta$ -D-glucofuranosid-6,3-lacton nach analogen Vorbehandlungen geprüft. Es trat vollständige Spaltung ein.



DANK

Wir danken dem Landesamt für Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen und dem Verband der chemischen Industrie "Fonds der Chemie" für die finanzielle Unterstützung

#### LITERATUR

- 1 A KLEMER UND D MEMPEL, *Z Naturforsch*, B, 20 (1965) 553
- 2 A KLEMER UND G MULLER, *Tetrahedron Lett*, (1972) 2313
- 3 F W LICHTENTHALER UND P. EMIG, *Carbohydr Res*, 7 (1968) 121
- 4 K HEYNS, G KIESSLING UND D MULLER, *Carbohydr Res*, 4 (1967) 452
- 5 K HEYNS UND D MULLER, *Tetrahedron Lett*, (1966) 6061
- 5 K BIEMANN, D C DEJONGH UND H K SCHNOES, *J Amer Chem Soc*, 85 (1963) 1763
- 6 R KUHN, H TRISCHMANN UND I LOW, *Angew Chem*, 67 (1955) 32
- 7 R KUHN, H H BAER UND A SEELIGER, *Ann*, 611 (1958) 236
- 8 P A J GORIN UND A J FINLAYSON, *Carbohydr Res*, 18 (1971) 269, 281
- 9 K KATO, K YOSHIDA UND H TSUHAMOTO, *Chem Pharm Bull* (Tokyo) 12 (1964) 670
- 10 A B FOSTER UND M STACEY, *Advan Carbohydr Chem*, 7 (1952) 247.
- 11 R C G MOGRIDGE UND A NEUBERGER, *J Chem Soc*, (1938) 745
- 12 A B FOSTER UND D HORTON, *J Chem Soc*, (1958) 1890
- 13 F MICHEEL UND A JANSEN, unveröffentlicht
- 14 S A BARKER, K MURRAY UND M STACEY, *Nature*, 191 (1961) 142
- 15 F G FISCHER UND H DÖRFEL, *Z Physiol Chem*, 301 (1955) 224
- 16 S ROSEMAN UND J LUDOWIEG, *J Amer Chem Soc*, 76 (1954) 301.
- 17 Z DISCHE, *J Biol Chem*, 167 (1947), 189