

KURT HEYNS, HERMANN BREUER und HANS PAULSEN

DARSTELLUNG UND VERHALTEN DER 2-*N*-AMINOSÄURE-
2-DESOXY-GLUCOSEN („GLUCOSE-AMINOSÄUREN“)¹⁾
AUS GLYCIN, ALANIN, LEUCIN UND FRUCTOSE²⁾

Aus dem Chemischen Institut der Universität Hamburg, Abteilung für Organische Chemie
(Eingegangen am 22. März 1957)

D-Fructose läßt sich mit Aminosäuren wie Glycin, L-Alanin, D-Alanin, β -Alanin und L-Leucin zu *N*-D-Fructosyl-aminosäuren umsetzen, die zu 2-*N*-Aminosäure-2-desoxy-D-glucosen („Glucose-Aminosäuren“) umgelagert werden können. Bei der Umlagerung entstehen zugleich auch die entsprechenden Mannose-derivate; im Falle des Glycins wurde 2-*N*-Glycino-2-desoxy-D-mannose (Mannose-Glycin) isoliert. — Mit wäßrigen organischen Säuren werden die Glucose-Aminosäuren wieder unter Rückumlagerung in D-Fructose und Aminosäure zerlegt. Glucose-D-Alanin und Glucose-L-Alanin unterscheiden sich in ihren Lösungseigenschaften erheblich, so daß auf diese Weise eine Spaltung des DL-Alanins in die optischen Antipoden möglich ist.

Wie wir bereits früher zeigen konnten³⁾, reagiert Fructose mit Ammoniak unter verschiedenen Bedingungen zu einem Ketosylamin, das zum Teil spontan auf dem Wege einer Amadori-analogen Umlagerung in D-Glucosamin übergeht. Das bei der Umlagerung zugleich zu erwartende isomere D-Mannosamin entsteht nur in untergeordneter Menge. Von L. F. LELOIR und C. E. CARDINI⁴⁾ ist kürzlich eine Biosynthese des D-Glucosamins aufgefunden worden, die der vorstehenden Reaktion im wesentlichen entspricht. Diese Autoren isolierten aus Nieren Enzyme, die die Bildung von *N*-Acetyl-D-glucosamin-6-phosphat aus D-Fructose-6-phosphat, Ammoniak und Acetat katalysieren.

D-Fructose liefert mit verschiedenen aliphatischen Aminen und mit Aminosäuren *N*-substituierte Derivate des D-Glucosamins^{5, 2)}; auch andere Ketosen reagieren entsprechend⁶⁾, wobei die Reaktion zuweilen auf der Stufe der Ketosylamine stehenbleibt, die sich dann aber mittels Umlagerungskatalysatoren in die 2-Amino-2-desoxyaldosen überführen lassen. In diesem Zusammenhang haben wir die Umsetzung von

¹⁾ Die 2-*N*-Aminosäure-2-desoxy-D-glucosen stellen *N*-substituierte Derivate des D-Glucosamins (2-Amino-2-desoxy-D-glucose) dar, bei denen Aminozucker und Aminosäure über ein gemeinsames Stickstoffatom verbunden sind. Als vereinfachte Bezeichnung für diese Verbindungen gebrauchen wir den allgemeinen Namen „Glucose-Aminosäuren“. Die spezielle Verbindung 2-*N*-L-Alanino-2-desoxy-D-glucose wird dann als Glucose-L-Alanin bezeichnet.

²⁾ Vgl. K. HEYNS, H. PAULSEN und H. BREUER, Angew. Chem. **68**, 334 [1956].

³⁾ K. HEYNS und W. KOCH, Z. Naturforsch. **76**, 486 [1952]; K. HEYNS und K. H. MEINECKE, Chem. Ber. **86**, 1453 [1953].

⁴⁾ Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **20**, 33 [1956].

Vgl. auch die entsprechenden Ausführungen zur Biosynthese der Monosaccharide in der Übersicht von L. HOUGH und J. K. N. JONES, Advances Carbohydrate Chem. **11**, 247 [1956].

⁵⁾ K. HEYNS, R. EICHSTEDT und K. H. MEINECKE, Chem. Ber. **88**, 1551 [1955]; J. F. CARSON, J. Amer. chem. Soc. **77**, 1881, 5957 [1955].

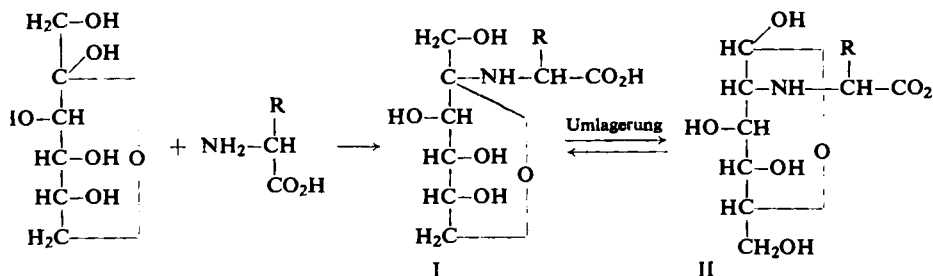
⁶⁾ K. HEYNS, H. PAULSEN, R. EICHSTEDT und M. ROLLE, Chem. Ber. **90** [1957], im Druck.

D-Fructose mit Glycin, DL-Alanin, L- und D-Alanin, β -Alanin und Leucin unter ähnlichen Bedingungen näher untersucht.

Die Umsetzung von Aldosen und Ketosen mit den Aminogruppen von Aminosäuren und Proteinen ist oft studiert worden. MAILLARD untersuchte diese Reaktion⁷⁾ im Jahre 1912 im Zusammenhang mit der Frage nach der Ursache der nichtenzymatischen Bräunung von Naturstoffen und Lebensmitteln. Diese zu braun gefärbten Produkten (Melanoidinen) führende Reaktion gab in den darauffolgenden Jahrzehnten Anlaß zu zahlreichen Untersuchungen⁷⁾, ohne daß es gelang, niedrigmolekulare Zwischenverbindungen zu isolieren bzw. in ihrer Struktur aufzuklären.

Inzwischen haben Zucker-Aminosäureverbindungen erhebliches physiologisches Interesse erlangt. So isolierten BORSOOK und Mitarbeiter⁸⁾ aus Leberextrakten verschiedene 1-N-Aminosäure-1-desoxy-D-fructosen („Fructose-Aminosäuren“), die Derivate des D-Isoglucosamins darstellen. Diese Verbindungen katalysieren bereits in kleinen Mengen den Einbau von Aminosäuren in die Proteine von Kaninchenreticulocyten. BORSOOK und Mitarbeiter⁹⁾ haben daraufhin eine große Anzahl von Fructose-Aminosäuren durch Umsetzung von Glucose mit Aminosäuren und anschließender Amadori-Umlagerung synthetisch erhalten. Vorher hatte bereits A. GOTTSCHALK¹⁰⁾ durch Influenza-Virus aus Mucoproteinen eine Aminosäure-Kohlenhydrat-Komponente abgespalten, die nach ihren Eigenschaften gleichermaßen als Derivat des D-Isoglucosamins des obigen Typs angesprochen wurde, und hat daraufhin das Fructose-DL-Phenylalanin als Vergleichssubstanz synthetisiert.

Aus D-Fructose und Aminosäuren entstehen in Methanol zunächst — meistens spontan — die N-D-Fructosyl-aminosäuren I. In manchen Fällen ist jedoch eine Katalyse mit Ammoniumchlorid erforderlich. Die Verbindungen I erfahren eine Umlagerung zur Aldose, die im allgemeinen bereits durch die im Molekül vorhandene Carboxylgruppe der Aminosäurekomponente katalysiert werden kann. Bei einigen Verbindungen erfolgt jedoch die Umlagerung erst nach Zusatz organischer Säuren (Essigsäure, Oxalsäure, Bernsteinsäure), wie dies in ähnlicher Weise auch bei der Ketosylamin-Umlagerung zu 2-Amino-aldosen der Fall ist⁶⁾.



Von den beiden bei der Umlagerung zu erwartenden Isomeren, den Derivaten des D-Glucosamins und des D-Mannosamins, entstehen bevorzugt die N-substituierten

⁷⁾ Ausführliche Literaturzusammenstellung bei J. P. DANBY und W. W. PIGMAN, *Advances of Food Research* 3, 241 [1951]; J. E. HODGE, *Agric. and Food Chemistry* 1, 928 [1953].

⁸⁾ H. BORSOOK, A. ABRAMS und P. H. LOWY, *J. biol. Chemistry* 215, 111 [1955].

⁹⁾ A. ABRAMS, P. H. LOWY und H. BORSOOK, *J. Amer. chem. Soc.* 77, 4794 [1955]; P. H. LOWY und H. BORSOOK, *ebenda* 78, 3175 [1956]; vgl. auch A. KLEMER und F. MICHEEL, *Chem. Ber.* 89, 1242 [1956].

¹⁰⁾ *Nature* [London] 167, 845 [1951]; *Biochem. J.* 52, 455 [1952].

Derivate des D-Glucosamins II. Dieses Ergebnis entspricht der Fructosylamin-Umlagerung, die praktisch fast ausschließlich D-Glucosaminderivate liefert. Im vorliegenden Falle entstehen jedoch in merklichem Ausmaß auch D-Mannosaminderivate, die weiter unten näher beschrieben werden sollen.

Bei der Umsetzung mit D-Fructose zeigen die Aminosäuren ein recht verschiedenes Reaktionsvermögen. β -Alanin reagiert bereits bei Zimmertemperatur mit guter Ausbeute. Glycin und D-Fructose müssen dagegen mehrere Stunden in Methanol erhitzt werden, während die Umsetzung mit DL-Alanin auch unter diesen Bedingungen nur gering ist. Die besten Ausbeuten werden hier erhalten, wenn DL-Alanin und D-Fructose zunächst in Gegenwart katalytischer Mengen von Ammoniumchlorid behandelt werden, wodurch die Bildung von N-[D-Fructosyl]-DL-alanin begünstigt wird, da das Alanin in Gegenwart von Ammoniumchlorid in einer methanolischen D-Fructoselösung besser löslich ist. Das Auftreten von Umlagerungsprodukten läßt sich in größerem Umfang dagegen erst nachweisen, wenn man nach der Behandlung mit Ammoniumchlorid noch kurze Zeit mit Oxalsäure erwärmt. L-Leucin, das ohne Zusätze mit D-Fructose nur wenig reagiert, liefert unter den gleichen Bedingungen wie DL-Alanin beträchtliche Mengen von Verharzungsprodukten (Dunkelfärbung), die die Aufarbeitung erschweren und die Ausbeute mindern. Die besten Ausbeuten erhält man hier, wenn L-Leucin und D-Fructose in Gegenwart katalytischer Mengen von Oxalsäure in methanolischer Lösung miteinander erhitzt werden. L-Glutaminsäure und L-Asparaginsäure reagieren am besten, wenn eine der Carboxylgruppen zu 90% mit Natriummethylat neutralisiert wird. Die Aufarbeitung der Reaktionsprodukte erfolgt an Ionenaustauschern. Alle basischen Bestandteile werden zunächst an saurem Austauscher (Lewatit S 100) absorbiert und dann mit Trichloressigsäure verschiedener Konzentration fraktioniert eluiert. In manchen Fällen muß die Austauschertrennung wiederholt werden, wobei die Glucose-Aminosäuren als erste Fraktionen erscheinen. Die reinen Glucose-Aminosäuren sind schön kristallisierte, beständige Verbindungen.

Die Umsetzung von D-Fructose mit Glycin führt zu 2-N-Glycino-2-desoxy-D-glucose (Glucose-Glycin)*). Die Oxydation dieser Verbindung mit Quecksilberoxyd liefert die gut kristallisierte 2-N-Glycino-2-desoxy-D-gluconsäure. Die optische Drehung dieser Verbindung in alkalischer Lösung (0.2 nNaOH) beträgt $[\alpha]_D^{20}$: + 21°, in saurer Lösung dagegen $[\alpha]_D^{20}$: + 26°. Nach der LEVENESchen Salzregel¹¹⁾ würde diese Drehungsänderung für eine D-Mannose-Konfiguration sprechen. Ein in Tab. I vorgenommener Vergleich der Drehwerte von Glucose-Glycin mit den Drehwerten von D-Glucosamin-hydrochlorid und D-Mannosamin-hydrochlorid spricht aber eindeutig für die D-Glucose-Konfiguration der oben als Glucose-Glycin bezeichneten Verbindung. Die LEVENESche Salzregel¹¹⁾ trifft offenbar für 2-N-Glycino-2-desoxy-D-gluconsäure, wahrscheinlich durch den Einfluß der zweiten Carboxylgruppe, nicht mehr zu.

¹¹⁾ P. A. LEVENE, J. biol. Chemistry 63, 95 [1925].

*) *Anm. b. d. Korr.*: D-Glucose-Glycin wurde inzwischen von R. KUHN und W. BISTER (Liebigs Ann. Chem. 602, 217 [1957]) durch Halbhydrierung von N-Carbäthoxymethyl-D-glucosaminsäurenitril erhalten. Die so dargestellte Substanz ist in allen Eigenschaften mit unserem Produkt identisch. Herrn Professor Dr. R. KUHN danken wir für die Übersendung eines Vergleichspräparates.

Die Mutterlauge der Glucose-Glycin-Kristallisation zeigt auf dem Papierchromatogramm getrennte, AgNO_3 -positive Flecke mit den R_F -Werten 0.07 und 0.09, von denen der niedrigere dem kristallinen Glucose-Glycin, die schneller laufende Substanz dem Mannose-Glycin zugeordnet werden. Beide Stoffe lassen sich auf einer Cellulose-säule durch Eluierung mit wassergesättigtem Butanol als Lösungsmittel voneinander trennen. Das Mannose-Glycin fällt als feines amorphes, weißes Pulver aus, das nach nochmaligem Umfällen papierchromatographisch völlig einheitlich ist.

Daß es sich bei der erhaltenen Verbindung um das Epimere des Glucose-Glycins handelt, erweist die Elementaranalyse, die für beide Stoffe die Zusammensetzung $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{O}_7\text{N}$ ergibt, sowie die Umsetzung mit Phenylhydrazin in essigsaurer Lösung, die in beiden Fällen zum D-Glucose-phenylosazon führt. Die Behandlung beider Verbindungen mit 2*n* Essigsäure bei 115° ergibt die Ausgangsprodukte Fructose und Glycin. Tab. 1 enthält eine Gegenüberstellung der spezifischen Drehwerte der beiden Aldose-Aminosäuren neben denen von D-Glucosamin-hydrochlorid und D-Mannosamin-hydrochlorid:

Tab. 1. Vergleich der spezif. Drehwerte der Hexose-Glycinverbindungen mit den entsprechenden Aminosuckern

D-Glucose-Glycin	$[\alpha]_D^{20}: + 81^\circ$	D-Glucosamin-HCl	$[\alpha]_D^{20}: + 72.5^\circ$
D-Mannose-Glycin	$[\alpha]_D^{20}: - 7^\circ$	D-Mannosamin-HCl	$[\alpha]_D^{20}: - 5.2^{(12)}$
D-Fructose-Glycin ^{8,9)}	$[\alpha]_D^{20}: - 64^\circ$	D-Isoglucosamin- $\text{CH}_3 \cdot \text{CO}_2\text{H}$	$[\alpha]_D^{20}: - 59^{(13)}$

Man erkennt deutlich die Zusammengehörigkeit der Glycinderivate mit den zugrundeliegenden einfachen Aminosuckern. In die Tabelle ist auch das dritte Epimere der Reihe, das von BORSOOK⁸⁾ dargestellte Fructose-Glycin, mitaufgenommen worden und mit Isoglucosamin-acetat verglichen. Mit Phenylhydrazin in essigsaurer Lösung entsteht daraus ebenfalls beim Erwärmen D-Glucose-phenylosazon.

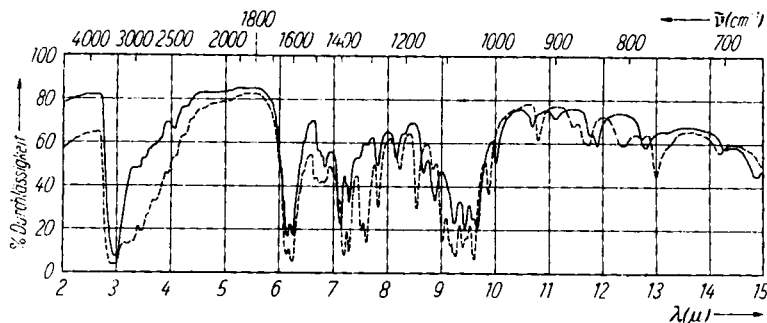
Als Reaktionsprodukt der Umsetzung von D-Fructose mit DL-Alanin erhält man zunächst eine amorphe Substanz der Drehung $[\alpha]_D^{20}: + 32^\circ$, die eine Mischung der Aminosäure-Zuckerverbindungen des D- und L-Alanins²⁾ darstellt; nach Auflösen in Methanol kristallisiert in kurzer Zeit praktisch quantitativ D-Glucose-D-Alanin aus. Sehr viel langsamer und schwerer kristallisiert nach Einengen und Zusatz von Isopropylalkohol aus der Mutterlauge das Glucose-L-Alanin. Beide Komponenten lassen sich aber auf diese Weise nacheinander gewinnen. Aus der nach Abscheidung des Glucose-L-Alanins verbleibenden Mutterlauge sind durch Fällung weitere Produkte erhältlich, die wesentlich geringere Drehungen als die der Glucose-Alanin-Verbindungen aufweisen. Es ist zu vermuten, daß sie analog den Verhältnissen beim Glycin einen beträchtlichen Anteil an leicht löslichen Mannose-Alanin-Verbindungen enthalten.

Bei der Umsetzung von reinem D- bzw. L-Alanin mit Fructose zum D-Glucose-D-Alanin und D-Glucose-L-Alanin erwies sich ebenfalls die Verbindung des L-Alanins als leichter löslich und schwerer kristallisierbar. Mit Hilfe der so gewonnenen reinen Verbindungen ließ sich eine einwandfreie Zuordnung der vorstehend aus dem mit

¹²⁾ P. A. LEVENE, Biochem. Z. **124**, 37 [1921].

¹³⁾ E. FISCHER, Ber. dtsch. chem. Ges. **19**, 1920 [1886].

DL-Alanin erhaltenen Diastereomeren-Gemisch isolierten beiden Alanin-Verbindungen durchführen. Die beiden Diastereomeren Glucose-D-Alanin und Glucose-L-Alanin unterscheiden sich durch Schmelzpunkt, Kristallform, Infrarotspektrum und Löslichkeit. D-Glucose-L-Alanin nimmt beim Umkristallisieren aus Wasser ein Molekül Kristallwasser auf. Dabei verändert sich auch das Infrarotspektrum beträchtlich. Das Wasser wird auch beim Erhitzen i. Vak. auf 65° nicht wieder abgegeben.



IR-Spektren von Glucose-L-Alanin (—) und Glucose-D-Alanin (---), fest in KBr gepreßt (Perkin-Elmer, Mod. 21)

D-Fructose und β -Alanin reagieren sehr leicht und mit guten Ausbeuten zu 2-*N*- β -Alanino-2-desoxy-D-glucose (Glucose- β -Alanin), das jedoch aus der methanolischen Lösung des amorphen Fällungsproduktes nur sehr langsam auskristallisiert. 2-*N*-L-Leucino-2-desoxy-D-glucose (Glucose-L-Leucin) aus *D*-Fructose und L-Leucin läßt sich nach der Austauscherreinigung nur schwer von seinen Nebenprodukten trennen. Man reinigt es am besten auf einer Cellulosesäule.

Die Reaktion ist ferner anwendbar auf andere Ketosen und eine Reihe anderer Aminosäuren sowie auf Di- und Tripeptide, wobei die entsprechenden Zucker-Aminosäure-Verbindungen entstehen. Über die bei diesen Umsetzungen entstehenden Verbindungen wird gesondert berichtet werden.

Wir konnten weiterhin feststellen, daß die Ketosylamin-Umlagerung überraschenderweise in wäßriger Lösung mit organischen Säuren als Katalysatoren in rückwärtiger Richtung verläuft. Gegenüber Mineralsäuren wie Salzsäure sind Glucose-Aminosäuren relativ beständig. Sie werden bei 2stdg. Erhitzen mit 2*n* HCl nur in geringer Menge zerstört. Beim Erhitzen mit wäßrigen verdünnten organischen Säuren (2*n* Essigsäure oder Bernsteinsäure) dagegen werden sie fast vollständig wieder in Aminosäure und *D*-Fructose zerlegt. Nur ein geringer Teil der gebildeten *D*-Fructose reagiert unter dem Einfluß der Säuren weiter zu Hydroxymethylfurfurol. Das Auftreten der *D*-Fructose zeigt einwandfrei, daß es sich bei dieser Reaktion nicht um einen hydrolytischen Abbau des Moleküls, sondern um eine echte „Retro-Amadori-Ketosylamin-Umlagerung“ handelt. Die dabei aus der Glucose-Aminosäure II primär erhältlichen *N*-*D*-Fructosyl-aminosäuren I werden unter dem Einfluß der wäßrigen Säure sehr leicht zu *D*-Fructose und Aminosäure hydrolysiert und somit aus dem Gleichgewicht entfernt, wodurch die nahezu vollständige Spaltung erklärbar ist.

Die rückläufige Umlagerung beschränkt sich keineswegs auf *N*-substituierte Derivate des *D*-Glucosamins. Auch beim mehrstündigen Erhitzen von *D*-Glucosamin-hydrochlorid mit 2 *n* Essigsäure bei 115° läßt sich einwandfrei die Bildung von *D*-Fructose, wenn auch nur in sehr geringer Ausbeute, nachweisen. Die *D*-Fructose dürfte über den oben angegebenen Reaktionsverlauf entstanden sein.

Bei den aus Glucose und Aminosäuren erhältlichen Amadori-Verbindungen, den Fructose-Aminosäuren⁹⁾, ist die Rückumlagerung kaum realisierbar. Beim Erhitzen der Fructose-Aminosäuren mit wäßriger 2 *n* Essigsäure zersetzt sich das Molekül größtenteils unter starker Dunkelfärbung und Bildung von Hydroxymethylfurfurol. Zurückgebildete *D*-Glucose ist nur in geringen Spuren nachweisbar.

Da Glucose-*D*-Alanin und Glucose-*L*-Alanin sich in ihren Löslichkeitseigenschaften so erheblich unterscheiden, daß eine Trennung recht gut möglich ist, eröffnet sich ein neuer Weg zur Aufspaltung von *DL*-Alanin in die optisch aktiven Antipoden. Die Rückspaltung der Glucose-Aminosäuren mit organischen Säuren liefert jedoch Sekundärprodukte, welche die Ausbeute mindern.

Beim Erwärmen mit 0.1 *n* NaOH werden dagegen aus den Glucose-Aminosäuren die Aminosäuren in 10 Min. nahezu vollständig abgespalten. Sie lassen sich dann durch einen sauren Austauscher abtrennen. Als weiteres Spaltprodukt tritt neben Fructose eine nicht reduzierende Komponente vom *R_F*-Wert 0.12 auf. Die Spaltung der Glucose-Aminosäuren kann vorteilhaft auch durch 1stdg. Erwärmen mit einem stark basischen Ionenaustauscher erfolgen. Die Aminosäure wird dabei vom Austauscher praktisch nicht gebunden und läßt sich aus der Lösung rein gewinnen. Die wäßrige Alanin-Lösung enthält dann als einziges Nebenprodukt eine ninhydrin-negative Substanz vom *R_F*-Wert 0.36, die mit ammoniakalischer Silbernitratlösung sehr schwach, dagegen stark mit alkalischer Permanganat-Perjodat-Lösung¹⁴⁾ reagiert. Vom basischen Austauscher lassen sich als weitere Spaltprodukte Kohlendioxyd und zwei Substanzen vom *R_F*-Wert 0.42 und 0.48 eluieren, die nur auf alkalische Permanganat-Perjodat-Lösung ansprechen. Das durch Umsetzung mit *DL*-Alanin erhaltene Glucose-*D*-Alanin bzw. Glucose-*L*-Alanin ergab nach der Spaltung die entsprechende reine Aminosäure mit den optischen Werten: *D*-Alanin $[\alpha]_D^{20}$: -14.5° in 6 *n* HCl, *L*-Alanin $[\alpha]_D^{20}$: $+14.2^\circ$ in 6 *n* HCl. Damit ist erwiesen, daß bei der alkalischen Spaltung keine Racemisierung des Alanins eintritt.

Die Glucose-Aminosäuren geben den ELSON-MORGAN-Test¹⁵⁾ auf 2-Aminozucker nach der Vorbehandlung mit Acetylaceton viel schwächer als *D*-Glucosamin. Erwärmt man vor der Zugabe von *p*-Dimethylaminobenzaldehyd (Ehrlichs Reagens) nur mit verdünnter Natriumcarbonatlösung, wie es bei *N*-Acetyl-*D*-glucosamin ausreichend ist, so wird der rote Farbstoff nicht gebildet. Nach kurzem Erhitzen (einige Min.) der Glucose-Aminosäuren mit 0.1 *n* NaOH auf 100° wird jedoch auf Zusatz einer salzsauren alkoholischen Lösung von *p*-Dimethylaminobenzaldehyd sofort ein intensiv roter Farbstoff gebildet.

Im Gegensatz zu den Fructose-Aminosäuren⁸⁾ wird eine alkalische Lösung von Kaliumhexacyanoferrat(III) von den Glucose- oder Mannose-Aminosäuren prak-

¹⁴⁾ R. U. LEMIEUX und H. F. BAUER, *Analytic. Chem.* **26**, 920 [1954].

¹⁵⁾ L. A. ELSON und W. TH. MORGAN, *Biochem. J.* **27**, 1824 [1933].

tisch nicht reduziert. Auf dem Papierchromatogramm verhalten sich die Glucose-Aminosäuren gegenüber ammoniakalischer Silbernitratlösung wie reduzierende Zucker. Es entstehen mittelbraune Flecken im Gegensatz zu den graubraunen bis grauschwarzen der Fructose-Aminosäuren. Mit Ninhydrin reagieren sie in der Kälte nicht. Erst bei stärkerem Erwärmen treten Flecken auf, die aber nicht charakteristisch sind, da sie unter diesen Bedingungen auch bei reduzierenden Zuckern beobachtet werden können (Tab. 2).

Tab. 2. R_F -Werte der Aldose-Aminosäuren im System Butanol, Eisessig, Wasser (7:0.7:2.3)

	D-Glucose-Glycin	D-Glucose-D-Alanin	D-Glucose-L-Alanin	D-Glucose- β -Alanin	D-Glucose-L-Leucin	D-Mannose-Glycin
R_F	0.07	0.12	0.12	0.11	0.40	0.09

Die R_F -Werte der Glucose-Aminosäuren sind niedriger als die der zugehörigen Aminosäuren und zum Teil auch niedriger als die von D-Glucose. Die R_F -Werte von diastereomeren Glucose-Aminosäuren zeigen keine Unterschiede. Ebenso sind die R_F -Werte von Glucose-Aminosäuren und Fructose-Aminosäuren ein und derselben Aminosäure praktisch identisch. Etwas höhere R_F -Werte haben zum Teil die Mannose-Aminosäuren. Dadurch ist man in der Lage, auf einer Cellulosesäule Mannose-Aminosäuren und Glucose-Aminosäuren voneinander zu trennen.

Die verhältnismäßig leichte Bildung von Glucose-Aminosäuren und die ebenso leichte Rückspaltung in D-Fructose und Aminosäuren legt die Vermutung nahe, daß diese Substanzklasse im biologischen Bereich auftritt und im Stoffwechsel von Bedeutung ist. Wir haben einen wäßrigen Leberextrakt¹⁶⁾ mittels Ionenaustauschers aufgearbeitet und fanden zunächst in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von H. BORSOOK und Mitarbb.⁸⁾ einen relativ hohen Gehalt an Fructose-Aminosäuren. Nach Abbau bzw. Zerstörung der Hauptmenge der Fructose-Aminosäuren durch Erhitzen mit Salzsäure ließen sich Fraktionen von Zucker-Aminosäure-Verbindungen erhalten, die bei der oben beschriebenen Rückspaltung mit 2 *n* Essigsäure bei 115° D-Fructose liefern, was auf das Vorhandensein von Glucose-Aminosäuren im Leberextrakt hindeutet. Über weitere Ergebnisse wird an anderer Stelle berichtet.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

2-N-Glycino-2-desoxy-D-glucose (D-Glucose-Glycin): 10 g fein gepulvertes Glycin wurden in einer Lösung von 100 g gut getrockneter D-Fructose in 600 ccm absol. Methanol 3 Stdn. zum Sieden erhitzt. Während sich die Lösung gelblich braun färbte, ging das Glycin nach und nach in Lösung. Nach dem Abkühlen wurde vom ungelöst gebliebenen Glycin abfiltriert (3.4 g) und das Methanol i. Vak. abgedampft. Der Rückstand wurde in 200 ccm Wasser aufgenommen und langsam auf eine stark saure Ionenaustauschersäule (Lewatit S 100, H⁺-Form, 32 × 500 mm) gebracht. Er wurde mit 2 l dest. Wasser gewaschen, um die nicht umgesetzte Fructose zu entfernen. Darauf wurde die Austauschersäule mit 0.2 *n* Trichloressigsäure (TCE) eluiert und das Eluat in Fraktionen von etwa 10 ccm mit Hilfe eines Fraktionssammlers aufgefangen. Jede zehnte Fraktion wurde papierchromatographisch untersucht. Zur Erkennung von Glucose-

¹⁶⁾ Herrn Dozent Dr. V. WOLF und den NORDMARK-WERKEN, Uetersen/Holst., danken wir für die Überlassung der Extrakte aus der Leberaufarbeitung.

Aminosäuren wurde mit ammoniakalischer Silbernitratlösung angefärbt, während im Parallelchromatogramm mit Ninhydrin auf Aminosäuren geprüft wurde. Die Fraktionen 65–240 waren silbernitratpositiv und ninhydrinnegativ, die Fraktionen ab 240 gegenüber beiden Reagenzien negativ. Die Reaktionsprodukte sind vollständig in den Fraktionen 65–240 enthalten. Das nicht umgesetzte Glycin bleibt auf der Austauschersäule. Es wird beim Regenerieren der Säule mit 2 *n* HCl entfernt.

Die Fraktionen 65–105 geben im Silbernitratchromatogramm einen Fleck, während die Fraktionen 110–240 einen Doppelfleck zeigen, dessen Intensität immer geringer wird. Mit Austauschern ist also eine gewisse Trennung des Glucose-Glycins (einfacher Fleck der Fraktionen 65–105) vom Mannose-Glycin (schneller laufender Anteil des Doppelflecks) der Fraktionen 110–240 zu erzielen.

Zur Gewinnung der beiden Aldose-Aminosäuren wurden die vereinigten Fraktionen 65–240 im Perforator mit Äther von TCE befreit und die wäßrige Lösung i. Vak. eingeeengt. Der zurückgebliebene gelbbraune Sirup wurde in wenig Wasser aufgenommen, die Lösung mit Tierkohle entfärbt, das Filtrat wieder eingeeengt, der Rückstand mit Methanol aufgenommen und zur Entfernung der Wasserreste nochmals eingeeengt. Der jetzt hellgelbe Sirup wurde in 50 ccm Methanol gelöst. Aus dieser Lösung schieden sich zunächst keine Kristalle ab. Auf Zusatz von etwa 40 ccm wassergesätt. Butanol unter kräftigem Schütteln begann alsbald die Kristallisation von *Glucose-Glycin*, die über Nacht im Eisschrank vervollständigt wurde. Es wurde abgesaugt, mit Methanol gewaschen und getrocknet. Ausb. an Rohprodukt 3.4 g.

Löst man 1.0 g des Rohproduktes in 5 ccm heißem Wasser und gibt zu der Lösung nacheinander 5 ccm heißes Methanol und 5 ccm heißes Äthanol, so daß gerade noch keine Trübung auftritt, so kristallisiert alsbald das *Glucose-Glycin* in sehr reiner Form aus. Ausb. mindestens 0.85 g *Glucose-Glycin*. Die Substanz verkohlt beim Erhitzen im Schmelzpunktröhrchen ab 180° und ist bei 250° noch nicht zerschmolzen.

$C_8H_{15}O_7N$ (237.2) Ber. C 40.50 H 6.47 N 5.91 Gef. C 40.41 H 6.61 N 5.68

$[\alpha]_D^{20}$: + 96° (4 Min.) \longrightarrow + 81° (Endwert) ($c = 2$, in Wasser)

Kristallisiert man *Glucose-Glycin* aus weniger konzentrierten Lösungen (1 g *Glucose-Glycin* in 10 ccm heißem Wasser + 10 ccm Methanol), so kristallisiert es mit 1 Mol. Kristallwasser in feinen, langen Nadeln (Ausb. 0.7 g). Das Kristallwasser wird bei mehrstündigem Erwärmen auf 60° bei 0.1 Torr nicht abgegeben. Beim Erhitzen über den Zersetzungspunkt verhält es sich wie die wasserfreie Verbindung.

$C_8H_{15}O_7N \cdot H_2O$ (255.2) Ber. C 37.65 H 6.71 N 5.49 Gef. C 37.81 H 6.80 N 5.29

$[\alpha]_D^{20}$: + 90° (4 Min.) \longrightarrow + 75° (Endwert) ($c = 2$, in Wasser)

Glucose-Glycin-phenylhydrazon: 0.1 g *Glucose-Glycin*, 0.15 g Phenylhydrazin und 1.2 ccm H_2O wurden 5 Stdn. in der Kälte stehengelassen. Nach Zugabe von 1.2 ccm Methanol erfolgte Kristallisation. Schmp. 172–173° (Zers.), R_F 0.3.

$C_{14}H_{21}O_6N_3$ (327.3) Ber. N 12.84 Gef. N 13.25

2-N-Glycino-2-desoxy-D-mannose (D-Mannose-Glycin): (aus den Mutterlaugen der *Glucose-Glycin*-Kristallisationen): Beim Einengen des Filtrates der *Glucose-Glycin*-Kristallisationen blieben etwa 6 g noch nicht ganz lösungsmittelfreier, gelber Sirup zurück, der aus *Glucose-Glycin* und *Mannose-Glycin* bestand, die durch Kristallisation nicht zu trennen waren. Beide Stoffe wurden in 2 Anteilen auf Cellulosesäulen getrennt.

Die Hälfte des Rohsirups, gelöst in ca. 3 ccm Wasser und 20 ccm Methanol, wurde auf eine Cellulosesäule (60 × 600 mm Whatman-Standard) gegeben, die mit Butanol/Wasser (gesätt.) eingeschlämmt und mit einigen Litern wassergesätt. Butanol durchgewaschen worden

war. Nach dem Einsickern der Lösung wurde mit 20 ccm Methanol nachgewaschen und mit wassergesätt. Butanol eluiert. Die ersten 600 ccm des Eluats wurden verworfen. Dann wurden im Fraktionssammler Fraktionen von je 10–12 ccm gesammelt und jede zehnte papierchromatographisch geprüft. Die ersten silbernitratpositiven Fraktionen enthielten Mannose-Glycin, die folgenden Mannose-Glycin und Glucose-Glycin nebeneinander, die Endfraktionen reines Glucose-Glycin. Die Mannose-Glycin-Fraktionen wurden i. Vak. eingengt. Da das Wasser hierbei zuerst überdestillierte und die Verbindung in wasserfreiem Butanol unlöslich ist, fiel Mannose-Glycin, nachdem etwa die Hälfte des Lösungsmittels abgedampft war, in amorpher Form aus. Es wurde auf 50 ccm eingengt, über Nacht im Eisschrank stehengelassen, abgesaugt, mit Butanol nachgewaschen und getrocknet. Die Mutterlauge enthielt praktisch kein Mannose-Glycin mehr, dafür butanollösliche Stoffe aus der Cellulose-säule. Die Eluate sollen daher nicht ganz zur Trockne eingedampft werden.

Zwei Säulentrennungen ergaben 1.7 g praktisch reines Mannose-Glycin. Die ersten, etwas gelblichen Mannose-Glycin-Fraktionen wurden getrennt von den Hauptfraktionen aufgearbeitet und ergaben nochmals 0.7 g eines nicht ganz reinen Präparates. Aus den Mittelfraktionen wurden 0.5 g eines Gemisches von Mannose-Glycin und Glucose-Glycin erhalten, die Endfraktionen lieferten 0.6 g reines Glucose-Glycin, von dem damit insgesamt 4.0 g erhalten wurden.

Zur Reinigung wurde das Mannose-Glycin (1.7 g) in Wasser gelöst, mit Tierkohle behandelt, filtriert und mit so viel wasserfreiem Butanol versetzt, daß ein Einphasengemisch entstand, welches wieder i. Vak. eingengt wurde.

Mannose-Glycin ist ein feines, weißes amorphes Pulver, welches an der Luft Feuchtigkeit anzieht und keine Neigung zur Kristallisation zeigt. Ausb. an reinem Produkt 1.5 g. Schmp. 118–120° (Zers.).

$C_8H_{15}O_7N$ (237.2) Ber. C 40.50 H 6.37 N 5.91 Gef. C 39.95 H 6.55 N 5.76

$[\alpha]_D^{20}$: -7° (keine Mutarotation) ($c = 2$, in Wasser)

Mannose-Glycin-phenylhydrazon: Darstellung wie beim Glucose-Glycin-phenylhydrazon beschrieben. Es erstarrte als Gallerte, die abgepreßt und mehrmals mit Methanol verrieben wurde. Schmp. 143–145° (Zers.).

$C_{14}H_{21}O_6N_3$ (327.3) Ber. N 12.84 Gef. N 11.82

2-N-D-Alanino-2-desoxy-D-glucose und 2-N-L-Alanino-2-desoxy-D-glucose (D-Glucose-D-Alanin und D-Glucose-L-Alanin): 60 g *D-Fructose*, 5 g *DL-Alanin* und 0.5 g Ammoniumchlorid wurden in 350 ccm Methanol 6 Stdn. auf dem Wasserbad unter Rückfluß erwärmt. Aus der braun gewordenen Lösung wurden nach dem Abkühlen 900 mg ungelöstes DL-Alanin abfiltriert und das Filtrat mit 1 g wasserfreier Oxalsäure 30 Min. auf dem Wasserbad erwärmt. Nach Einengen der methanol. Lösung wurde in wenig Wasser aufgenommen und, wie beim Glucose-Glycin beschrieben, die Umsetzungsprodukte über eine saure Austauschersäule (Lewatit S 100. H^+ -Form, 25 × 400 mm) getrennt. Nach dem Auswaschen mit Wasser wurde mit 500 ccm 0.1 *n* TCE eluiert, dann mit 0.2 *n* TCE (Tropfgeschwindigkeit ca. 40 ccm/Stde., 240 Fraktionen). Die papierchromatographische Auswertung ergab folgendes, etwas vereinfachtes Bild:

In 0.1 *n* TCE-Eluat (ca. 200 mg Substanz) befanden sich zwei silbernitratpositive Substanzen in etwa gleicher Menge, eine unbekannte Substanz A vom R_F -Wert 0.06. Die zweite Substanz (B) vom R_F -Wert 0.12 war Glucose-Alanin. Die Fraktionen (0.2 *n* TCE) 1–48 (2.5 g Substanz) enthielten die Hauptmenge des Glucose-Alanins neben Mannose-Alanin. Auch die Fraktionen 49–80 (ca. 500 mg) enthielten noch Glucose-Alanin, jedoch verunreinigt mit Glucosamin (Substanz C) vom R_F -Wert 0.12, welches aus Fructose und dem zugesetzten Ammoniumchlorid entstanden sein mußte. Das Glucosamin konnte durch nochmalige

Austauschertrennung entfernt werden. Die Fraktionen 81–95 enthielten hauptsächlich Glucosamin, das nach der Reinigung durch präparative Papierchromatographie im R_F -Wert mit natürlichem Glucosamin aus Hummerschalen übereinstimmte und nach P. J. STOFFYN und R. W. JEANLOZ¹⁷⁾ mit Ninhydrin in Gegenwart von Pyridin beim Erwärmen zu Arabinose abgebaut werden konnte. Die Fraktionen 96–115 (~ 70 mg) enthielten neben Glucosamin eine weitere ninhydrin- und silbernitratpositive Substanz D mit einem etwas größeren R_F -Wert als Glucosamin. In den Fraktionen 115–170 (ca. 200 mg) war außer Substanz D eine fünfte, silbernitratpositive Substanz, R_F ca. 0.3, enthalten. Ab Fraktion 175 trat nur noch ein schwacher Alaninfleck auf.

Die Fraktionen 1–48 wurden im Perforator ausgeäthert, eingeengt und nochmals über eine Austauschersäule getrennt. Das erhaltene leicht gelbliche sirupöse Rohprodukt wurde nach dem Auflösen in 80 ccm Methanol durch portionenweise Zugabe von 50 ccm wasserfreiem Äther gefällt. Die unreine Vorfällung wurde abzentrifugiert und aus der Mutterlauge mit 500 ccm Äther die Hauptmenge gefällt. Nach dem Abzentrifugieren wurde mit Methanol/Äther (1:5) gewaschen und das amorphe Fällungsprodukt im Vakuumexsiccator getrocknet. Ausb. 2.2 g, $[\alpha]_D^{20}$: +36°. Die Elementaranalyse dieses Produktes sprach für die Zusammensetzung $C_9H_{17}O_7N$.

Läßt man dieses Fällungsprodukt nach Auflösen in 50 ccm Methanol stehen, so beginnt nach einiger Zeit Glucose-D-Alanin auszukristallisieren. Wenn sich keine Kristalle bilden, kann man in einer Probe durch Umfällen aus Methanol mit Äther das Glucose-D-Alanin so weit anreichern, daß es schließlich beim Verreiben mit Methanol kristallisiert und zum Animpfen der Hauptmenge dienen kann. Zuweilen kann man schon aus der methanol. Lösung des Rohsirups ohne Umfällung das Glucose-D-Alanin kristallin erhalten. Aus 2.2 g Fällungsprodukt kristallisierten 830 mg Glucose-D-Alanin. Dieses wurde durch Lösen in möglichst wenig heißem Wasser und Zugabe der doppelten Menge heißen Methanols umkristallisiert und ergab 580 mg reines *Glucose-D-Alanin* vom Schmp. 226–230°; bei etwa 200° beginnt es sich zu verfärben.

$C_9H_{17}O_7N$ (251.2) Ber. C 43.02 H 6.82 N 5.58 Gef. C 43.52 H 6.80 N 5.50
 $[\alpha]_D^{20}$: +83° (4 Min.) \longrightarrow +70° (Endwert) ($c = 2$, in Wasser)

Glucose-D-Alanin-phenylhydrazon: Dargestellt wie bei Glucose-Glycin-phenylhydrazon beschrieben. Schmp. 218–220°. R_F 0.5.

$C_{15}H_{23}O_6N_3$ (341.36) Ber. N 12.32 Gef. N 12.13

Die Kristallisation des Glucose-D-Alanins wird durch mehrtägiges Aufbewahren im Eisschrank vervollständigt. Nach Abtrennung desselben wird eingeengt, in 20 ccm Methanol aufgenommen und so lange mit Isopropylalkohol versetzt, bis gerade noch keine bleibende Trübung auftritt. Aus dieser Lösung kristallisiert bei längerem Stehenlassen und gelegentlichem Reiben an der Glaswand langsam Glucose-L-Alanin aus, vollständig erst nach mehreren Wochen. Etwas schneller kommt man zum Ziel, wenn man die mit Isopropylalkohol versetzte Lösung i. Vak. bei Zimmertemperatur langsam auf ein geringes Volumen einengt. Die erhaltene Fällung wird wieder in etwas Methanol gelöst und beginnt nach Zugabe von Isopropylalkohol alsbald zu kristallisieren. Rohausbeute 320 mg. Schmp. 175–177° (Zers.). Das Rohprodukt kristallisierte ohne Lösungsmittel. Man kann es genau so wie das Glucose-D-Alanin aus Wasser/Methanol umkristallisieren und erhält dann eine verfilzte Kristallmasse mit $\frac{1}{2}$ Mol. Kristallwasser. Ausb. 220 mg, Schmp. 160° (Zers.).

$C_9H_{17}O_7N \cdot \frac{1}{2} H_2O$ (260.2) Ber. C 41.54 H 6.97 N 5.38 Gef. C 41.08 H 6.84 N 5.36
 $[\alpha]_D^{20}$: +84° (4 Min.) \longrightarrow +74° (Endwert) ($c = 2$, in Wasser)

¹⁷⁾ Arch. Biochem. Biophysics **52**, 373 [1954].

D-Glucose-D-Alanin wurde auf die gleiche Weise aus *D*-(–)-Alanin und *D*-Fructose dargestellt. Nach zweimaliger Säulentrennung kristallisierte *Glucose-D-Alanin* beim Auflösen des hellgelben, sirupösen Rohproduktes in Methanol aus. 800 mg *D*-(–)-Alanin lieferten 290 mg krist. Rohprodukt, die beim Umkristallisieren 230 mg reines *Glucose-D-Alanin* gaben. Schmp. 226–228° (Zers.).

D-Glucose-L-Alanin entsteht entsprechend aus *L*-(+)-Alanin und *D*-Fructose. Das aus 800 mg *L*-(+)-Alanin erhaltene Rohprodukt ließ sich zunächst aus Methanol nicht kristallin erhalten. Es wurde mit Isopropylalkohol gefällt und die Fällung durch langsames Einengen i. Vak. vervollständigt. Ausb. 320 mg Rohprodukt. Fügte man zu der methanolischen Lösung des Rohproduktes vorsichtig so viel Isopropylalkohol, daß gerade noch keine bleibende Trübung entstand, so bildeten sich im Laufe mehrerer Wochen kleine, kugelige Kristalle, die sich langsam vermehrten. Die Ausbeute an wasserfrei kristallisierendem *Glucose-L-Alanin* betrug 124 mg, Schmp. 176–178°, welches nach dem Umkristallisieren aus Wasser/Methanol mit ½ Mol. Kristallwasser kristallisierte. Schmp. 160° (Zers.).

2-N-β-Alanino-2-desoxy-D-glucose (*D*-Glucose-β-Alanin): Die durch kurzes Erwärmen von 2 g β-Alanin und 20 g *D*-Fructose in 150 ccm Methanol hergestellte Lösung wurde bei 30° stehengelassen; im Laufe einer Woche färbte sie sich gelblich braun. Papierchromatographisch war dann ein intensiver länglicher Fleck zu erkennen, der langsamer als Glucosamin wanderte, jedoch nur mit Silbernitrat und nicht mit Ninhydrin angefärbt wurde. Der β-Alanin-Fleck war nur noch schwach sichtbar. Die Aminosäure hatte sich größtenteils umgesetzt. Das Reaktionsprodukt wurde nach dem Abdampfen des Methanols wie üblich zweimal über eine Ionenaustauschersäule (Lewatit S 100, H⁺-Form, 33 × 600 mm) getrennt. Eluiert wurde mit 0.3 *n* TCE. Aus den Fraktionen, die papierchromatographisch nachweisbare Mengen von *Glucose-β-Alanin* enthielten, wurde das Rohprodukt als schwach gelber Sirup erhalten, der in Methanol löslich war und mit Isopropylalkohol zum Teil gefällt werden konnte. Nachdem die Fällung durch Einengen vervollständigt worden war, wurden 1.7 g erhalten. Aus der Mutterlauge fiel mit Isopropylalkohol nichts mehr, mit Äther konnten hieraus nochmals 940 mg ausgefällt werden. Beide Fällungen verhielten sich papierchromatographisch völlig gleich, die zweite war aber in Äthanol viel leichter löslich als die erste, wurde aber nach mehrmaligem Umfällen immer unlöslicher, auch in Methanol. Aus beiden Fraktionen (zus. 2.64 g) wurden durch Umfällen 1.1 g reines Produkt erhalten, dessen Analyse der Zusammensetzung C₉H₁₇O₇N entsprach, ([α]_D²⁰: +28°) und 1 g eines nicht ganz reinen Produkts ([α]_D²⁰: +22°). Beide waren ein Gemisch aus *Glucose-β-Alanin* und *Mannose-β-Alanin*.

Aus der Hauptfraktion (1.1 g) kristallisiert nach längerem Stehenlassen in methanol. Lösung reines, aus Wasser/Methanol umkristallisierbares *Glucose-β-Alanin* aus (150 mg); Schmp. 153° (Zers.).

C₉H₁₇O₇N · ½ H₂O (260.2) Ber. C 41.54 H 6.97 N 5.38 Gef. C 41.28 H 6.94 N 4.98

[α]_D²⁰: +74° (4 Min.) → +62° (Endwert) (*c* = 2, in Wasser)

D-(–)-Alanin aus *Glucose-D-Alanin*: 100 mg *Glucose-D-Alanin*, welches aus *D*L-Alanin und *D*-Fructose erhalten worden war, wurden zu 20 ccm heißer 0.1 *n* NaOH gegeben und 10 Min. auf 100° erwärmt. Das gelblich braune Reaktionsprodukt wurde auf eine Ionenaustauschersäule (Lewatit S 100, H⁺-Form, 15 × 300 mm) gegeben und nach Auswaschen mit Wasser mit 0.5 *n* TCE eluiert. Sämtliche Fraktionen, die papierchromatographisch nachweisbare Mengen Alanin enthielten, wurden ausgeäthert und eingengt. Der teils kristalline, bräunliche Rückstand war in Wasser, Methanol und Äthanol löslich. Er wurde in wenig Wasser aufgenommen, mit Tierkohle entfärbt, über ca. 10 ccm Ionenaustauscher Lewatit MN, OH[–]-

Form, laufengelassen und nach dem Einengen des Durchlaufs aus Wasser/Äthanol umkristallisiert. Ausb. 10.4 mg D-(—)-Alanin, $[\alpha]_D^{20}$: $-14.5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 0.5$, in 6 *N* HCl).

L-(+)-Alanin aus Glucose-*L*-Alanin: 250 mg Glucose-*L*-Alanin- $\frac{1}{2}$ H₂O, welches aus DL-Alanin und D-Fructose erhalten worden war, wurden in 50 ccm Wasser gelöst und mit 25 ccm stark basischem Ionenaustauscher Lewatit MN, OH⁻-Form, 1 Stde. unter Rühren auf 100° erwärmt. Darauf wurde vom Austauscher abdekantiert und zweimal mit etwas Wasser nachgewaschen. Der Austauscher wurde nochmals mit 50 ccm dest. Wasser 20 Min. auf 100° erwärmt, in eine Chromatographiersäule gegeben und mit Wasser ausgewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden i. Vak. zur Trockne eingengt. Der Rückstand war in Wasser nicht mehr vollständig löslich. Es wurde mit wenig Wasser aufgenommen, filtriert und nach dem Einengen dasselbe nochmals wiederholt. Der Eindampfrückstand betrug 114 mg. Beim Verreiben mit Methanol blieb das Alanin ungelöst zurück, während die Begleitstoffe sich im Methanol spielend lösten. Es wurde abgesaugt, mit Methanol gewaschen und getrocknet. Ausb. 26 mg *L*-(+)-Alanin. Aus der Mutterlauge konnten weitere 8 mg Alanin erhalten werden. Die so erhaltenen 34 mg *L*-(+)-Alanin waren schon sehr rein und zeigten nach einmaligem Umkristallisieren aus Wasser/Äthanol die Drehung $[\alpha]_D^{20}$: $+14.2^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 1$, in 6 *N* HCl). Die methanol. Mutterlauge des *L*-(+)-Alanins enthielt neben etwas Alanin nur eine ninhydrinnegative Substanz, R_F 0.36, die von Silbernitrat sehr schwach angefärbt wurde, aber sofort auf das Reagens von LEMIEUX¹⁴⁾ ansprach.

Eluierte man den Austauscher mit 0.2 *N* TCE, so entwich CO₂. Im Eluat befanden sich zwei Substanzen, R_F 0.42 und 0.48.

2-*N*-*L*-Leucino-2-desoxy-*D*-glucose (D-Glucose-*L*-Leucin): 10 g *L*-Leucin und 100 g D-Fructose wurden mit 1.5 g Oxalsäure in 600 ccm Methanol 2½ Stdn. unter Rückfluß gekocht. Die Aminosäure war nach etwa 1½ Stdn. gelöst. Das Reaktionsprodukt wurde, wie beim Glucose-Glycin beschrieben, auf eine saure Ionenaustauschersäule (Lewatit S 100, H⁺-Form, 33 × 550 mm) gebracht und mit 0.5 *N* TCE eluiert. Von 250 Fraktionen (10 ccm) wurden die ersten 40 verworfen. Die Hauptmenge (10.9 g) war in den Fraktionen 40–140 enthalten. Die Fraktionen 140 bis 250 lieferten weitere 3.3 g Rohprodukt. Keine dieser Fraktionen war papierchromatographisch einheitlich. Außer Glucose-*L*-Leucin (R_F -Wert 0.40) enthielten sie in erheblicher Menge Verbindungen von R_F -Werten 0.45–0.60, daneben in geringerer Menge Substanzen mit R_F -Werten unter 0.40. Die Fraktionen 40–140 enthielten die Hauptmenge des Glucose-*L*-Leucins. Das Rohprodukt dieser Fraktionen wurde in zwei Ansätzen von je 5.5 g über eine Cellulosesäule (Whatman-Standard, 550 × 65 mm) aufgetrennt. Als Eluierungsmittel diente wassergesättigtes Butanol. Die ersten 500 ccm Eluat wurden verworfen. Von 250 Fraktionen (10 ccm) enthielten die Fraktionen 110–150 papierchromatographisch reines Glucose-*L*-Leucin, die übrigen Fraktionen Nebenprodukte, zum Teil neben Glucose-*L*-Leucin. Die vereinigten, nur Glucose-*L*-Leucin enthaltenden Fraktionen der beiden Cellulosesäuletrennungen lieferten nach dem Einengen 1.5 g schon sehr reiner Verbindung, Schmp. 186–187° (Zers.). Kristallisierte man das Rohprodukt aus Wasser/Methanol (0.3 g in 1 ccm heißem Wasser + 5 ccm Methanol), so schied sich Glucose-*L*-Leucin in langen filzigen Nadeln kristallwasserhaltig aus. Schmp. 165–167° (Zers.). Aus Wasser/Äthanol (0.3 g in 1 ccm heißem Wasser + 5 ccm heißem Äthanol) bildeten sich kristallwasserfreie kurze Nadeln, Schmp. 187–189° (Zers.).

C₁₂H₂₃O₇ (293.3) Ber. C 49.13 H 7.90 N 4.78 Gef. C 48.76 H 7.75 N 4.70

$[\alpha]_D^{20}$: $+74^\circ$ (4 Min.) $\longrightarrow +63^\circ$ (Endwert) ($c = 2$, in Wasser)

Glucose-*L*-Leucin-phenylhydrazon: Dargestellt wie bei Glucose-Glycin-phenylhydrazon beschrieben. Schmp. 187–190° (Zers.), R_F 0.7.

C₁₈H₂₇O₆N₃ (378.4) Ber. N 11.10 Gef. N 10.71

2-N-Glycino-2-desoxy-D-gluconsäure: (N-Carboxymethyl-D-glucosaminsäure): 300 mg *Glucose-Glycin-H₂O* wurden in 6 ccm Wasser gelöst und mit 1 g Quecksilberoxyd unter Schütteln 30 Min. auf 100° erwärmt. Dann wurde ungeachtet einer durch ausfallendes Hg-Salz der *N*-Carboxymethyl-D-glucosaminsäure verursachten Trübung in der Wärme durch Einleiten von H₂S das Quecksilber vollständig gefällt, von HgS abfiltriert und die Lösung eingeeengt. Der verbliebene Sirup wurde in 2 ccm heißem Wasser gelöst, eine Trübung abzentrifugiert und nach Zusatz von 5 ccm heißem Alkohol über Nacht stehengelassen. Ausb. 190 mg, Schmp. 155° (Zers.). Nach dem Umkristallisieren aus 1.5 ccm heißem Wasser + 3 ccm heißem Alkohol wurden 138 mg vom Schmp. 163–165° (Zers.) erhalten. *R_F*-Wert 0.02. Anfärbbar mit Bromphenolblau (gelber Fleck), nicht anfärbbar mit Ninhydrin und ammoniakalischer Silbernitratlösung.

$C_8H_{15}O_8N$ (253.2) Ber. C 37.94 N 5.97 N 5.53 Gef. C 37.63 H 6.51 N 5.51

$[\alpha]_D^{20}$: + 24° (*c* = 2, in Wasser), $[\alpha]_D^{20}$: + 21° (*c* = 2, in 0.2 *n* NaOH), $[\alpha]_D^{20}$: + 26° (*c* = 2, in 0.2 *n* HCl)

Die Säure ist beim Behandeln mit 0.1 *n* NaOH bei 100° beständig. Auch beim Erwärmen mit verd. Salzsäure bildet sie nur langsam und unvollständig ein Lacton.

Spaltung von Glucose-Aminosäuren in Aminosäure und Fructose: 10 mg einer Glucose-Aminosäure werden mit 2 *n* Bernsteinsäure oder Essigsäure 4 Stdn. in Einschlußröhrchen bei 115° erhitzt. Als Reaktionsprodukt trat neben wenig Ausgangsmaterial und der freigesetzten Aminosäure ein sehr starker reduzierender Fleck auf, der in allen Eigenschaften (Anfärbbarkeit mit Anthron, Brenzcatechin, Naphthoresorcin) mit Fructose identisch war. Hydroxymethylfurfurol entstand nur in geringer Menge.

Die *papierchromatographischen Untersuchungen* wurden mit dem Papier Schleicher & Schüll 602 h:p und dem Gemisch Butanol, Eisessig, Wasser (7:0.7:2.3) durchgeführt. Die angeführten *R_F*-Werte wurden auf diese Weise bestimmt.

MUVAFFAK SEYHAN

NOTIZ ÜBER DIE OXYDATION EINIGER DIMETHYL-CHINOLINE MIT SELENDIOXYD

Aus dem Chemischen Institut der Universität Istanbul

(Eingegangen am 10. April 1957)

Die Darstellung des 8- und des 5-Methyl-chinolin-aldehyds-(2) sowie der entsprechenden Carbonsäuren wird beschrieben.

Von den sechs Dimethyl-chinolinen, welche eine Methylgruppe in 2-Stellung tragen, wurden bis jetzt nur 2.3-, 2.4-, 2.6- und 2.7-Dimethyl-chinoline der Oxydation mit Selendioxyd unterworfen, wobei, außer 2.4-Dimethyl-chinolin, alle erwartungsgemäß nur an 2-Stellung angegriffen wurden ¹⁻⁴⁾ (s. Tabelle).

1) M. SEYHAN, Rev. Fac. Sci. Univ. Istanbul [A] 16, 251 [1951].

2) M. SEYHAN, Chem. Ber. 85, 425 [1952].

3) C. A. BUEHLER und S. P. EDWARDS, J. Amer. chem. Soc. 74, 978 [1952].

4) M. SEYHAN und W. C. FERNELIUS, Chem. Ber. 89, 2212 [1956].