

FRITZ MICHEEL und ROBERT BÜNING

N-GLUCOSIDE DES POLYVINYLAMINS UND DEREN AMADORI-UMLAGERUNG

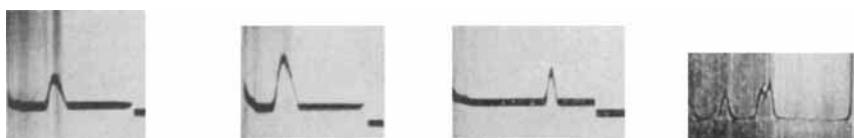
Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Münster (Westf.)

(Eingegangen am 2. Mai 1957)

Polyvinylamin läßt sich mit D-Glucose zu einem Poly-N-glucosid umsetzen¹⁾. Das Glucosid geht eine Amadori-Umlagerung ein, wobei sich Derivate der L-Desoxy-1-amino-D-fructose bilden. Diese können, wenn nur ein Teil der NH₂-Gruppen mit Zuckerresten besetzt ist, eine Wasserabspaltung zwischen dem glykosidischen Hydroxyl des Fructoserestes und freien Aminogruppen erfahren.

Dabei tritt Vernetzung und Ringbildung ein.

In einer kurzen Mitteilung¹⁾ wurde über die Bildung von N-Glykosiden aus Polyvinylamin und freien Zuckern berichtet. Jedoch konnte damals auf Grund des Verhaltens der Verbindungen nur erst die Vermutung geäußert werden, daß die erhaltenen unlöslichen Endprodukte vernetzt seien. Für die Kondensation mit D-Glucose, über die wir zunächst berichten, wurde ein Polyvinylamin (I) verwandt, das aus Phthalimidooäthanacetat durch thermische Essigsäureabspaltung, anschließende Polymerisation und Verseifung gewonnen wurde²⁾. Es erwies sich in der Ultrazentrifuge als praktisch einheitlich³⁾ (s. Abbild. 1a und 1b). Da seine Sedimentationskonstante in Eisessig-Methanol konzentrationsabhängig ist, ist die aus der Synthese erwartete lineare Struktur wahrscheinlich. $s_{20}^{0.42} = 2.0$ (Svedberg), $s_{20}^{0.1} = 2.9$ (Svedberg). I entspricht in seiner Zusammensetzung und der Menge der NH₂-Gruppen der Formel $[-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-]_n$.



Philpot-Svensson-Aufnahmen (bei allen Abbildungen Wanderung von rechts nach links)

Abbild. 1a
PVA (0.42%),
Unterschichtungs-
zelle, Zeit: 25 Min.,
49000 U/Min.,
Philpot-Winkel =
5° (Draht)

Abbild. 1b
Wie 1a,
jedoch 40 Min.,
Philpot-Winkel =
10° (Draht)

Abbild. 2
PVA-D-Glucosid
(0.42%),
Zeit: 90 Min.,
49000 U/Min.,
Philpot-Winkel =
10° (Draht)

Abbild. 3
PVA-D-Glucose
(Kondensations-
produkt) (0.42%),
Zeit: 115 Min.,
49000 U/Min.,
Philpot-Winkel =
20° (Phasenkante)

Die Umsetzung von I mit D-Glucose wird stufenweise verfolgt. Zur Anwendung gelangt freies Polyvinylamin, erhalten aus dem Hydrochlorid mit Natriummethylat

¹⁾ F. MICHEEL und W. HIMMELMANN, Naturwissenschaften 42, 297 [1955].

²⁾ D. D. REYNOLDS und W. O. KENYON, J. Amer. chem. Soc. 69, 911 [1947].

³⁾ F. MICHEEL und H. RUDOLPH, unveröffentlicht.

in absolutem Methanol, und wasserfreie D-Glucose, gegebenenfalls unter Säurezusatz. Man erhält N-D-Glucoside(II); die Zahl der besetzten NH₂-Gruppen ist abhängig vom Überschuß der eingesetzten D-Glucose. Die Aufnahme an Glucosidresten entspricht der Abnahme an freien Aminogruppen (Bestimmung nach van Slyke). Es gelingt jedoch nur etwas über 60% der Aminogruppen durch D-Glucosereste zu besetzen, weil wegen der beschränkten Löslichkeit der D-Glucose in Methanol ihr molekularer Überschuß, berechnet auf die Grundeinheit ($-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-$), nicht größer als etwa 6.6:1 gewählt werden kann. Die erhaltenen N-D-Glucoside sind in Wasser löslich, wobei eine starke Quellung voraufgeht. Ihre Zusammensetzung ergibt sich aus den Tabellen 1 und 2. Das abgespaltene Wasser wird nach Karl Fischer bestimmt.

Tab. 1. N-Glucoside des Polyvinylamins

Mol.-Verhältnis PVA ⁴⁾ : D-Glucose	1:0.37	1:0.73	1:1.49	1:3.31	1:6.65
% N gefunden	13.1	12.3	11.3	10.1	9.7
% Aminogruppen umgesetzt (berechnet)	40	44	50	59	62

Tab. 2. N-Glucoside des Polyvinylamins

Mol.-Verhältnis PVA ⁴⁾ : D-Glucose	1:0.5	1:1	1:2	1:4
% N gefunden	12.7	11.4	10.9	10.5
% N berechnet (aus gefundener Wassermenge)	12.5	11.3	10.5	10.1
% Aminogruppen umgesetzt	43	50	55	59
Menge Wasser (mg) aus 78.6 mg umgesetztem PVA gefunden	14.3	16.5	18.3	19.4

Daß es sich um echte N-Glykoside handelt, geht daraus hervor, daß die D-Glucosereste langsam schon durch Wasser abgespalten werden und durch Dialyse entfernt werden können. Jedoch ist die Abspaltung keine vollständige, weil offenbar ein Teil der Glykosidreste während der Dialysendauer Amadori-Umlagerung und weitere Kondensation erfährt:

Tab. 3

Dialysendauer (Tage)	0	5	18	29
% Glucose im Derivat	65.7	18.8	10.5	8.6

Die Abspaltung der D-Glucosereste läßt sich auch polarimetrisch verfolgen; sie wird durch Säurekatalyse stark beschleunigt (Tab. 4).

Tab. 4. Drehwertsänderung eines PVA-D-Glucosids (66% Glucose) (c = 1)

	8 Min.	24 Stdn.	48 Stdn.
[α] _D ²⁰ in Wasser	—	+ 1.8°	+ 6.5°
[α] _D ²⁰ in 3 n Essigsäure	+ 5.6°	+ 27.8°	—

⁴⁾ PVA = Polyvinylamin. Die Werte sind auf die Grundeinheit $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-$ bezogen.

Die Zahl der aufgenommenen D-Glucosereste entspricht der Abnahme an freien NH₂-Gruppen, wie Tab. 5 zeigt.

Tab. 5

	gefunden	berechnet aus dem Gesamtstickstoffgehalt 11.3%	
D-Glucose	65.7%	72.7	
NH ₂ -Stickstoff (van Slyke)	6.1%	5.7	(aus Glucosegehalt*)
C	49.0	48.4	
H	8.7	8.1	

* NH₂-Stickstoff (van Slyke) berechnet aus Gesamtstickstoff minus N-Glucosidstickstoff.

Diese primären, in der Kälte im Alkalischen oder Neutralen erhaltenen, in Methanol löslichen N-Glykoside erweisen sich in der Ultrazentrifuge wiederum als einheitlich³⁾ (Abbildung 2). Ein Präparat mit einem Glucosegehalt von 54% zeigte eine Sedimentationskonstante von $s_{20}^{0,42} = 3.4$ (Svedberg). Diese ist erwartungsgemäß größer als die des angewandten PVA: $s_{20}^{0,42} = 2.0$ (Svedberg).

Die primären, löslichen N-Glicoside (II) lassen sich in Eisessig in die Amadori-Produkte (III) umlagern. Diese Umlagerung geht bei Zimmertemperatur sehr langsam vor sich und kann quantitativ auf Grund des Reduktionsvermögens der Amadori-Produkte gegenüber Fe³⁺ verfolgt werden. Die Menge des gebildeten Fe²⁺ wird kolorimetrisch mit o-Phenanthrolin bestimmt.

Jedoch sind die Amadori-Produkte nur Zwischenprodukte, weil sie schon bei Zimmertemperatur Anlaß zu weiteren Reaktionen (Vernetzung und Ringbildung) geben (siehe unten). Das Reduktionsvermögen der Amadori-Produkte ergibt sich aus Tab. 6. Da die Reduktion des Fe³⁺ bei den hochmolekularen Produkten nur langsam vor sich geht und deshalb wahrscheinlich auch während dieses Prozesses weitere Kondensationsreaktionen stattfinden, so soll diese Tabelle nur zeigen, daß Amadori-Produkte Zwischenprodukte zwischen den löslichen einfachen N-Glykosiden und den unlöslichen kondensierten Endstufen sind.

Tab. 6. Bildung von Fe²⁺ (mg) pro 0.8 mg eingesetztem N-D-Glucosid (in Eisessig)

Fe ²⁺ (mg) Gef.	0.047	0.050	0.057	0.065	0.066	0.078	0.086
Reaktionszeit (Tage)	7	9	13	25	32	48	95

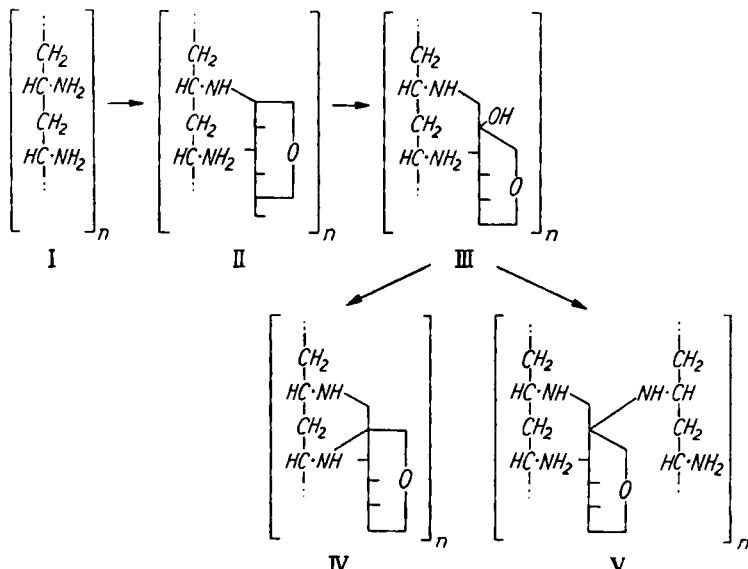
Die Bildung von Vernetzungsprodukten ist nachweisbar, obwohl die obigen Eisessig-Lösungen klar bleiben. Nach dem Ausfällen mit Äther gewinnt man nämlich Produkte, die mit wachsender Reaktionsdauer mehr und mehr in Wasser unlöslich werden. Präparativ läßt sich der Übergang in Vernetzungsprodukte (V) in der abnehmenden Löslichkeit und der Abnahme an freien Aminogruppen zeigen. Jedoch kann neben intermolekularer Reaktion III → V auch intramolekulare (III → IV) eintreten (Ringbildung). Über das Vorliegen beider Reaktionsprodukte geben die Untersuchungen in der Ultrazentrifuge Auskunft (siehe unten). Höhere H⁺-Konzentrationen und höhere Temperaturen beschleunigen die Vernetzung. Die Ergebnisse gehen aus Tab. 7 hervor. Es handelt sich um eine PVA-Glucose, bei der 50% der ursprünglichen Aminogruppen einen D-Glucoserest tragen.

Tab. 7. Vernetzung von PVA-*D*-Glucose in Abhängigkeit von *pH*-Wert und Temperatur

PVA- <i>D</i> -Glucose (50%)	Dauer	Löslichkeit	Amino-N (van Slyke)	Amadori- Reaktion
1. Methanol, <i>pH</i> 7	3 Tage Zimmertemp.	leicht löslich in Wasser	4.5 %	negativ
2. Methanol- Eisessig, <i>pH</i> = 5	3 Tage Zimmertemp.	quillt in Wasser, löslich in heißer 3 <i>n</i> Eisessigsäure	2.1 %	positiv
3. Methanol- Eisessig, <i>pH</i> = 5	45 Min. Kochen	unlöslich, quillt wenig	0.8 %	nicht prüfbar (unlöslich)

Führt man 1. in 3. über, so stimmt die aus der Abnahme der freien NH₂-Gruppen berechnete Wassermenge mit der nach Karl Fischer quantitativ ermittelten überein.

Die Untersuchung in der Ultrazentrifuge gibt Auskunft über das Vorliegen intermolekularer (Vernetzung) und intramolekularer Reaktionen (Ringbildung). Jedoch können naturgemäß nur Präparate mit hinreichender Löslichkeit, also mit mäßiger Vernetzung zur Untersuchung gelangen.



Ausgangsstoff ist ein *N*-Glucosid (A) mit 54% Glucosegehalt und einer Sedimentationskonstante von $s_{20}^{0,42} = 3.4$ (Svedberg) (siehe oben). Es wurde mit Methanol-Essigsäure erhitzt und ein Produkt B gewonnen, das bei der Untersuchung (Abbild. 3) zwei Hauptkomponenten anzeigt:

$$B_1 s_{20}^{0,28} = 5.0 \quad B_2 s_{20}^{0,14} = 6.7$$

Die Konzentrationen von B₁ und B₂ wurden unter der Voraussetzung gleicher Brechungsindexinkremente aus den Flächen der Gradienten berechnet. Das Nebenmaximum von B₁ ist auf die gegenseitige Beeinflussung der Komponenten zurückzuführen.

B_1 entspricht hinsichtlich seines Molekulargewichtes etwa dem *N*-Glucosid A und dürfte durch intramolekulare Reaktion entstanden sein, während B_2 wegen der wesentlich höheren Sedimentationskonstante aus 2 Molekülen A durch Vernetzung entstanden sein dürfte. Hier sind also wahrscheinlich nur 2 Moleküle zusammengetreten und dies Reaktionsprodukt ist noch löslich. Die völlig unlöslichen Kondensationsprodukte sind wahrscheinlich durch weitere Vernetzung gebildet worden. Sie erweisen sich als außerordentlich resistent, auch gegen konz. Alkali oder konz. Säuren, selbst in der Hitze.

Dem WIRTSCHAFTSMINISTERIUM DES LANDES NORDRHEIN-WESTFALEN danken wir für die Unterstützung der Arbeit.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Das *Polyvinylamin-hydrochlorid* wurde im wesentlichen nach den Angaben der Literatur²⁾ hergestellt. Es war in der Ultrazentrifuge einheitlich und analytisch rein.

[C ₂ H ₅ N·HCl] _n	Ber. C 30.2 H 7.6 N _{ges.} 17.6 N _{NH₂} 17.6 Cl 44.6
	Gef. C 30.1 H 8.1 N _{ges.} 18.0 N _{NH₂} 17.0 Cl 43.6

Das freie *Polyvinylamin* (*I*) wird in folgender Weise gewonnen: 5 g PVA-Hydrochlorid werden mit 50 ccm Natriummethylatlösung (entsprechend 144.3 mg Natrium) über Nacht geschüttelt. Nach dem Absitzenlassen des nicht umgesetzten PVA-Hydrochlorids und des Natriumchlorids wird die viscose Lösung vorsichtig abdekantiert. Die Lösung wird mit Methanol auf 500 ccm aufgefüllt und ihr Gehalt an PVA titrimetrisch ermittelt. Sedimentationskonstanten siehe theoretischer Teil und Abbild. 1.

Polyvinylamin-N-D-glucoside (*II*): Der Grad der *N*-Glykosidbildung ist abhängig vom Überschuß der angewandten *D*-Glucose.

Zu einer Lösung von 330 mg gut getrockneter *D*-Glucose in 30 ccm absol. Methanol wird eine Lösung von 78.6 mg *I* in 25 ccm Methanol gegeben. Nach 3 Tagen wird das *N*-Glykosid *II* abzentrifugiert, mehrmals mit absol. Methanol digeriert und abgesaugt. Ausb. 218 mg (96% d. Th.). Ein Präparat mit einem Glucosegehalt von 54% zeigte eine Sedimentationskonstante von $s_{20}^{0,42} = 3.4$ Svedberg (in Methanol-Eisessig) und ist praktisch homodispers (Abbild. 2).

Amadori-Umlagerung

Quantitative Bestimmung des Verlaufes der Amadori-Umlagerung: 800 mg des oben beschriebenen *N*-Glykosids werden in 50 ccm Eisessig gelöst. Zur Bestimmung des Reduktionsvermögens gegen Eisen(III) werden jeweils 5 ccm der Lösung entnommen und auf 1000 ccm aufgefüllt (Lösung a). Ferner wird eine Lösung von 5 ccm Eisessig in 1000 ccm Wasser hergestellt (Lösung b).

10 ccm Lösung a werden mit 5 ccm Eisen(III)-Lösung (enthaltend 0.2 mg Fe³⁺ und 1 ccm *o*-Phenanthrolin-hydrochlorid-Lösung (0.5% in Wasser)) versetzt und auf 25 ccm aufgefüllt. Die Reduktion durch das Amadori-Produkt beansprucht bis zu 7 Tagen. (Einfache Amadori-Produkte benötigen etwa 24 Std.) Die Drehwertsänderungen des Präparates gehen aus Tab. 4 hervor. Die Abspaltung von Wasser und dessen Bestimmung mit Karl-Fischer-Lösung zeigt Tab. 2.

Gef. C 49.0 H 8.7 N 11.3 NH₂ 6.1 Glucose 65.7 *

*) Bestimmt nach der Orcinmethode; der gefundene Wert ist zu niedrig, weil sich bei der Hydrolyse in der Wärme ein Teil des *N*-Glucosids in ein Amadori-Produkt umlagert (Nachweis mit *o*-Dinitrobenzol). Amadori-Produkte lassen sich nicht mit Orcin bestimmen.

Aus dem Gesamtstickstoffgehalt von 11.3% würde sich für die übrigen Elemente und Gruppen ergeben



Tab. 1 zeigt die Abhängigkeit der Glykosidbildung vom Überschuß der angewandten D-Glucose.

Die so gewonnenen Präparate geben keine Reduktionsreaktionen. Sie sind gut löslich in Wasser. Dabei tritt langsam Hydrolyse ein (siehe Tab. 3 und 4). Man führt die Hydrolyse am besten im Dialysierschlauch aus, wobei die abgespaltene D-Glucose durch Dialyse entfernt wird. Der Gehalt an Fe^{2+} wird durch Bestimmung der Extinktion bei $495 \text{ m}\mu$ (Unicam-Apparatur) ermittelt. In Abzug gebracht wird der Wert, der sich aus der analogen Behandlung der Lösung b (0.2 mg Fe^{3+}) ergibt. Die Ergebnisse finden sich in Tab. 6.

Bildung der Kondensations-Produkte (IV und V): Werden die N-Glykoside (II) bei Gegenwart von Essigsäure aufbewahrt oder erhitzt, so tritt mit steigender Acidität und steigender Temperatur in wachsendem Maße Kondensation und Wasserabspaltung ein. Dementsprechend ändert sich die Zusammensetzung; die Löslichkeit nimmt bis zur völligen Unlöslichkeit ab. Tab. 8 zeigt die analytischen Daten.

Tab. 8.

Ausgangsmengen	Präparat	Eisessig ccm	Behandlung	C	H	N	NH ₂
84.5 mg PVA + 706 mg D-Glucose + 45 ccm Methanol	1.	0.1	3 Tage Zimmer temp.	46.6	7.8	9.1	4.5
	2.	0.7	3 Tage Zimmer temp.	47.4	7.7	9.7	2.1
	3.	0.7	45 Min. Kochen	49.3	7.7	9.7	0.8

Während Präparat 1 noch stark in Wasser aufquillt, ist 3 darin ganz unlöslich. Die Glucosereste lassen sich bei den unlöslichen Präparaten weder mit verdünnter noch mit konz. Mineralsäure abspalten. Auch gegen Erhitzen mit Alkali sind die Stoffe stabil.