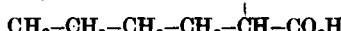


72. Fritz Micheel und Kurt Weichbrodt: 2-Nitro-4-carboxy-phenyl-Derivate von Aminosäuren und einige ihrer Glucose-Derivate (III)

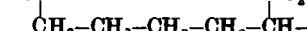
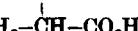
[Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Münster (Westf.)]
(Eingegangen am 10. Januar 1955)

Aus 4-Fluor-3-nitro-benzoësäure bzw. deren Äthylester werden mit Aminosäuren *N*-[2-Nitro-4-carboxy-phenyl]- bzw. die *N*-[2-Nitro-4-carbäthoxy-phenyl]-aminoësäuren hergestellt. Vom *D,L*-Lysin werden das Bis- und das α - bzw. ϵ -Monoprodukt gewonnen. Ester der 4-Fluor-3-nitro-benzoësäure mit *D,L*-Glucose-Derivaten werden mit *D,L*-Alanin zu entsprechenden Verbindungen umgesetzt, die Zucker und Aminosäure enthalten. Die β -Pentakis-[4-fluor-3-nitro-benzoyl]-*D*-glucose wird hergestellt.

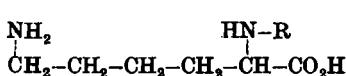
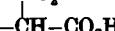
Unter den in den früheren Mitteilungen¹⁾ beschriebenen *N*-[2-Nitro-4-carboxy-phenyl]-aminoësäuren, die durch Umsetzen von 4-Fluor-3-nitro-benzoësäure bzw. deren Estern mit verschiedenen Aminosäuren erhalten werden, waren diejenigen des Lysins von besonderem Interesse. Das Bis-Derivat I kann entweder, wie früher beschrieben, aus dem Ester IV durch Verseifen mit Alkali (wozu bei einem Überschuß von Lysin bei der Reaktion schon dessen Alkalinität genügt) oder durch Umsetzen von Lysin mit 4-Fluor-3-nitro-benzoësäure bei Gegenwart von Natronlauge gewonnen werden. Es zeigte sich, daß aus der Bis-Verbindung I einer der Nitro-carboxy-phenyl-Reste bereits beim Erwärmen mit wässriger Essigsäure abgespalten wurde. Dies ist überraschend, weil analog gebaute Dinitro-phenyl-Derivate der Aminosäuren gegenüber der Hydrolyse mit starken Mineralsäuren so stabil sind, daß sie beim Abbau der entsprechenden Derivate von Eiweißstoffen zur Ermittlung freier Aminogruppen dienen²⁾ können, und weil die übrigen von uns untersuchten *N*-Nitro-



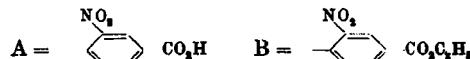
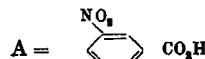
I: R = A IV: R = B



II: R = A V: R = B



III: R = A



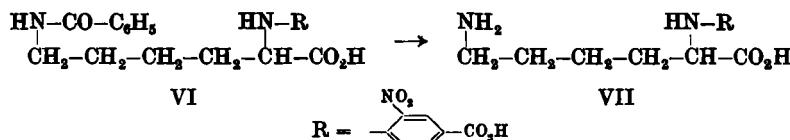
carboxy-phenyl-Derivate von α -Aminosäuren und anderen primären Aminen ebenfalls unter solchen Bedingungen gegen Hydrolyse beständig waren. Man hätte an die Möglichkeit denken können, daß einer der beiden Nitro-carboxy-phenyl-Reste nicht über den aromatischen Ring, sondern über die Carboxygruppe säureamidartig mit einer der Aminogruppen des Lysins verbunden und außerdem das Fluor-Atom hydrolytisch durch Hydroxyl ersetzt sei,

¹⁾ F. Micheel u. K. Weichbrodt, Angew. Chem. 64, 397 [1952]; F. Micheel, K. Weichbrodt u. J. Plenikowski, Liebigs Ann. Chem. 581, 238 [1953]; ferner Dissertation. K. Weichbrodt, Münster 1954.

²⁾ F. Sanger, Biochem. J. 89, 507 [1945].

daß also ein 4-Oxy-3-nitro-benzoyl-Derivat vorläge. Dies ließ sich aber eindeutig widerlegen. Setzt man 4-Fluor-3-nitro-benzoësäure-äthylester mit freiem DL-Lysin um, so erhält man das I entsprechende α , ϵ -Bis-*N*-[2-nitro-4-carbäthoxy-phenyl]-DL-lysin (IV). Dies bildet ein Mono-Natriumsalz und enthält zwei Äthoxylgruppen. Beim Kochen mit verd. Natronlauge werden beide Estergruppen verseift, und man erhält I. Es liegen also in I und IV zweifellos *N*-Phenyl-Derivate des Lysins vor. Die bei der Hydrolyse mit wäßriger Essigsäure aus I zu erwartende 4-Oxy-3-nitro-benzoësäure wurde inzwischen auch isoliert.

Von vornherein konnte nichts darüber ausgesagt werden, welcher der beiden Nitro-carboxy-phenyl-Reste so leicht hydrolysierbar ist. Wie erwähnt, sind sowohl die Derivate der übrigen untersuchten α -Aminosäuren wie das ϵ -[2-Nitro-4-carboxy-phenyl]-lysin²⁾ gegen Hydrolyse sehr beständig. Wir haben zunächst das α - und das ϵ -[2-Nitro-4-carboxy-phenyl]-lysin (III und II) hergestellt und auf ihr Verhalten untersucht. Setzt man freies Lysin bei Gegenwart von Natriumhydrogencarbonat mit 4-Fluor-3-nitro-benzoësäure um, so erhält man das ϵ -Mono-Derivat (II), das ein Hydrochlorid vom Schmp. 155° bildet. Seine Struktur läßt sich auf folgendem Wege beweisen: Man stellt zunächst den Kupfer(II)-Komplex des Lysins her, in dem die α -Aminogruppe durch Komplexbildung abgeschirmt ist. Dieser wird dann mit 4-Fluor-3-nitro-benzoësäure-äthylester zum Kupferkomplex von V umgesetzt und daraus durch Zerlegen mit verd. Salzsäure V gewonnen. V gibt beim Verseifen der Estergruppe mit verd. Natronlauge das ϵ -Mono-Derivat II, das identisch mit dem durch direkte Umsetzung von Lysin mit 4-Fluor-3-nitro-benzoësäure erhaltenen Mono-Derivat II ist (Schmp. des Hydrochlorids 155°, Misch-Schmp. ebenso). Das ϵ -[2-Nitro-4-carboxy-phenyl]-DL-lysin-hydrochlorid vom Schmp. 155° ist nun identisch mit dem Hydrochlorid des durch Abspaltung von einem Nitro-carboxy-phenyl-Rest aus dem Bis-Derivat I erhaltenen Mono-Derivats. Also muß der Nitro-carboxy-phenyl-Rest am α -ständigen N-Atom abgespalten werden. Dies läßt sich auch auf anderen unabhängigen Wegen beweisen: Das ϵ -Benzoyl-Derivat der α -Mono-Verbindung III wurde auf folgendem Wege erhalten: man stellt in bekannter Weise das ϵ -*N*-Benzoyl-DL-lysin her, und dies wird durch Umsetzen mit 4-Fluor-3-nitro-benzoësäure in das ϵ -*N*-Benzoyl- α -*N*-[2-nitro-4-carboxy-phenyl]-DL-lysin (VI) übergeführt, das in den gebräuchlichen organischen Lösungsmitteln unlöslich ist.

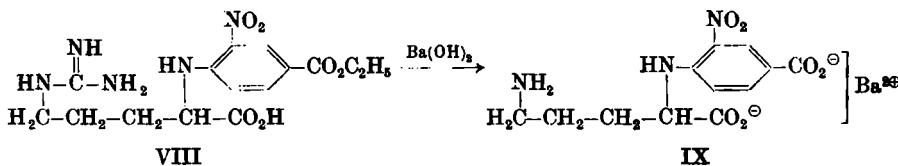


Überraschenderweise verhält sich VI gegenüber der Behandlung mit heißen Säuren ganz anders als I, obwohl man ein analoges Verhalten erwarten könnte. Mit 50-proz. Essigsäure oder verd. Salzsäure tritt in der Wärme keine merkliche Veränderung ein. Dies könnte mit der extremen Unlöslichkeit von VI in

diesen Lösungsmitteln zusammenhängen. Wird jedoch VI mit konz. Salzsäure 36 Stdn. auf dem Dampfbad unter Rückfluß erhitzt, so geht allmählich alles in Lösung, und man erhält das α -N-[2-Nitro-4-carboxy-phenyl]-DL-lysin-hydrochlorid vom Schmp. 176°, das nicht identisch ist mit dem durch partielle Hydrolyse aus I erhaltenen Monoderivat vom Schmp. 155° (II). Ein dritter, unabhängiger Beweis für die Struktur von II ergibt sich aus seinem Verhalten bei der quantitativen Ninhydrinbestimmung³). Diese läßt sich nur mit α -Aminosäuren mit freier Aminogruppe durchführen. Das durch Verseifen des Bis-Derivates mit Säure erhaltene Mono-Derivat gab bei dieser Bestimmung eine CO₂-Abspaltung von 95.7 % d. Theorie.

Somit kann es keinem Zweifel unterliegen, daß aus dem α, ϵ -Bis-N-[2-nitro-4-carboxy-phenyl]-DL-lysin (I) durch 50-proz. Essigsäure oder verdünnte Salzsäure in der Hitze der α -ständige Rest abgespalten und das ϵ -Mono-Derivat II gebildet wird. Diese Reaktion muß überraschen, weil erstens eine so leichte Hydrolyse von sek. Aminen ungewöhnlich ist. Zweitens haben sich alle von uns daraufhin untersuchten α -N-[2-Nitro-4-carboxy-phenyl]-aminosäuren unter den angegebenen oder noch verschärften Versuchsbedingungen als resistent gegen Hydrolyse erwiesen. Die Frage nach den Gründen für das Verhalten des Lysinderivates I bedarf also einer weiteren Untersuchung.

Auch das Arginin wurde mit Fluor-nitrobenzoësäure-ester umgesetzt. Es tritt nur die α -Aminogruppe, nicht der Guanidinrest, in Reaktion, und man erhält das α -N-[2-Nitro-4-carbäthoxy-phenyl]-L-arginin (VIII). Seine wäßrige Lösung reagiert neutral. Die α -Stellung des eingetretenen Restes ergibt sich daraus, daß durch Verseifen mit Baryt das Bariumsalz des α -N-[2-Nitro-4-carboxy-phenyl]-L-ornithins (IX) erhalten wird.

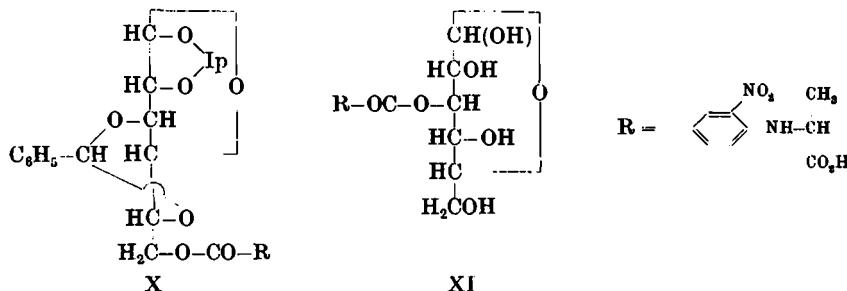


Von den Umsetzungsprodukten der Fluor-nitrobenzoësäure mit Glucose seien folgende beschrieben:

Aus 1.2-Isopropyliden-3.5-benzyliden-6-[4-fluor-3-nitro-benzoyl]-D-glucose⁴) entsteht mit DL-Alanin die 1.2-Isopropyliden-3.5-benzyliden-6-[3-nitro-4-N-alanyl-benzoyl]-D-glucose (X). Aus der früher⁴) beschriebenen 1.2; 5.6-Diisopropyliden-3-[3-nitro-4-N-alanyl-benzoyl]-D-glucose konnten inzwischen die beiden Isopropylidenreste durch saure Hydrolyse abgespalten werden. Dies gelang dadurch, daß die besten Bedingungen für Dauer und Acidität durch papierchromatographische Analyse von ständig entnommenen Proben ermittelt wurden. So erhält man unter geeigneten Bedingungen die 3-[3-Nitro-4-N-alanyl-benzoyl]-D-glucose (XI).

³) D. D. van Slyke, D. A. Mc Fayden u. P. Hamilton, J. biol. Chemistry 141, 671 [1941]. ⁴) F. Micheel, K. Weichbrodt u. J. Plenikowski, I. c.¹).

Durch Umsetzung von 4-Fluor-3-nitro-benzoylchlorid mit D-Glucose in Pyridin-Chloroform wird ferner die Pentakis-[4-fluor-3-nitro-benzoyl]- β -D-glucose erhalten. Sie kristallisiert aus Isopropanol mit 2 Moll. des Lösungs-



mittels und ist auf Grund ihres Drehwertes ($[\alpha]_D: +5^\circ$ (Chlf.)) als Derivat der β -Reihe anzusprechen. Diese und andere Fluor-nitro-benzoate von Kohlenhydraten eröffnen den Weg zu weiteren Umsetzungen mit Stoffen, die Amino-gruppen enthalten.

Für die Untersuchungen standen Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft und des Fonds der Chemie zur Verfügung, denen wir zu Dank verpflichtet sind.

Beschreibung der Versuche

α,ϵ -Bis-*N*-[2-nitro-4-carbäthoxy-phenyl]-D,L-lysin (IV): Die Lösungen von 1 g freiem D,L-Lysin in 5 ccm Wasser und 3 g 4-Fluor-3-nitro-benzoësäure-äthylester in 30 ccm Methanol werden vereinigt und bei 50° im Brutschrank 12 Stdn. aufbewahrt. Dabei kristallisiert ein gelbes Produkt aus, dessen Menge durch Abkühlen auf 0° erhöht werden kann. Nach Absaugen und Umkristallisation aus heißem Wasser werden 540 mg der freien Bis-Verbindung IV vom Schmp. 237° erhalten; leicht lösL. in Chloroform, Benzol, Aceton, Methanol und Essigester.

C₂₄H₃₈O₁₀N₄ (532.5) Ber. C 54.13 H 5.26 N 10.53 C₂H₅O 16.91
 Gef. C 53.75 H 5.36 N 10.62 C₂H₅O 16.95

Zu der restlichen Reaktionslösung, die einen p_{H} -Wert von 6 hat, gibt man 500 mg Natriumhydrogencarbonat und bewahrt erneut 10 Stdn. bei 50° auf. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels wird ein orangeroter Rückstand erhalten, der zur Entfernung überschüssigen Fluor-nitro-benzoësäure-esters dreimal mit absol. Benzol extrahiert wird. Durch Lösen in heißem Methanol und Zugabe von Wasser bis zur beginnenden Trübung erhält man das Natriumsalz der Bis-Verbindung IV in Form rotgelber, in Benzol unlöslicher Nadeln. Schmp. 127°; Ausb. 2.5 g, Gesamtausb. 80.2% d. Theorie.

$\text{NaC}_{24}\text{H}_{27}\text{O}_{10}\text{N}_4$ (554.5) Ber. C 52.00 H 4.88 N 10.12 $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$ 16.24 Na 4.15
 Gef. C 52.45 H 5.26 N 10.10 $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$ 16.04 Na 3.10

Die Aschebestimmung ist schwer durchführbar, da die Substanz bei der Verbrennung verpuffen kann.

α, ϵ -Bis- N -(2-nitro-4-carboxy-phenyl)-D,L-lysin (I): Zu 1 g Lysin-mono-hydrochlorid werden Lösungen von 675 mg NaOH in 10 cm Wasser und 2.1 g 4-Fluor-3-nitro-benzoësäure in Methanol gegeben. Während der Reaktionsdauer von 10 Std. bei 45° färbt sich die Lösung tiefrot. Nach Abdestillieren des Alkohols wird mit verd. Salzsäure angesäuert. Beim Stehenlassen im Eisschrank scheiden sich gelbe Kristalle ab. Nach dem Absaugen und Trocknen wird das gelbe krist. Produkt mehrmals mit Benzol extrahiert und aus wenig Äthanol umkristallisiert. Leicht lös. nur in Eisessig. Ausb. 1.98 g (75.5% d.Th.); Schmp. 145°.

$C_{29}H_{28}O_{10}N_4$ (476.4) Ber. C 50.41 H 4.22 N 11.78 Gef. C 50.80 H 4.89 N 11.00

I wird auch auf folgendem Wege erhalten: 1.2 g α, ϵ -Bis-*N*-[2-nitro-4-carbäthoxy-phenyl]-dL-lysin werden 5 Stdn. unter Rückfluß mit 10 ccm 5-proz. Natronlauge gekocht. Nach dem Abkühlen und Ansäuern kristallisiert das Verseifungsprodukt. Ausb. 627 mg (60.8% d.Th.).

ϵ -*N*-[2-Nitro-4-carboxy-phenyl]-dL-lysin-hydrochlorid (II): 1.1 g freies dL-Lysin werden in 10 ccm Wasser gelöst und dazu eine Lösung von 3.7 g 4-Fluor-3-nitro-benzoësäure in 50 ccm Methanol gegeben. Nach Zugabe von 500 mg Natriumhydrogencarbonat wird 20 Stdn. auf 50° erwärmt und, nachdem der Alkohol entfernt ist, mit verd. Salzsäure angesäuert. Das ausgeschiedene gelbbraune Öl kristallisiert im Eisschrank. Es wird mehrmals mit Chloroform extrahiert und aus verd. Salzsäure umkristallisiert. Die erhaltene Verbindung gibt eine positive Ninhydrinreaktion und ist identisch mit dem Verseifungsprodukt von V. Ausb. 1.1 g (42.4% d.Th.); Schmp. 155°.

$C_{13}H_{11}O_6N_3 \cdot HCl$ (347.8) Ber. C 44.95 H 5.19 N 12.10 Cl 10.23

Gef. C 45.43 H 5.11 N 12.38 Cl 9.96

ϵ -*N*-[2-Nitro-4-carbäthoxy-phenyl]-dL-lysin-hydrochlorid (V): 1.4 g dL-Lysin-monohydrochlorid werden in 10 ccm Wasser gelöst und mit 1 g in der Hitze gefallten Kupferoxyds einige Minuten gekocht und heiß filtriert⁵⁾. Der tiefblauen Lösung werden 500 mg Natriumhydrogencarbonat und eine Lösung von 4.2 g 4-Fluor-3-nitro-benzoësäure-äthylester in 50 ccm Methanol zugesetzt. Der dabei auftretende Niederschlag wird abfiltriert, je zweimal mit Wasser und Methanol behandelt und dadurch nahezu in Lösung gebracht. Die so erhaltenen wäbr. und methanol. Lösungen werden portionsweise abwechselnd zu der Hauptlösung gegeben. Damit ist eine Umsetzung in homogener Phase möglich, die bei 50° und in 8 Stdn. durchgeführt werden kann. Die ursprüngliche blaue Farbe schlägt nach Grün um. Nach Abdestillieren des Alkohols wird das zurückbleibende grüne Pulver zur Zerlegung des Kupferkomplexes mit verd. Salzsäure verrieben. Das nunmehr gelbe Produkt wird in heißer verd. Salzsäure gelöst und heiß filtriert. Beim Abkühlen scheiden sich gelbe Kristalle aus, die zur Entfernung von 4-Fluor-3-nitro-benzoësäure-äthylester mit Benzol behandelt und aus Isopropanol umkristallisiert werden. Ausb. 1.3 g (45.2% d.Th.) vom Schmp. 215–218°.

$C_{15}H_{21}O_6N_3 \cdot HCl$ (375.8) Ber. C 48.00 H 5.86 N 11.20 C_6H_6O 12.00

Gef. C 47.69 H 6.01 N 11.03 C_6H_6O 12.04

Die Verbindung gibt eine positive Ninhydrinreaktion. Die Überführung in einen Cu-Komplex durch Kochen mit Kupferoxyd ist nicht möglich.

Zur Verseifung werden 780 mg des erhaltenen Stoffes mit 1 g Natriumhydroxyd in 10 ccm Wasser 3 Stdn. unter Rückfluß gekocht, die Lösung heiß filtriert und nach dem Erkalten angesäuert. Im Eisschrank fallen gelbe Kristalle vom Schmp. 155° aus, die nach dem Misch-Schmelzpunkt mit dem aus 4-Fluor-3-nitro-benzoësäure und Lysin direkt erhaltenen Produkt II identisch sind.

Nach Erhitzen mit Eisessig oder 2*n* HCl wird die eingesetzte Menge quantitativ ohne Schmelzpunktsänderung zurückgewonnen; die Säureempfindlichkeit ist also gering.

ϵ -*N*-Benzoyl- α -*N*-[2-nitro-4-carboxy-phenyl]-dL-lysin (VI): 1.4 g ϵ -Benzoyl-dL-lysin werden mit konz. Natriumhydrogencarbonat-Lösung zum größten Teil in Lösung gebracht. Nach Zugabe von 1.2 g Fluor-nitro-benzoësäure in 30 ccm Methanol wird 8 Stdn. auf 40° erwärmt. Auf Ansäuern fällt ein hellgelber krist. Niederschlag aus, der sowohl in verd. Salzsäure als auch in den gebräuchlichen organischen Lösungsmitteln praktisch unlöslich ist. Daher war ein Umkristallisieren nicht möglich; überschüssige 4-Fluor-3-nitro-benzoësäure kann mit Chloroform herausgelöst werden. Ausb. 1.87 g (80.5% d.Th.); Schmp. 240–245° (Zers.).

$C_{20}H_{21}O_6N_3$ (415.4) Ber. C 57.83 H 5.06 N 10.12 Gef. C 59.24 H 4.94 N 10.92

ϵ -*N*-[2-Nitro-4-carboxy-phenyl]-dL-lysin-hydrochlorid (II): 66 mg α, ϵ -Bis-*N*-[2-nitro-4-carboxy-phenyl]-dL-lysin werden in 5 ccm Eisessig zum Sieden erhitzt, sodann 5 ccm Wasser zugegeben und weitere 5 Min. erhitzt. Anschließend wird

⁵⁾ C. M. Stevens u. J. A. Bush, J. biol. Chemistry 188, 141 [1950].

das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert, der Rückstand dreimal mit trockenem Pyridin extrahiert und getrocknet. Schmp. 239°. Ausb. 20 mg (46.5% d.Th.). Die erhaltene halogenfreie Verbindung wird in 10 ccm 2n HCl 2 Min. erwärmt, i. Vak. zur Trockene gedampft und das Hydrochlorid aus verd. Salzsäure umkristallisiert. Ausb. 20.4 mg (91.2% d.Th.).

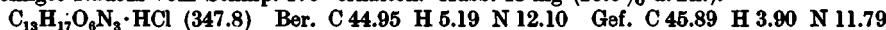


Wird die Bis-Verbindung des Lysins (I) statt mit Eisessig mit heißer 2n HCl erwärmt, so kristallisiert beim Abkühlen ein gelbes Produkt aus, aus dem mit Äther 4-Oxy-3-nitrobenzoësäure herausgelöst werden kann (Schmp. 185°, N 7.60%, ber. N 7.65%, Ausb. 45.2% d.Th.). Das Bis- α, ϵ -Derivat geht jedoch dabei nicht vollständig in II über, sondern es entsteht ein Gemisch von II mit I.

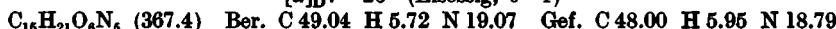
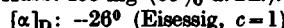
Quantitative Ninhydrinbestimmung: 62.2 mg des ϵ -Mono-Derivates II werden in einem 25-ccm-Schliffkolben (Kolben A) in 10 ccm Citratpuffer vom p_H 2.5 gelöst, ein Tropfen Octylalkohol zugegeben und ausgekocht. Kolben B wird mit Stickstoff durchspült und mit 3 ccm 0.2n Ba(OH)₂ beschickt. Nachdem in den Kolben A 5 ccm einer 1-proz. Ninhydrinlösung pipettiert worden sind, wird er sofort über einem Claisen-Aufsatz und einen Vakuumvorstoß mit Kolben B als Vorlage verbunden. Nach dem Abkühlen wird die Apparatur evakuiert, und sodann die Reaktionslösung unter andauerndem Schütteln 5 Min. auf einem Dampfbade erhitzt. Anschließend wird Kolben B mit Eis gekühlt. Der Überschuß an Ba(OH)₂ wird mit 0.1n HCl gegen Phenolphthalein zurücktitriert.

Verbrauch: 1.912 ccm 0.2n Ba(OH)₂, entspr. 8.419 mg CO₂ (95.67% d.Th.).

α -N-[2-Nitro-4-carboxy-phenyl]-D,L-lysine-hydrochlorid (III): 200 mg ϵ -N-Benzoyl- α -N-[2-nitro-4-carboxy-phenyl]-D,L-lysine werden mit 30 ccm konz. Salzsäure 36 Stdn. unter Rückfluß erhitzt, wobei ein geringer Rückstand bleibt. Die Lösung wird heiß filtriert, zur Trockne eingedampft und der Rückstand dreimal mit absol. Äther extrahiert. Nach Umkristallisation aus verd. Salzsäure werden zu Bündeln vereinigte Nadeln vom Schmp. 176° erhalten. Ausb. 43 mg (25.6% d.Th.).



α -N-[2-Nitro-4-carbäthoxy-phenyl]-L-arginin-hydrochlorid (VIII): 420 mg L-Arginin-hydrochlorid werden mit 1 g 4-Fluor-3-nitro-benzoësäure-äthylester bei 40° und p_H 8.3 in währ. alkohol. Lösung 10 Stdn. aufbewahrt. Der nach Abdestillieren des Lösungsmittels zurückbleibende gelbe Rückstand wird aus Wasser umkristallisiert, enthält jedoch, wie der Mikroschmelzpunkt zeigt, noch unveränderten Ester, der sich bequem i. Vak. bei 100° über konz. Schwefelsäure entfernen lässt. Nach nochmaliger Umkristallisation aus Wasser werden gelbe Säulen erhalten, die nur in Eisessig und heißem Wasser löslich sind. Die heiße wäßrige Lösung reagiert neutral, die Sakaguchi-Reaktion ist stark positiv. Schmp. 166°; Ausb. 485 mg (66% d.Th.).



α -N-[2-Nitro-4-carboxy-phenyl]-L-ornithin (IX): 200 mg des L-Arginin-derivates VII werden mit 25 ccm bei Zimmertemperatur gesättigter Bariumhydroxyd-Lösung 2 Stdn. zum Sieden erhitzt, die Lösung nach dem Abkühlen abgesaugt und mit Kohlendioxyd neutralisiert. Nach Entfernen des Bariumcarbonats und Eindampfen des Filtrates wird ein sirupöser gelber Rückstand erhalten. Er ist in Wasser leicht löslich und enthält Barium-Ionen (p_H 8.5). Um noch nicht verseiften Harnstoff zu entfernen, wird mit Methanol dreimal extrahiert, wobei sich der Rückstand rot färbt und fest wird. Nach Umkristallisieren aus Wasser wird das Bariumsalz des α -N-[2-Nitro-4-carboxy-phenyl]-L-ornithins als rotgelbes feinkristallines Pulver erhalten. Schmp. oberhalb von 320° (Zers.).



1,2-Isopropyliden-3,5-benzyliden-6-[3-nitro-4-N-D,L-alanyl-benzoyl]-D-glucose (X): 2 g 1,2-Isopropyliden-3,5-benzyliden-6-[4-fluor-3-nitro-benzoyl]-D-glucose werden in 5 ccm Chloroform, ferner 370 mg D,L-Alanin und 360 mg

Natriumhydrogencarbonat in 5 ccm Wasser gelöst, beide Lösungen zusammengegeben und nunmehr soviel Methanol zugesetzt, daß eine homogene Lösung entsteht. Die nach kurzer Zeit wieder ausgefallene geringe Alaninmenge wird nach dem Abdankieren in wenig Wasser gelöst und erneut mit der Reaktionslösung vereinigt. Nach 12stdg. Aufbewahren bei 50° wird das Lösungsmittel entfernt und der orangefarbene Rückstand wiederholt mit absol. Methanol ausgezogen. Ein weißer Rückstand von Alanin und anorganischen Salzen bleibt zurück. Durch Abdampfen der methanol. Lösung i.Vak. wird X erhalten.

Da Kristallisierungsversuche ergebnislos verliefen, wird zur Reinigung aus Isopropanol, dann aus Wasser ausgefällt, schließlich in heißem Methanol gelöst, mit Wasser bis zur beginnenden Trübung versetzt und langsam abgekühlt. Das erhaltene Natriumsalz der Verbindung ist amorph, gelb gefärbt und wenig löslich in Benzol und Dioxan. Ausb. 1.7 g (71.4% d.Th.).

$[\alpha]_D: +8^\circ$ (Methanol, $c = 1$)

$\text{NaC}_{20}\text{H}_{27}\text{O}_{11}\text{N}_2$ (566.5) Ber. C 55.12 H 4.76 N 4.94 Gef. C 56.49 H 5.13 N 4.67

3-[3-Nitro-4-N- α -L-alanyl-benzoyl]-D-glucose (XI): Die Abspaltung der Acetongruppen aus der früher beschriebenen⁴⁾ 1,2;5,6-Diisopropyliden-3-[3-nitro-4-N-alanyl-benzoyl]-D-glucose gelingt durch Hydrolyse mit Salzsäure/Dioxan. Die optimale Hydrolysedauer wird durch ständig angesetzte Papierchromatogramme bestimmt. Zur Hydrolyse werden 620 mg der Diacetin-Verbindung in 14 ccm Dioxan und 16.9 ccm n HCl gelöst, 12 Stdn. auf 50° erwärmt, anschließend durch Schütteln mit Silbercarbonat neutralisiert, filtriert und i.Vak. eingedampft. Beim Trocknen färbt sich der erhaltene Sirup durch kolloid gelöstes Silber schwarz. Durch dreimaliges Aufnehmen in absol. Methanol und nachfolgendem Eindampfen kann das Silber entfernt werden. Man erhält eine gelbe amorphe Substanz, die nur in Wasser und Methanol gut löslich ist. Kristallisierungsversuche aus Äthanol und Isopropanol sind ohne Erfolg. Ein Papierchromatogramm zeigt einen einzigen gelben Fleck, der mit Anilin-phthalat unter Braunkärfung reagiert. Das Natriumsalz der Glucose-Alanin-Verbindung kann daher als einheitlich angesehen werden. Ausb. 355 mg (87.7% d. Th.).

$[\alpha]_D: +25^\circ$ (Wasser, $c = 1$)

$\text{NaC}_{16}\text{H}_{19}\text{O}_{11}\text{N}_2$ (438.3) Ber. C 43.83 H 4.34 N 6.39 Na 5.25

Gef. C 44.28 H 5.18 N 5.71 Na 5.38

Pentakis-[4-fluor-3-nitro-benzoyl]- β -D-glucose: In einer Lösung von 4 g 4-Fluor-3-nitro-benzoylchlorid in 30 ccm trockenem Chloroform werden 600 mg Glucose suspendiert, mit 1.6 g Pyridin versetzt und sodann unter Röhren 3 Tage bei 70° gehalten. Bis auf einen geringen Rest, der abgesaugt wird, ist alle Glucose in Lösung gegangen. Die Chloroformlösung wird mit 1-proz. Schwefelsäure und mit Wasser gewaschen, getrocknet und i.Vak. eingedampft. Der ölige Rückstand kristallisiert im Eisschrank. Umkristallisiert wird aus Isopropanol. Der schwach gelb gefärbte Pentaester wird als Additionsverbindung mit 2 Moll. Isopropanol erhalten, von denen eines durch längeres Erhitzen i.Vak. über Diphosphorpentoxid entfernt werden kann. Ausb. 2.18 g (58.3% d.Th.); Schmp. 41°.

$[\alpha]_D: +5^\circ$ (Chloroform, $c = 1$)

$\text{C}_{41}\text{H}_{22}\text{O}_{21}\text{N}_5\text{F}_5 \cdot 2\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$ (1135.8) Ber. C 49.69 H 3.37 N 6.17 F 8.37

Gef. C 49.86 H 3.85 N 6.01 F 7.56

261.5 mg, 24 Stdn. bei 56° über P_2O_5 i.Vak. getrocknet, verlieren 14.5 mg (ber. 13.8 mg).

$\text{C}_{41}\text{H}_{22}\text{O}_{21}\text{N}_5\text{F}_5 \cdot \text{C}_3\text{H}_8\text{O}$ (1075.7) Ber. C 49.12 H 2.81 N 6.77

Gef. C 49.71 H 3.03 N 6.51

$\text{C}_{41}\text{H}_{22}\text{O}_{21}\text{N}_5\text{F}_5$ (1015.6) Ber. C 48.47 H 2.16 N 6.89