

Tag langsam noch 5 ccm. Man filtrierte unter Zugabe von Salzsäure in CO_2 -Atmosphäre und zerlegte sofort mit Ammoniak-Chloroform. Dessen Rest krystallisierte aus Aceton: $0.33 + 0.08 + 0.05$ g oder 69% d. Th. Man löste aus Aceton zu kurzen Nadeln um, wobei gewisse Verluste eintraten. Schmp. um 305° (früher 300°).

$[\alpha]_D^{20}$: $-265^\circ/d$ (CHCl_3) (wie zuvor).

Das Jodmethylat blieb amorph, HClO_4 -, HCl -, H_2SO_4 -Salze waren amorph oder leicht löslich.

265. Burckhardt Helferich und Robert Mittag: Über neuartige Verbindungen aus Zucker und Aminosäuren.

[Aus d. Chem. Laborat. d. Universität Leipzig.]

(Eingegangen am 27. Juni 1938.)

In mehreren Arbeiten ist darauf hingewiesen worden, daß im Süßmandel-Emulsin vielleicht ein für die Wirksamkeit wesentliches Stück des Ferments ein Zucker oder eine zuckerähnliche Gruppe sein kann¹⁾. Auch die bisher reinsten Präparate dieses Ferments haben einen unerwartet hohen Gehalt an Kohlehydraten, die sich nach der Methode von M. Sörensen nachweisen lassen. Da andererseits diese bisher reinsten Präparate auch erhebliche Mengen an Stickstoff enthalten und typische Eiweißreaktionen geben, so scheint es uns von Interesse zu sein, Verbindungen, die gleichzeitig Zucker und Aminosäuren sind, herzustellen und ihre Eigenschaften zu studieren.

Es sind verschiedene Typen für solche Substanzen denkbar. Am besten bekannt, durch die Untersuchungen von Euler, Maurer und andern, sind die *N*-Glykoside der Aminosäuren. Sie zeichnen sich durch leichte Hydrolysierbarkeit (in Zucker und Aminosäuren) aus, stellen also nur sehr lockere Verbindungen zwischen diesen beiden Teilen dar.

Bei dieser Gelegenheit sei erwähnt, daß, nach Arbeiten von Hrn. S. Petersen im hiesigen Institut, an den *N*-Glucosiden des Glykokolls²⁾ und des Sarkosinamids³⁾ sich eine Spaltbarkeit durch unsere Süßmandelpräparate nicht nachweisen ließ, da die Substanz im gleichen Milieu selbst bei 0° auch ohne Fermentzusatz ebenso schnell gespalten wird.

Eine weitere Möglichkeit der Verbindung zwischen Zucker und Aminosäuren stellen die *O*-Glykoside der Oxyaminosäuren dar. Das *O*- β -*D*-Glucosid des Tyrosins ist vor einiger Zeit hergestellt und zu interessanten Versuchen verwandt worden⁴⁾. Versuche zur Herstellung eines *O*-Serin-glucosids sind im hiesigen Institut im Gange. Auch *S*-Glucoside des Cysteins sind möglich.

Ein weiterer Typ entsteht, wenn die Carboxylgruppe einer Aminosäure esterartig in ein Hydroxyl eines Zuckers oder säureamidartig in die Amino-Gruppe eines Aminozuckers, z. B. des Glucosamins, eingreift.

Weiter ist auch die ätherartige Verknüpfung zwischen dem Hydroxyl einer Oxyaminosäure und einem alkoholischen Hydroxyl eines Zuckers denkbar oder die entsprechende Bindung an den Schwefel des Cysteins.

Wir haben uns in der vorliegenden Arbeit noch eine andere Möglichkeit ausgesucht und, in einem ersten einfachen Modell, eine Substanz hergestellt,

¹⁾ B. Helferich, W. Richter u. S. Grünler, Ber. Verh. sächs. Akad. Wiss. Leipzig, math.-physische Kl. **99**, 385 [1938]. ²⁾ H. v. Euler u. K. Zeile, A. **487**, 169 [1931].

³⁾ K. Maurer, B. **59**, 829 [1926]; K. Maurer u. B. Schiedt, Ztschr. physiol. Chem. **213**, 110 [1932].

⁴⁾ R. F. Clutton, Ch. R. Harington u. Th. H. Mead, Biochem. Journ. **31**, 764 [1937].

in der ein Stickstoffatom gleichzeitig einer Aminosäure und einem Aminozucker angehört. Dieser gemeinsame Stickstoff konnte z. B. dem Glucosamin entsprechen, doch haben wir diese Zuckerkomponente nicht gewählt, weil Glucosamin und seine Derivate die Orcinreaktion nicht geben, in unseren Fermentpräparaten aber der Zucker gerade mit dieser Farbreaktion nachgewiesen wurde. Wir haben uns überzeugt, daß Derivate der 6-Aminoglucose eine Orcinreaktion geben, und sind daher an die Synthese eines Derivats dieser 6-Aminoglucose gegangen.

Andererseits kann der „gemeinsame Stickstoff“ der α -Aminogruppe einer Aminosäure angehören. Dies schien uns zunächst der einfachste Fall, der dann auch in dieser Arbeit verwirklicht ist. Es sei aber darauf hingewiesen, daß auch andere Stickstoffatome der bekannten Aminosäuren (fernerstehende Aminogruppen der Diaminosäuren oder Ring-Stickstoffatome vom Tryptophan usw.) in Betracht kommen können.

Es wurde unter anderem zunächst versucht, ein Aceton-(1.2)-benzal-(3.5)-glucose-6-jodhydrin (II), das aus der entsprechenden Mesylverbindung (I)⁵⁾ leicht zugänglich ist, zur Kondensation mit Alaninester zu bringen. Es stellte sich dabei aber heraus, daß dieses Jodhydrin dabei, ebenso bei der Behandlung mit flüssigem Ammoniak oder bei der Behandlung mit Silberfluorid und Pyridin, in die 5.6-ungesättigte Verbindung, das Aceton-(1.2)-benzal-(3.5)-glucofuranose-en-(5.6) übergeht (III).

Die oben erwähnte 6-Mesyl-aceton-benzal-glucose (I) reagiert zwar mit Ammoniak zu der entsprechenden 6-Amino-Verbindung (IV), aber so langsam (3 Wochen), daß die Umsetzung mit Alaninester ziemlich aussichtslos erscheint.

Die Synthese gelang schließlich nach der von Ohle⁶⁾ aufgefundenen Methode: 5.6-Anhydro-aceton-(1.2)-glucofuranose (V) reagiert ziemlich rasch und unter Erwärmung mit Alaninester. Aus der dabei entstehenden Verbindung läßt sich nach Verseifung der Estergruppe die Säure (VI), nach Abspaltung des Acetons aus dem Zuckerrest die gesuchte Verbindung, eine 6-[N-Alanino]-glucose (VII) gewinnen. In Analogie mit den Befunden von Ohle⁶⁾ nehmen wir an, daß beim Schließen und Öffnen des Äthylenoxydrings die Konfiguration am C5-Atom im Endprodukt die der Glucose (*d*) ist, daß es sich also wirklich um Glucose-Derivate handelt.

Je nachdem, ob zur Kondensation *d,l*-Alaninester oder *l*-Alaninester verwandt wird, entstehen sonst praktisch gleiche, in der Drehung aber verschiedene Substanzen. Nur die mit dem *l*-Alaninester hergestellten Verbindungen sind auch optisch einheitlich. Eine an sich mögliche Trennung der beiden mittels des *d,l*-Alaninesters hergestellten optischen Isomeren (nicht Antipoden) wurde nicht durchgeführt.

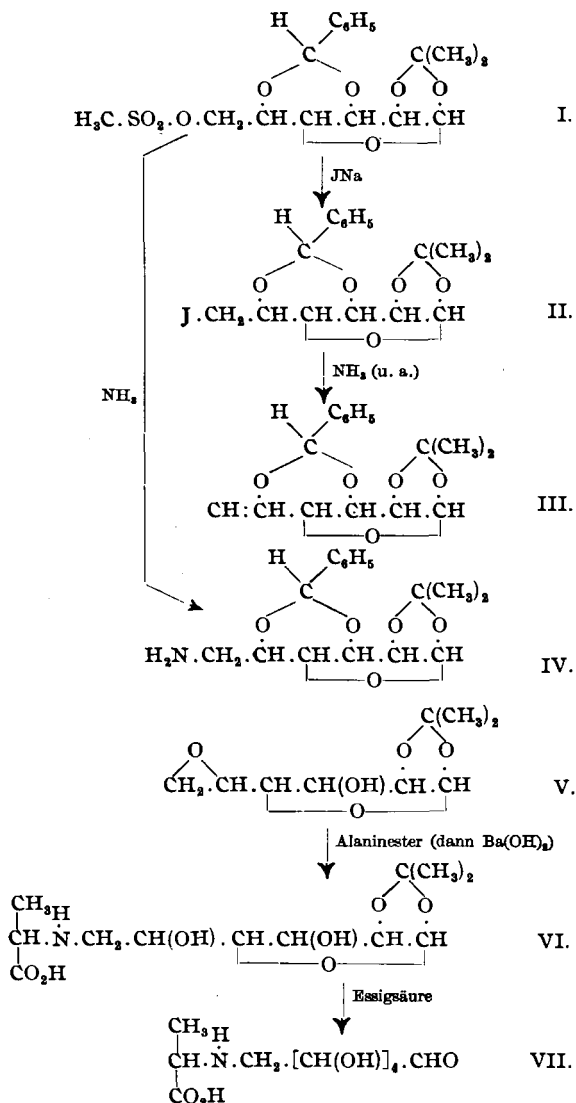
Die 6-[N-Alanino]-glucose (VII) gibt die Reaktion mit Orcin¹⁾, nach vorläufigen Versuchen etwas langsamer, aber in der gleichen Stärke wie Glucose selbst. Sie ist leicht löslich in Wasser, schwer bis unlöslich in organischen Lösungsmitteln, reagiert gegen Lackmus schwach sauer, reduziert Fehlingsche Lösung in der Hitze und liefert ein krystallisiertes Phenyl-osazon. Da keine Mutarotation in Wasser beobachtet wurde, liegt auch in der festen Alaninoglucose wohl das Gleichgewichtsgemisch von α - und β -Form vor.

⁵⁾ B. Helferich u. A. Gnüchtel, B. **71**, 715 [1938].

⁶⁾ H. Ohle, H. Friedeberg u. G. Haeseler, B. **96**, 2311 [1936] und frühere Arbeiten.

Ob derartige Zucker-Aminosäure-Verbindungen in natürlichem Eiweiß oder gar in Fermenten, in Carbohydrasen, im Emulsin, vorkommen, bleibt fürs erste noch ganz offen. Zunächst soll das Verhalten der in dieser Arbeit hergestellten Verbindung unter den Bedingungen der alkalischen oder sauren Eiweißspaltung geprüft werden, um auf den Verbleib derartiger Substanzen bei der Eiweißhydrolyse schließen zu können.

In der folgenden Formelübersicht ist auf die Konfiguration der Einfachheit halber keine Rücksicht genommen.



Die Arbeit wird fortgesetzt. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Liebig-Gesellschaft sind wir für Unterstützung der Arbeit zu ergebendem Dank verpflichtet.

Beschreibung der Versuche.

Aceton-(1.2)-benzal-(3.5)-glucose-6-jodhydrin (II).

3 g 6-Mesyl-aceton-benzal-glucose (I)⁵⁾ werden mit einer Lösung von 3 g wasserfreiem Jodnatrium in 20 ccm Aceton 4 Stdn. rückfließend gekocht. Nach dem Absaugen von dem bei der Reaktion fast quantitativ ausfallenden methansulfonsauren Natrium wird das Filtrat zur Trockne verdampft, der feste Rückstand mit Wasser verrieben und der wasserunlösliche Anteil, das Jodhydrin, aus 90-proz. Alkohol umkrystallisiert. Ausb. 80% d. Th. Schmp. 140° (korr.).

Die Substanz ist leicht löslich in Äther, schwer in kaltem Alkohol, unlöslich in Wasser.

$[\alpha]_D^{25}$: $+0.67^\circ \times 1.9058 / 0.0416 \times 1 \times 1.47 = +20.9^\circ$ (in Chloroform).

4.075 mg Subst.: 6.870 mg CO₂, 1.699 mg H₂O.

C₁₆H₁₉O₈J (418.15). Ber. C 45.98, H 4.58. Gef. C 45.93, H 4.67.

Aceton-(1.2)-benzal-(3.5)-glucofuranose-en-(5.6) (III).

2 g des Jodhydrins (s. o.) werden, gelöst in etwa 10 ccm flüssigem Ammoniak, im Einschlußrohr 10 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Das Ammoniak wird dann abgedunstet, zuletzt wird abgesaugt, der Rückstand mit Wasser und Äther aufgenommen, die Ätherlösung zur Entfernung geringer Jodmengen mit Thiosulfatlösung gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet, unter vermindertem Druck zur Trockne verdampft und der schon recht reine, krystalline Rückstand aus absol. Alkohol umkrystallisiert. Ausb. an Rohprodukt 95% d. Th., Schmp. 126° (korr.).

$[\alpha]_D^{25}$: $+1.91^\circ \times 3.1882 / 0.0622 \times 1 \times 1.471 = +66.6^\circ$ (in Chloroform).

3.025 mg Subst.: 7.367 mg CO₂, 1.710 mg H₂O.

C₁₆H₁₈O₈ (290.2). Ber. C 66.2, H 6.24. Gef. C 66.42, H 6.33.

6-Amino-aceton-(1.2)-benzal-(3.5)-glucose (IV).

1.3 g der entsprechenden 6-Mesyl-Verbindung (s. o.) werden in etwa 10 ccm flüssigem Ammoniak 3 Wochen im Einschlußrohr bei Zimmertemperatur aufbewahrt. (Nach 2 Tagen ist noch keine wesentliche Umsetzung bemerkbar.) Nach dem Abdunsten und Absaugen des Ammoniaks wird der Rückstand mit Natronlauge und Chloroform aufgenommen, die Chloroformlösung nach dem Waschen und Trocknen mit Natriumsulfat unter vermindertem Druck eingedampft und die dabei zurückbleibende, schon sehr reine 6-Amino-Verbindung durch Sublimieren bei 0.01 mm und einer Badtemperatur von 130° ganz rein erhalten. Schmp. 127° (korr.). Ausb. 85% d. Th.

$[\alpha]_D^{25}$: $+0.75^\circ \times 2.989 / 0.0600 \times 1 \times 1.47 = +25.4^\circ$ d. Th. (in Chloroform).

4.738 mg Subst.: 0.181 ccm N₂ (22°, 752 mm).

C₁₆H₂₁O₅N (307.3). Ber. N 4.55. Gef. N 4.4.

6-[N-d,l(?)]-Alaninester]-aceton-(1.2)-gluco-furanose.

5 g 5.6-Anhydro-aceton-(1.2)-glucofuranose (V) (1 Mol.) werden in 7.5 g d,l-Alaninester (3 Mol.) unter Schütteln portionsweise eingetragen. Der Ester geht rasch und unter Erwärmung (bis etwa 40°) in Lösung. Nach 2-tägig. Aufbewahren bei Zimmertemperatur wird der unveränderte Anteil

des Esters bei einer Badtemperatur von etwa 80° unter 2 mm möglichst vollständig abgedampft und abgedunstet. Der schwach gelbe Rückstand wird in etwa 25 ccm warmem Wasser gelöst und diese Lösung 6-mal mit je dem doppelten Volumen Chloroform ausgeschüttelt. Dabei geht die gesuchte Substanz in das Chloroform, während das nebenher entstandene Dioxopiperazin im Wasser bleibt. Nach dem Trocknen der Chloroformlösung mit Natriumsulfat und nach dem Verdampfen zur Trockne (unter vermindertem Druck) hinterbleibt die Substanz als Sirup, der aber befriedigende Analysenzahlen liefert.

3.5350 mg Sbst.: 6.900 mg CO₂, 2.498 mg H₂O.

C₁₄H₂₆O₇N (319.28). Ber. C 52.64, H 7.89. Gef. C 53.2, H 7.91.

6-[N-d,l(?) -Alanino]-aceton-(1.2)-gluco-furanose (VI).

Der Ester wird in 3 Äquiv. titrierter, etwa bei Zimmertemperatur gesättigter Barytlauge gelöst und 20 Stdn. bei Zimmertemperatur aufbewahrt, dann die genau berechnete Menge (3 Äquiv.) titrierter Schwefelsäure zugesetzt, zur Auflösung des in kleiner Menge entstandenen Bariumcarbonats mehrere Stunden auf der Maschine geschüttelt und die durch Zentrifugieren mit Kohle und Kieselgur, dann durch Filtrieren über Kohle geklärte Lösung unter vermindertem Druck zum Sirup eingedampft. Der Rückstand geht durch Verreiben mit Aceton in ein weißes Pulver über.

Die Lösung der Substanz in wenig Wasser gibt beim Versetzen mit viel Alkohol eine schleimige Gallerte, die sich aber nach einigem Aufbewahren durch Abscheidung von Nadelchen und Sternen trübt. Trotzdem läßt sich die so umgefällte Substanz so gut wie nicht absaugen. Besser und leichter filtrierbar wird der Niederschlag durch Zusatz von Aceton zur wäßrigen Lösung.

Die so erhaltene Substanz zersetzt sich, im Röhrchen erhitzt, gegen 230° (Berl-Block). Sie reagiert sauer gegen Lackmus und löst Bariumcarbonat in der Hitze auf. Fehlingsche Lösung wird erst nach saurer Hydrolyse reduziert.

$[\alpha]_D^{25}$: $-0.5^\circ \times 1.4658 / 0.058 \times 1 \times 1.014$: -12.5° (1-mal umkryst., in Wasser).

$[\alpha]_D^{25}$: $-0.3^\circ \times 1.6161 / 0.0350 \times 1 \times 1.006$ = -13.8° (2-mal umkryst., in Wasser).

3.698 mg Sbst.: 6.671 mg CO₂, 2.356 mg H₂O (Rückstand 0.018 mg). — 3.784 mg Sbst.: 0.157 ccm N₂ (21°, 752 mm).

C₁₃H₂₁O₇N (291.2). Ber. C 49.46, H 7.27, N 4.81. Gef. C 49.45, H 7.16, N 4.77.

6-[N-l(+)-Alanino]-aceton-(1.2)-glucofuranose (VI).

Die Verbindung wird nach der gleichen Methode wie die eben beschriebene Substanz nur unter Verwendung von l-Alaninester hergestellt. Der Zersetzungspunkt liegt vielleicht etwas tiefer, bei etwa 210—220°. Die Drehung ist etwas stärker negativ.

$[\alpha]_D^{25}$: $-0.81^\circ \times 1.4532 / 0.0582 \times 1 \times 1.014$ = -20.0° (1-mal umkrystallisiert, in Wasser).

$[\alpha]_D^{25}$: $-0.42^\circ \times 1.6413 / 0.0330 \times 1 \times 1.006$ = -20.8° (2-mal umkryst., in Wasser).

3.341 mg Sbst.: 6.053 mg CO₂, 2.260 mg H₂O. — 3.488 mg Sbst.: 0.144 ccm N₂ (21°, 753 mm).

Gef. C 49.43, H 7.55, N 4.75.

6-*[N-d,l(?)*]-Alanino]-glucose (VII).

1 g der reinen Acetonverbindung (s. o.) wird in 20 ccm Essigsäure von 35% 3 Stdn. auf dem Wasserbad erhitzt und dann die Lösung unter vermindertem Druck zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird mit Wasser aufgenommen, nochmals ebenso eingedampft (um die Essigsäure möglichst zu entfernen), das Lösen und Eindampfen, diesmal nach Klären mit Kohle, wiederholt und der zurückbleibende Sirup durch mehrmaliges Abdampfen mit Alkohol in eine pulverige Form übergeführt. Die Substanz kann durch Lösen in wenig Wasser und Fällen mit viel absol. Alkohol gereinigt werden. Sie fällt dabei zunächst meist als Öl, das aber bald zu einer festen, wahrscheinlich krystallinen Masse erstarrt. Allerdings gewinnt man auf diese Weise nur immer etwa 10% wieder, der Rest bleibt in der Mutterlauge.

Die Substanz schmilzt, wenig charakteristisch, unt. Zers. bei etwa 130° bis 135°. Anzeichen einer Lactonbildung sind vorläufig nicht beobachtet.

$[\alpha]_D^{20}$: $0.8^\circ \times 1.2333 / 0.0250 \times 1 \times 1.006 = +39.2^\circ$ (1-mal umkryst., in Wasser).

$[\alpha]_D^{20}$: $1.06^\circ \times 1.2232 / 0.0267 \times 1 \times 1.006 = +48.3^\circ$ (2-mal umkryst., in Wasser).

4.126 mg Sbst.: 6.538 mg CO₂, 2.604 mg H₂O. — 4.262 mg Sbst.: 0.206 ccm N₂ (22°, 754 mm).

C₉H₁₇O₇N (251.2). Ber. C 43.01, H 6.82, N 5.58. Gef. C 43.23, H 7.05, N 5.55.

Die Substanz reduziert Fehlingsche Lösung in der Hitze. Sie reagiert gegen Lackmus schwach sauer. Ihr Phenylsazon läßt sich durch 1-stdg. Erhitzen von 2 g der rohen Substanz mit 4 g Phenylhydrazin und 4 ccm Essigsäure von 50% in 40 ccm Wasser leicht und in guter Ausbeute gewinnen. Die gelben Krystalle werden durch Waschen mit verd. Essigsäure, mit Wasser, mit Toluol und mit Äther gereinigt und mit 50-proz. Alkohol ausgekocht. Die Substanz beginnt sich (im Berl-Block) bei etwa 225° zu verfärben und schmilzt recht scharf bei 240° unt. Zers. Sie ist fast unlöslich in allen Lösungsmitteln.

3.282 mg Sbst.: 0.455 ccm N₂ (21°, 755 mm).

C₂₁H₂₇O₈N₃ (429.38). Ber. N 16.3. Gef. N 16.0.

6-*(N-l*-Alanino)-glucose (VII).

Die Darstellung erfolgt unter Verwendung der *l*-Alanino-monoaceton-glucose (s. o.) genau so, wie bei der *d,l*(?)-Verbindung beschrieben. Die Substanz ist optisch rein, auch am asymm. C-Atom des Alanins, während die oben beschriebene *d,l*(?)-Substanz, wie aus der Drehung hervorgeht, ein Gemisch ist, das bei mehrmaligem Umkrystallisieren sich allerdings erheblich an dem Derivat des *l*(+)-Alanins anreichert.

$[\alpha]_D^{20}$: $+1.17^\circ \times 1.2729 / 0.0259 \times 1 \times 1.006 = +57.2^\circ$ (Wasser).

4.110 mg Sbst.: 6.504 mg CO₂, 2.628 mg H₂O. — 3.498 mg Sbst.: 0.180 ccm N₂ (21°, 744 mm).

Gef. C 43.17, H 7.14, N 5.85.

Das, ebenfalls wie oben beschrieben, gewonnene Phenylsazon der optisch reinen Verbindung schmilzt etwas höher. Es beginnt sich gegen 240° zu verfärben und schmilzt bei 252° unt. Zers. (Berl-Block).

3.287 mg Sbst.: 0.458 ccm N₂ (21°, 757 mm).

Gef. N 16.1.