

KURT HEYNS und MANFRED ROLLE

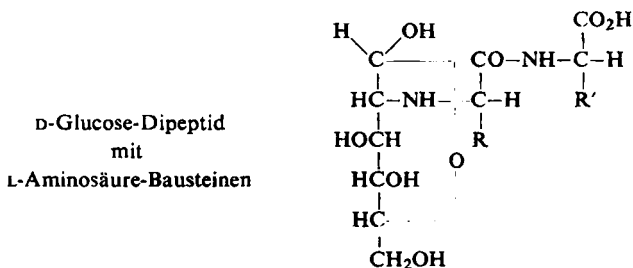
***N*-substituierte 2-Amino-2-desoxy-D-glucosen durch Umsetzung von D-Fructose mit Peptiden<sup>1)</sup>**

Aus dem Chemischen Staatsinstitut der Universität Hamburg,  
Abteilung für Organische Chemie  
(Eingegangen am 31. März 1959)

Durch Umsetzung von D-Fructose mit optisch einheitlichen Di- und Tripeptiden wie Glycyl-glycin, Glycyl-L-leucin, Glycyl-L-tyrosin, L-Leucyl-glycin, L-Leucyl-L-tyrosin, Glycyl-glycyl-L-leucin und Glutathion lassen sich als Hauptreaktionsprodukte „D-Glucose-Peptide“ gewinnen, die durch Umlagerung der zunächst gebildeten *N*-D-Fructosylpeptide entstehen.

Nachdem wir in den letzten Jahren zeigen konnten, daß die Umsetzung von Ketosen mit Ammoniak, aliphatischen Aminen sowie mit neutralen und sauren Aminosäuren zu Ketosylaminen führt, die sich spontan oder mit geeigneten Katalysatoren zu 2-Amino-2-desoxy-aldosen umlagern<sup>2)</sup>, wurde dieser Reaktionstyp<sup>3)</sup> nunmehr auf Polypeptide angewendet.

Di- und Tripeptide reagieren dabei grundsätzlich in gleicher Weise wie Aminosäuren mit D-Fructose<sup>2)</sup>. Es bildet sich zunächst ein *N*-substituiertes D-Fructosylamin (*N*-D-Fructosid), welches sich spontan zum *N*-substituierten D-Glucosamin umlagert:



Daneben entsteht in geringer Menge das entsprechende epimere D-Mannosamin-Derivat sowie ein ebenfalls bei der Umsetzung von D-Fructose mit Aminosäuren nachgewiesenes *N*-substituiertes Derivat des D-Isoglucosamins (sogen. „Fructose-Aminosäure“). Die Entstehung solcher Verbindungen auch bei der Umsetzung mit Peptiden konnte mit dem von BORSOOK<sup>4)</sup> und Mitarbb. angegebenen Kaliumhexacyanoferrat(III)-Test (in der Kälte) nachgewiesen werden, der allerdings bei Verbindungen mit einem Tyrosinrest und bei Mercaptoverbindungen stets positiv ausfällt.

<sup>1)</sup> Vorhergehende Mitteil.: K. HEYNS und H. BREUER, Chem. Ber. 91, 2750 [1958].

<sup>2)</sup> K. HEYNS und K. H. MEINECKE, Chem. Ber. 86, 1453 [1953]; K. HEYNS, R. EICHSTEDT und K. H. MEINECKE, Chem. Ber. 88, 1551 [1955]; K. HEYNS, H. PAULSEN, R. EICHSTEDT und M. ROLLE, Chem. Ber. 90, 2039 [1957]; K. HEYNS, H. BREUER und H. PAULSEN, Chem. Ber. 90, 1374 [1957].

<sup>3)</sup> H. H. BAER, Fortschr. chem. Forsch. 3, 862 [1954–1958].

<sup>4)</sup> A. ABRAMS, H. BORSOOK und P. H. LOWY, J. biol. Chemistry 215, 111 [1955].

Die unterschiedlichen Mengenverhältnisse der bei der Ketosylamin-Umlagerung entstehenden am C-Atom 2 epimeren 2-Amino-2-desoxy-aldosen werden von den folgenden Faktoren bestimmt. Einmal sind dafür polare Nachbargruppeneffekte<sup>5)</sup> maßgebend, deren Wirkungsweise sich zur Zeit noch nicht genau übersehen läßt. Ein Hinweis hierauf ergibt sich aus der Lösungsmittelabhängigkeit der Reaktion, die in einigen Fällen beobachtet werden konnte<sup>1)</sup>. Weiterhin sind die auf rein sterischen Verhältnissen basierenden relativen Stabilitäten der epimeren Aminosucker mitbestimmend. Aus den von R. E. REEVES<sup>6)</sup> entwickelten Vorstellungen über den räumlichen Bau und die Stabilität von Pyranose-Zuckern ergibt sich, daß in Lösung vorliegende Zucker mit *D*-*gluco*-Konfiguration am C-Atom 2 eine höhere Stabilität im C1-Konstellationstyp als im 1C-Typ besitzen. Für die entsprechenden 2-Amino-aldosen und deren *N*-substituierte Derivate gilt dies in gleicher Weise. Die Aminosucker Glucosamin, Galaktosamin und Allosamin werden aus den entsprechenden Ketosen mit Ammoniak in größerer Menge gebildet als die am C-Atom 2 epimeren Aminosucker Mannosamin, Talosamin und Altrosamin<sup>2)</sup>. Bei Annahme des C1-Typs sind die ersteren Amino-Zucker wegen der an C-2 vorhandenen äquatorialen Gruppe stabiler; sie werden daher unter Orientierung der Aminogruppe in äquatoriale Lage bevorzugt gebildet. Das gleichstarke Auftreten von Gulosamin und Idosamin aus Sorbosylamin entspricht den Folgerungen aus den Konstellationsbetrachtungen, da Gulosamin bevorzugt im C1-Typ, Idosamin aber im 1C-Typ vorliegt, in beiden Fällen also die Anordnung des neuen Substituenten am C-Atom 2 in stabilerer äquatorialer Lage erfolgt.

Für die Umsetzung von *D*-Fructose mit Peptiden kam Methanol wegen der geringen Löslichkeit der Peptide als Lösungsmittel nicht in Frage; hier bewährten sich Eisessig und Dimethylsulfoxyd (DSO). Diese Lösungsmittel haben außerdem den Vorteil, daß darin die als Nebenprodukte entstehenden *D*-Mannosamin- und *D*-Isoglucosamin-Derivate in geringerer Menge auftreten als bei Anwendung von Methanol. Dies erleichterte die Gewinnung der *D*-Glucose-Peptide, die sich in ihrem chromatographischen Verhalten weniger von den isomeren Nebenprodukten unterschieden als die entsprechenden *D*-Glucose-Aminosäuren.

Die Bildung von Spaltprodukten (Aminosäuren, Hexose-Aminosäuren) war vor allem bei den Glycyl-Peptiden festzustellen. Die Umsetzung erfolgte unter mehrstündigem Erhitzen der Lösung auf 50–60°. Der Zusatz eines Umlagerungs-Katalysators war nicht erforderlich. Die wasserfreie *D*-Fructose wurde immer im zehnfachen Überschuß zum Peptid eingesetzt.

Folgende Di- und Tripeptide wurden mit *D*-Fructose umgesetzt: Glycyl-glycin, Glycyl-*L*-leucin, Glycyl-*L*-tyrosin, *L*-Leucyl-glycin, *L*-Leucyl-*L*-tyrosin, Glycyl-glycyl-*L*-leucin und Glutathion. Es zeigte sich, daß die amino-endständigen *L*-Leucyl-Peptide weniger gut reagieren als die entsprechenden Glycyl-Peptide. Das Glycyl-glycyl-*L*-leucin wurde nach der „Anhydrid-Methode“ erstmalig in der optisch reinen Form in kristallisiertem Zustand gewonnen.

<sup>5)</sup> W. Lwowski, *Angew. Chem.* **70**, 483 [1958].

<sup>6)</sup> *Advances Carbohydrate Chem.* **6**, 107 [1951].

Die Hexose-Peptide wurden an stark saurem Lewatit S 100 ( $H^{\oplus}$ ) adsorbiert; hierbei wurden überschüssige Fructose und eine Reihe nicht näher untersuchter reduzierender Zersetzungsprodukte der D-Fructose, die sich bei der Reaktion in Eisessig gebildet hatten, und in einigen Fällen in Eisessig gebildete Acetylpeptide und Diketopiperazine ausgewaschen. Anschließend wurden Feintrennungen am feinkörnigen sauren Austauscher Dowex 50 ( $H^{\oplus}$ -Form; 200–400 mesh) oder an Cellulosesäulen vorgenommen. Kristallisationsversuche in verschiedensten Lösungsmittelgemischen blieben ohne Erfolg.

Die Fraktionierung an den verschiedenen Säulen wurde papierchromatographisch verfolgt, wobei die Chromatogramme mit ammoniakalischem Silbernitrat, mit Chlor/*o*-Tolidin/Kaliumjodid nach P. W. G. SMITH<sup>7)</sup> und mit Ninhydrin angefärbt wurden. Weiterhin wurde der Kaliumhexacyanoferrat(III)-Test<sup>4)</sup> herangezogen, der in der Kälte auf Fructose-Aminosäuren und -Peptide anspricht. Von den entstehenden Hexose-Peptiden wurden die D-Glucose-Peptide von stark sauren Ionenaustauschern zuerst eluiert. Bei Anwendung von Cellulosesäulen erschienen dagegen erst die D-Mannose-Peptide, dann die D-Glucose-Peptide und schließlich die D-Fructose-Peptide.

In vielen Fällen zeigten sich einige Besonderheiten. Bei Glycyl-glycin fand sich nach Anwendung der Lewatit S 100-Säule verhältnismäßig viel durch Spaltung entstandenes Hexose-Glycin. Das D-Glucose-Glycyl-glycin konnte jedoch nach Anwendung von Cellulose- und Dowex 50 ( $H^{\oplus}$ )-Säulen rein isoliert werden. D-Glucose-Glycyl-L-leucin kristallisierte nach einmaliger Säulenbehandlung sofort in reiner Form. Die Isolierung des D-Glucose-Glycyl-L-tyrosins wurde dadurch erschwert, daß die Elution vom sauren Austauscher selbst bei Anwendung von 0.5 *n* TCE nur sehr langsam erfolgte.

Bei der Umsetzung von Fructose mit L-Leucyl-L-tyrosin entstand fast ausschließlich L-Leucyl-L-tyrosin-anhydrid ( $R_F$  0.83 in Bu/E). D-Glucose-Peptid wurde nur als Nebenprodukt gebildet. Die Anreicherung und Reinigung des D-Glucose-L-Leucyl-L-tyrosins ( $R_F$  0.59) mußte an vier Cellulosesäulen und einer Dowex 50-Säule vorgenommen werden.

Beim Glycyl-glycyl-L-leucin führte nach Anwendung der Lewatit S 100-Säule eine Dowex 50-Säule (Abtrennung von Hexose-Glycin) sowie anschließend eine Cellulosesäule (Abtrennung der isomeren Hexose-Tripeptide) zur Gewinnung von reinem D-Glucose-Glycyl-glycyl-L-leucin.

Die Umsetzung von Glutathion mit Fructose erfolgte in Dimethylsulfoxyd (DSO), da die Löslichkeit in Eisessig zu gering ist. Das in der Mercapto-Form eingesetzte Glutathion (GSH) wurde dabei vom Lösungsmittel infolge seiner leichten Oxydierbarkeit in die Disulfid-Form (GSSG) übergeführt. Wegen der im GSSG-Molekül vorliegenden zwei Aminogruppen können neben D-Glucose-GSSG-D-Glucose auch noch gemischte Reaktionsprodukte mit Mannose- und Fructoseresten entstehen. Die Bildung von Mono-Substitutionsprodukten, wie z. B. D-Glucose-GSSG, konnte nicht festgestellt werden, die Reaktion verläuft nahezu vollständig zum Di-Substitutionsprodukt.

<sup>7)</sup> J. chem. Soc. [London] 1957, 3985.

Nach Abtrennung überschüssiger D-Fructose und überschüssigen Peptids wurde aus der einen Hälfte des Ansatzes mittels Säulentrennung ein papierchromatographisch einheitliches Produkt erhalten, das mit Silbernitrat und Chlor/*o*-Tolidin/Kaliumjodid anfärbbar war, nicht dagegen mit Ninhydrin. Es zeigte die spezif. Drehung  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-28.5^\circ$ . Als 2. Fraktion wurde ein chromatographisch uneinheitliches Produkt mit der Drehung  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-54^\circ$  erhalten. Die stärker negative Drehung ist auf einen Gehalt an D-Mannose- und D-Fructose-Resten zurückzuführen.

Die zweite Hälfte des Ansatzes wurde mit  $H_2S$  reduziert<sup>8)</sup>, wobei sich erwartungsgemäß Hexose-GSH bildete und Schwefel abschied. Nach Anwendung einer Dowex 50-Säule konnte reines D-Glucose-GSH mit  $[\alpha]_D^{25}$ :  $+21^\circ$  isoliert werden. Es ließ sich jodometrisch titrieren. Oxydation mit Sauerstoff in wäßriger Lösung bei  $p_H$  9 lieferte D-Glucose-GSSG-D-Glucose mit praktisch der gleichen spezif. Drehung wie das aus der 1. Hälfte direkt gewonnene Produkt ( $[\alpha]_D^{25}$ :  $-27^\circ$ ), womit erwiesen ist, daß es sich dabei um einheitliche Glucose-GSSG-Glucose handelt.

Reduktion der „direkt“ gewonnenen D-Glucose-GSSG-D-Glucose lieferte nur D-Glucose-GSH. Letzteres war in Chromatogrammen außer mit Silbernitrat und Chlor/*o*-Tolidin/KJ auch mit Jodazid-Sprühreagenz<sup>9)</sup> und mit Nitroprussid-natrium<sup>10)</sup> sofort anfärbbar, nicht dagegen mit Ninhydrin. D-Glucose-GSSG-D-Glucose ließ sich mit Jodazid erst nach längerem Liegenlassen des Chromatogramms erkennen. Nach Einwirkung von KCN-Lösung ließ es sich auch mit Nitroprussid-natrium anfärben<sup>10)</sup>.

Nach A. NEUBERGER<sup>11)</sup> gilt für Derivate des L-Cystins die Regel, daß diese eine stark negative molekulare Drehung aufweisen. Reduktion zum entsprechenden Cystein-Derivat bewirkt eine starke Drehungsänderung in positiver Richtung. Die Drehwertdifferenzen zwischen molekularer Drehung des Cystein-Derivates  $[M_1]$  und halber molekularer Drehung des entsprechenden Cystin-Derivates  $[M_2]/2$  liegen nach dieser Regel in der Größenordnung von  $200-300^\circ$ . Zum Beispiel wurde für Glutathion (in neutraler Lösung) eine Differenz von  $[M_1]_{5461} - [M_2]_{5461}/2 = +265^\circ$  gefunden<sup>11)</sup>. Diese Änderung der Drehung beim Übergang  $GSH \rightarrow GSSG$  ist zur Verfolgung des Oxydationsverlaufes von Glutathion benutzt worden<sup>12)</sup>. Für den Übergang D-Glucose-GSH  $\rightarrow$  D-Glucose-GSSG-D-Glucose ergibt sich aus den Daten der Tab. 1 eine molekulare Drehwertdifferenz von  $[M_1]_D - [M_2]_D/2 = +232^\circ$ , was mit der Regel ebenso wie die stark negative molekulare Drehung von D-Glucose-GSSG-D-Glucose ( $-267^\circ$ ) übereinstimmt.

Alle D-Glucose-Peptide mit Ausnahme des kristallisierten D-Glucose-Glycyl-L-leucins wurden als farblose amorphe Pulver erhalten. In Wasser waren alle D-Glucose-Peptide außer dem kristallisierten D-Glucose-Glycyl-L-leucin sehr gut, in organischen Lösungsmitteln wenig löslich. Gegen verdünnte Säuren (etwa gegen  $0.2-0.5\ n$  TCE) sind die D-Glucose-Peptide einige Tage bei Raumtemperatur beständig. Bei längerem Aufbewahren tritt jedoch merkliche Hydrolyse der Peptidbindungen auf.

Die D-Glucose-Peptide sind in Tab. 1 mit ihren Drehwerten (Enddrehungen) und den papierchromatographischen Wanderungsgeschwindigkeiten zusammengestellt.

<sup>8)</sup> F. G. HOPKINS, J. biol. Chemistry **84**, 276 [1929].

<sup>9)</sup> F. FEIGL, Spot-Tests, Vol. 2, 5. Edt., Elsevier Amsterdam 1956.

<sup>10)</sup> G. TOENNIES und J. J. KOLB, Analytic. Chem. **23**, 823 [1951].

<sup>11)</sup> Advances Protein Chem. **4**, 306 [1948].

<sup>12)</sup> N. W. PRIDE, Biochem. J. **25**, 1565 [1931].

Tab. 1. Übersicht über die dargestellten D-Glucose-Peptide

D-Glucose-Peptid	$R_F$	$R_{Glucose}$	Lösungs- mittel*)	$[\alpha]_D^{**}$	Temp. °C	$[M]_D$
D-Glucose-Glycyl-glycin	0.08 0.11	0.53	Bu/E Py/A	+45.7°	18	+135°
D-Glucose-Glycyl-L-leucin	0.39	2.44	Bu/E	+26.8°	20	+94°
D-Glucose-Glycyl-L-tyrosin	0.24	1.52	Bu/E	+46.2°	17	+185°
D-Glucose-L-Leucyl-glycin	0.38	2.40	Bu/E	+49.0°	19	+172°
D-Glucose-L-Leucyl-L-tyrosin	0.59	4.10	Bu/E	+12.3°	19	+56°
D-Glucose-Glycyl-glycyl-L-leucin	0.36	2.32	Bu/E	+27.0°	18	+110°
D-Glucose-GSH	0.15 0.38	0.73 1.06	Bu/E Bu/E/W	+21.0°	22	+98°
D-Glucose-GSSG-D-Glucose	0.01 0.21	0.11 0.55	Bu/E Bu/E/W	-28.5°	22	-267

\*) Bu/E = n-Butanol/Eisessig/Wasser (70:7:23);  
Bu/E/W = n-Butanol/Eisessig/Wasser (10:3:6);  
Py/A = Pyridin/Isoamylalkohol/Wasser (7:7:6)

\*\*) in Wasser

Zur Identifizierung der dargestellten Verbindungen wurde mit 2 *n* HCl (bei 80 bis 100°) und mit 2 *n* Essigsäure (bei 115°) gespalten; die entstandenen Produkte wurden durch papierchromatographischen Vergleich mit authentischen Verbindungen nachgewiesen (vgl. Tab. 1). Die gefundenen Spaltprodukte sind in Tabelle 2 verzeichnet.

Tab. 2. Spaltprodukte der dargestellten Verbindungen

Verbindung	Spaltprodukte	
	mit 2 <i>n</i> HCl	mit 2 <i>n</i> Essigsäure
Gluc-gly-gly	Gluc-gly; Gly	Fruct; Gly-gly, Gly
Gluc-gly-leu	Gluc-gly; Leu	Fruct; Gly-Leu, Gly, Leu
Gluc-gly-tyr	Gluc-gly; Tyr	Fruct; Gly-tyr, Gly, Tyr
Gluc-leu-gly	Gluc-leu; Gly	Fruct; Leu-gly, Leu, Gly
Gluc-leu-tyr	Gluc-leu; Tyr	Fruct; Leu-tyr, Leu, Tyr
Gluc-gly-gly-leu	Gluc-gly; Gly-leu, Gly, Leu	Fruct; Gly-gly-leu, Gly-gly, Gly-leu, Gly, Leu
Gluc-GSH	Gluc-gluta; Gly, Cystein; Peptide	Fruct; GSH, Gluta, Gly, Cystein; Peptide
Gluc-GSSG-Gluc	Gluc-gluta; Gly, Cystin; Peptide	Fruct; GSSG, Gluta, Gly, Cystin; Peptide
Leu-tyr-anhydrid	Leu-tyr, Tyr-leu, Leu, Tyr	

Die Ergebnisse der Spaltungsversuche entsprachen den Erwartungen: Bei der Spaltung mit Salzsäure trat Hydrolyse der Peptidbindungen ein, während der mit dem D-Glucoserest verknüpfte Aminosäure-Baustein an diesen gebunden bleibt. Die so gebildeten D-Glucose-Aminosäuren waren mit den von K. HEYNS und H. BREUER<sup>1)</sup> synthetisierten Verbindungen papierchromatographisch identisch, nicht aber mit den entsprechenden isomeren D-Mannose- und D-Fructose-Aminosäuren. — Die Spaltung mit 2 *n* Essigsäure lieferte erwartungsgemäß in einer Rückumlagerung<sup>2)</sup> D-Fructose neben den Peptiden und deren Hydrolysenprodukten.

## BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

*D-Glucose-Glycyl-glycin*: 5 g *Glycyl-glycin* und 50 g *D-Fructose* löste man unter Rühren in 1 l Eisessig bei 55° und hielt die Mischung 6 Stdn. auf dieser Temperatur, wobei Braunfärbung eintrat. Sodann wurde der Eisessig i. Vak. unterhalb von 30° weitgehend abgedampft. Der erhaltene Sirup wurde nun, in Wasser gelöst, langsam auf eine Lewatit S 100 ( $H^{\oplus}$ )-Säule (35 × 650 mm) gebracht. Nach Auswaschen der nicht adsorbierten Stoffe mit 2 l Wasser wurde mit 0.2 *n* Trichloressigsäure (TCE) eluiert und das Eluat in Fraktionen zu etwa 10 ccm mit Hilfe eines Fraktionssammlers aufgefangen. Jede 10. Fraktion wurde papierchromatographisch (Entwicklung mit Py/A; Anfärbung mit ammoniakal. Silbernitrat und Ninhydrin) getestet. Nach etwa 1 l Vorlauf erschienen die silbernitratpositiven Fraktionen (Hexose-Glycyl-glycin und Hexose-Glycin), die vereinigt wurden (ca. 2.5 l). Die TCE wurde daraus durch Extraktion mit Äther im Perforator entfernt und die wäßr. Lösung i. Vak. zu einem gelbbraunen Sirup eingengt (5 g). Dieser Sirup wurde nun in Methanol/Wasser-Lösung (1:1) in 2 gleichen Teilen auf 2 gleich große Cellulosesäulen (350 g Füllgewicht, 55 × 500 mm) gebracht. Als Elutionsmittel diente das Lösungsmittelgemisch *n*-Butanol/Äthanol/Wasser (5:2:3), welches das Wasser im gleichen Verhältnis wie das Py/A-Gemisch enthält. Jede 5. der aufgefangenen Eluatfraktionen wurde papierchromatographisch getestet (Entwicklung mit Py/A; Anfärbung mit Silbernitrat). Nur ein geringer Teil des vorhandenen Hexose-Glycins ( $R_F$  in Py/A = 0.16) konnte in einer Vorfraktion abgetrennt werden. Die zur Hauptfraktion vereinigten Einzelfraktionen von beiden Säulen (ca. 3 l Lösung) wurden i. Vak. zur Trockne eingedampft und erbrachten 4 g Substanz. Diese wurde in wenig Wasser gelöst und hälftig auf 2 Dowex 50 ( $H^{\oplus}$ )-Säulen (200–400 mesh; 20 × 490 mm) gebracht. Nach Maßgabe der Silbernitratchromatogramme (Entwicklung mit Py/A und Bu/E) und des  $K_3[Fe(CN)_6]$ -Tests<sup>4)</sup> jeder 5. aufgefangenen Fraktion von beiden Säulen wurden folgende Fraktionen zusammengestellt:

Frakt. A : Hexose-Glycin

Frakt. A' : keine Substanz

Frakt. B : *D-Glucose-Glycyl-glycin*

Frakt. C : *D-Glucose-Glycyl-glycin*, (*D*-Mannose- und *D*-Fructose-Glycyl-glycin)

Frakt. D : (*D-Glucose-Glycyl-glycin*), *D*-Mannose- und *D*-Fructose-Glycyl-glycin

Hexose-Glycin konnte nur im mit Py/A entwickelten Chromatogramm festgestellt werden, da es in Bu/E etwa die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit wie Hexose-Glycyl-glycin hat. Die Anwesenheit von *D*-Mannose-Peptid ließ sich aus den in Bu/E entwickelten Chromatogrammen ersehen.

Nach der TCE-Extraktion mit Äther im Perforator und Eindampfen der wäßrigen Lösung i. Vak. wurden aus Fraktion B (ca. 200 ccm) 0.6 g farbloser Sirup erhalten. Aus Fraktion C wurde nach weiterer Reinigung über eine kleine Dowex 50 ( $H^{\oplus}$ )-Säule weitere reine Substanz gewonnen. Die reinen Sirupe wurden in Methanol/Wasser gelöst und das *D-Glucose-Glycyl-glycin* mit Isopropylalkohol (nach Kristallisationsversuchen) ausgefällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, mit Äther gewaschen und über  $P_2O_5$  i. Vak. getrocknet. Ausb. 0.8 g papierchromatographisch reines, amorphes, etwas hygroskopisches Produkt.

$C_{10}H_{18}N_2O_8$  (294.2) Ber. C 40.8 H 6.15 N 9.51 Gef. C 40.1 H 6.16 N 9.16

*D-Glucose-Glycyl-L-leucin*: 3 g *Glycyl-L-leucin* und 30 g *D-Fructose* löste man in 750 ccm Eisessig und erhitze die Mischung 5 Stdn. auf 55°. Die braun gefärbte Lösung wurde i. Vak. unterhalb von 30° zum Sirup eingedampft und dieser schließlich, in Wasser gelöst, auf eine Lewatit S 100 ( $H^{\oplus}$ )-Säule (30 × 460 mm) gegeben. Nach Waschen mit 2 l Wasser wurde mit

0.2 *n* TCE eluiert und das Eluat in 25-ccm-Fractionen aufgefangen. Jede 5. Fraktion wurde papierchromatographisch zweifach geprüft (Anfärbung mit ammoniakal. Silbernitrat und mit Ninhydrin). Die silbernitratpositiven Fractionen, die die Hexose-Peptide enthielten, wurden vereinigt (ca. 1.8 l). Vorher wurde eine Fraktion, in der nur Hexose-Glycin ( $R_F \sim 0.08$ ) vorhanden war, abgetrennt. Nach der üblichen TCE-Extraktion wurde die wäßr. Lösung zum Sirup eingengt, der in dünnflüssigem Zustande alsbald durchkristallisierte. Die Kristalle wurden abgesaugt, mit Methanol gewaschen und konnten schließlich aus Wasser oder Methanol umkristallisiert werden. Ausb. 0.9 g farblose Kristalle vom Schmp. 151–157° (Zers.).

$C_{14}H_{26}N_2O_8$  (350.3) Ber. C 47.9 H 7.47 N 7.99 Gef. C 47.5 H 7.44 N 7.76

*D-Glucose-Glycyl-L-tyrosin*: 2 g *Glycyl-L-tyrosin* und 20 g *D-Fructose* brachte man unter Rühren in 600 ccm Eisessig in Lösung und erhitzte die Mischung 7 Std. auf 55°. Nach Abdampfen des Eisessigs i. Vak. wurde die Substanz in wäßr. Lösung auf eine Lewatit S 100 ( $H^+$ )-Säule (30 × 280 mm) gebracht, mit 2 l Wasser gewaschen und mit 0.5 *n* TCE in Fractionen zu 10 ccm eluiert. Die reduzierenden Stoffe wurden so langsam abgelöst, daß sie trotz viermaligen Auftropfens der Lösungen auf die Chromatogramme weder im Silbernitrat- noch im Smith-Chromatogramm<sup>7</sup> zu erkennen waren. Die ninhydrinpositive Substanz konnte erkannt werden. Alle ninhydrinnegativ erscheinenden Fractionen wurden vereinigt (1.5 l) und erbrachten 0.9 g braunen Sirup, der kaum noch ninhydrinpositive Substanz enthielt. Dieser wurde auf eine Dowex 50 ( $H^+$ )-Säule (20 × 480 mm) gegeben und sodann mit 0.5 *n* TCE eluiert. In den Chromatogrammen von jeder 10. der aufgefangenen 100-ccm-Eluatfractionen konnten jetzt die Substanzen nach dreimaligem Auftropfen im Silbernitrat-chromatogramm sichtbar gemacht werden. Danach wurden folgende Fractionen zusammengestellt:

Frakt. A: Hexose-Glycin ( $R_F$  0.08)

Frakt. B: *D-Glucose-Glycyl-L-tyrosin*

Frakt. C: *D-Glucose-Glycyl-L-tyrosin*, (*D-Mannose-* und *D-Fructose-Glycyl-L-tyrosin*)

Frakt. D: (*D-Glucose-Glycyl-L-tyrosin*), *D-Mannose-* und *D-Fructose-Glycyl-L-tyrosin*

Die chromatographisch einheitliche Fraktion B konnte hier nicht durch den  $K_3[Fe(CN)_6]$ -Test<sup>4</sup>) auf etwaiges Vorhandensein von *D-Fructose-Peptid* geprüft werden, da dieser bei der Anwesenheit des Tyrosinrestes auf jeden Fall positiv ausfällt. Nach der üblichen Aufarbeitung (TCE-Extraktion und Eindampfen i. Vak.) wurden aus Fraktion B 200 mg Sirup erhalten, aus Fraktion C 250 mg Sirup. Letztere wurde über eine weitere kleine Dowex 50 ( $H^+$ )-Säule gereinigt, und es konnten in analoger Weise weitere 150 mg papierchromatographisch einheitliches Produkt erhalten werden.

Um die einheitlich erscheinende Substanz trotz des Versagens des  $K_3[Fe(CN)_6]$ -Tests sicher von isomeren Verbindungen zu reinigen, wurde sie nun noch an Cellulosepulver adsorbiert, auf eine Cellulosesäule (30 × 520 mm) gegeben und mit wassergesätt. *n*-Butanol eluiert. Es wurde je eine kleine Vor- und Nachfraktion vom silbernitratpositiven Eluat weggeschnitten. Dabei wurden wieder 10-ccm-Einzelfractionen aufgefangen. Die Hauptfraktion (ca. 200 ccm) erbrachte nach Abdampfen des größten Teils des Lösungsmittels (es empfiehlt sich, nicht bis zur Trockne einzudampfen, da im restlichen Butanol trotz vorherigen Waschens immer noch Verunreinigungen aus der Cellulose gelöst bleiben), Abzentrifugieren der ausgeschiedenen Substanz, Waschen mit *n*-Butanol und Äther und Trocknung über  $P_2O_5$  i. Vak. 0.25 g reines Produkt in Form eines farblosen, amorphen, etwas hygroskopischen Pulvers.

$C_{17}H_{24}N_2O_9$  (400.4) Ber. C 50.9 H 6.04 N 6.99 Gef. C 50.3 H 6.06 N 6.85

*D-Glucose-L-Leucyl-glycin*: 3 g *L-Leucyl-glycin* und 30 g *D-Fructose* brachte man bei 55° in 800 ccm Eisessig in Lösung und hielt die Mischung 8 Stdn. auf dieser Temperatur. Den nach Abdampfen des Eisessigs i. Vak. erhaltenen braunen Sirup brachte man auf eine Lewatit S 100 (H<sup>+</sup>)-Säule (35 × 220 mm), wusch mit 2 l Wasser und eluierte anschließend mit 0.25 *n* TCE, wobei Fraktionen zu ~10 ccm aufgefangen wurden; jede 10. wurde chromatographisch untersucht (Anfärbung mit ammoniakal. Silbernitrat, nach SMITH mit Chlor-*o*-Tolidin/KJ<sup>7)</sup> und mit Ninhydrin; die Lösungen mußten viermal auf die Startpunkte der Chromatogramme aufgetragen werden). Die Fraktionen der silbernitratpositiven Substanzen (ca. 1 l) wurden vereinigt; sie enthielten auch noch etwas ninhydrinpositive Substanz. Nach der TCE-Extraktion mit Äther im Perforator wurde i. Vak. zu einem steifen bräunlichen Sirup (~1.6 g) eingeeengt.

Dieses Substanzgemisch wurde nun über eine Dowex 50 (H<sup>+</sup>)-Säule (20 × 430 mm) geführt, jedoch wiesen die Silbernitratchromatogramme der Fraktionen keinen wesentlichen Trenneffekt aus. Die restliche ninhydrinpositive Substanz blieb auf der Säule. Es wurde 0.8 g gelblicher Sirup erhalten, der, an Cellulosepulver adsorbiert, auf eine Cellulosesäule (30 × 530 mm) gebracht wurde. Gemäß den Silbernitratchromatogrammen jeder 5. der aufgefangenen 10-ccm-Fraktionen und den K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]-Tests<sup>4)</sup> wurden folgende Fraktionen zusammengestellt:

Frakt. A: *D-Mannose-L-Leucyl-glycin*

Frakt. B: *D-Mannose-L-Leucyl-glycin*, *D-Glucose-L-Leucyl-glycin*

Frakt. C: *D-Glucose-L-Leucyl-glycin*

Frakt. D: *D-Glucose-L-Leucyl-glycin*, *D-Fructose-L-Leucyl-glycin*

Aus Fraktion C (ca. 300 ccm) wurden nach Eindampfen bis nicht ganz zur Trockne, Abzentrifugieren des ausgefallenen festen Stoffes, Waschen mit Butanol und Äther sowie Trocknung über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> i. Vak. 0.55 g reines *D-Glucose-L-Leucyl-glycin* als farbloses, amorphes, etwas hygroskopisches Pulver erhalten.

C<sub>14</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (350.3) Ber. C 47.9 H 7.47 N 7.99 Gef. C 47.3 H 7.96 N 7.79

*L-Leucyl-L-tyrosin-anhydrid*: 4.5 g *L-Leucyl-L-tyrosin* und 45 g *D-Fructose* brachte man bei 58° in 1 l Eisessig in Lösung und hielt die Lösung 7 Stdn. auf dieser Temperatur. Das mit Chlor-*o*-Tolidin/KJ<sup>7)</sup> entwickelte Chromatogramm des Ansatzes zeigte als Hauptprodukt das silbernitrat- und ninhydrinnegative *L-Leucyl-L-tyrosin-anhydrid*. Der nach dem Abdampfen des Eisessigs zurückbleibende Sirup wurde mit Wasser aufgenommen. Das hierbei in fester Form abgeschiedene *L-Leucyl-L-tyrosin-anhydrid* wurde abfiltriert. Aus dem Filtrat konnte nach Einengen weitere feste Substanz gewonnen werden. Umkristallisieren des Rohproduktes (0.8 g) aus Methanol lieferte nach der Trocknung über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> i. Vak. 0.65 g reines Produkt in nadelförmigen, farblosen Kristallen. Das Produkt kann auch durch mehrstündiges Erhitzen von *L-Leucyl-L-tyrosin* in Eisessig auf 60°, Abdampfen des Eisessigs und Umkristallisieren des Rückstandes aus Methanol gewonnen werden. Es bildet sich bereits bei mehrtägigem Aufbewahren der Lösung von *L-Leucyl-L-tyrosin* in Eisessig bei Raumtemperatur. Schmp. 280° (Zers.); *R<sub>F</sub>* (Bu/E) 0.83, *R<sub>F</sub>* (Py/A) 0.84.

C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (276.3) Ber. C 65.1 H 7.26 N 10.13 Gef. C 65.1 H 7.23 N 10.18

*D-Glucose-L-Leucyl-L-tyrosin*: Das Filtrat vom *L-Leucyl-L-tyrosin-anhydrid* wurde auf eine Lewatit S 100 (H<sup>+</sup>)-Säule (35 × 220 mm) gebracht. Dann wurde mit 2 l Wasser gewaschen und schließlich mit 0.5 *n* TCE eluiert, wobei 10-ccm-Fraktionen gesammelt wurden. Da die Erkennung der reduzierenden Substanz vor allem durch die Anwesenheit der TCE gestört war, wurden alle nicht deutlich ninhydrinpositiven Fraktionen (ca. 4.5 l) vereinigt



und erbrachten nach TCE-Extraktion und Eindampfen 3.4 g braunen Sirup. Dieser enthielt allerdings auch noch ninhydrinpositive Substanzen (Leu-tyr mit  $R_F$  0.73 sowie ein unbekanntes Produkt mit  $R_F$  0.74–0.75). Das D-Glucose-L-Leucyl-L-tyrosin wurde nun mit Hilfe von drei nacheinander folgenden Cellulosesäulen, einer Dowex 50 ( $H^+$ )-Säule sowie einer weiteren Cellulosesäule weiter angereichert und schließlich rein isoliert. Für die Cellulosesäulen diente wassergesätt. n-Butanol als Elutionsmittel. Ihre Größe wurde jeweils so bemessen, daß die aufgetragene Substanz höchstens 1 % des Cellulose-Füllgewichts ausmachte. Die Substanzen wurden in konz. n-Butanol/Wasser-Lösung aufgetragen. Der Nachweis der Substanzen in den 10-ccm-Eluatfraktionen geschah am vorteilhaftesten chromatographisch durch Anfärbung mit Chlor/*o*-Tolidin/KJ<sup>7)</sup>. Bei der Anwendung der Dowex 50 ( $H^+$ )-Säule (Elution mit 0.5*n* TCE) mußte aus den zu untersuchenden Fraktionen vorher die Hauptmenge der TCE durch dreimaliges Ausschütteln mit Äther entfernt werden, um die Substanzen einigermaßen erkennen zu können. Bei den Cellulosesäulen fand sich das gesuchte Produkt jeweils in einer Mittelfraktion (B) angereichert. Die Dowex 50-Säule diente zur Entfernung der restlichen ninhydrinpositiven Substanzen, welche in einer Fraktion II erschienen. Folgende Substanz(-Gemisch)-Mengen wurden weitergeleitet, wobei zwischendurch die üblichen Aufarbeitungsoperationen vorgenommen wurden:

Eluat von der Lewatit S 100-Säule: 3.4 g;

Frakt. B<sub>1</sub> (von der 1. Cellulosesäule): 2.0 g;

Frakt. B<sub>2</sub> (von der 2. Cellulosesäule): 1.2 g;

Frakt. B<sub>3</sub> (von der 3. Cellulosesäule): 0.85 g;

Frakt. I (von der Dowex 50 ( $H^+$ )-Säule): 0.35 g;

Frakt. B<sub>4</sub> (von der 4. Cellulosesäule): 0.12 g (reines D-Glucose-L-Leucyl-L-tyrosin)

Nach Einengen der zuletzt erhaltenen n-Butanol/Wasser-Lösung, Ausfällen mit trockenem Äther, Abzentrifugieren des ausgefallenen Produkts, Waschen mit trockenem Äther sowie Trocknen über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> wurden 0.12 g farbloses, amorphes, hygroskopisches Pulver erhalten.

C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub> (456.5) Ber. N 6.13 Gef. N 5.85

*Carbobenzoxy-glycyl-glycyl-L-leucin*: 16.5 g *Diketopiperazin* wurden mit 90 ccm 2*n* NaOH und 50 ccm Wasser geschüttelt, bis eine klare Lösung erhalten wurde. Dann fügte man nach und nach 33 g *Chlorameisensäure-benzylester* (CboCl) unter Rühren bei 0° zu und rührte die Mischung 5 Stdn. lang weiter. Die Lösung wurde zur Entfernung von überschüss. CboCl zweimal mit Äther extrahiert und dann mit verd. Salzsäure angesäuert. Es fiel Cbo-Glycyl-glycin aus, das viermal mit Wasser gewaschen wurde. Ausb. nach Trocknung bei 50° 31 g. Schmp. 178°.  $R_F$  (Py/A) 0.57. Anfärbung nach SMITH<sup>7)</sup>.

Nun wurde eine Lösung von 26.6 g *Cbo-Glycyl-glycin* und 10.1 g Triäthylamin in 750 ccm Tetrahydrofuran mit Eis/Kochsalz-Mischung auf –5° abgekühlt. Nach Zusatz von 14 g *Chlorameisensäure-äthylester* unter Rühren stieg die Temperatur bis auf +5° an. Es fiel Triäthylamin-hydrochlorid aus. Nach 15 Min. Reaktionsdauer wurde dann bei –5° unter Rühren eine Lösung von 13.1 g *L-Leucin* in 100 ccm 1*n* NaOH zugesetzt. Nach Entfernung des Kühlbades rührte man die Mischung 2 Stdn. weiter, säuerte mit verd. Salzsäure an und extrahierte zweimal mit Äther. Der Ätherextrakt wurde so weit eingeeengt, bis ein Öl zurückblieb, welches beim Verreiben kristallisierte. Der Kristallbrei wurde von der Mutterlauge abgetrennt. Nach nochmaligem Eindampfen konnte aus dieser weiteres krist. Festprodukt erhalten werden. Nach dreimaligem Umkristallisieren aus Methanol/Wasser wurden schließlich 11 g farbloses, krist. *Cbo-Glycyl-glycyl-L-leucin* erhalten. Schmp. 177–179°.  $R_F$  (Py/A) 0.70. Anfärbung nach SMITH<sup>7)</sup>.

C<sub>18</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> (379.4) Ber. C 57.0 H 6.64 N 11.07 Gef. C 57.0 H 6.70 N 10.85

*Glycyl-glycyl-L-leucin*: 10.5 g *Cbo-Glycyl-glycyl-L-leucin* wurden in möglichst wenig 33-proz. HBr-Lösung in Eisessig gelöst. Die Lösung wurde dann unter Ausschluß von Feuchtigkeit 30 Min. lang auf 60° erwärmt, wobei CO<sub>2</sub>-Entwicklung erfolgte. Nach Abkühlung der Lösung wurde mit Äther das Hydrobromid des Tripeptids als gelbe Schmiere ausgefällt und die Lösung davon dekantiert. Die Schmiere wurde in wenig Wasser gelöst und ein Überschuß Pyridin zur Bindung von HBr aus dem Hydrobromid zugesetzt. Nach Versetzen der Lösung schieden sich alsbald farblose Kristalle ab, die abfiltriert und aus Wasser/Äthanol umkristallisiert wurden. Ausb. 3.0 g reines krist. Produkt. Nach der Elementaranalyse und dem IR-Spektrum in Nujol (OH-Bande bei 2.85  $\mu$ ) erwiesen sich die Kristalle als *Mono-hydrat des Glycyl-glycyl-L-leucins*.  $R_F$  (Bu/E) 0.45,  $R_F$  (Py/A) 0.29. Ein Schmelzpunkt ließ sich nicht bestimmen, da sich die Substanz über einen weiten Temperaturbereich hin zersetzte.

$C_{10}H_{19}N_3O_4 \cdot 1H_2O$  Ber. C 45.6 H 8.03 N 15.9 Gef. C 46.3 H 7.91 N 15.9

$[\alpha]_D^{25}$ :  $-8^\circ$  ( $c = 2.0$ ; in Wasser).

*D-Glucose-Glycyl-glycyl-L-leucin*: 2 g *Glycyl-glycyl-L-leucin* (Monohydrat) und 20 g *D-Fructose* brachte man in 500 ccm Eisessig bei 55° in Lösung und hielt die Mischung 6 Stdn. auf dieser Temperatur. Den nach Abdampfen des Eisessigs i. Vak. erhaltenen braunen Sirup löste man in Wasser, brachte ihn auf eine Lewatit S 100 (H<sup>+</sup>)-Säule (30  $\times$  220 mm), wusch mit 1.8 l Wasser und eluierte mit 0.25 *N* TCE Fraktionen zu 10 ccm. Die silbernitrat-positiven Fraktionen (ca. 800 ccm) erbrachten nach der üblichen Aufarbeitung 1.9 g Sirup, welcher, in Wasser gelöst, auf eine Dowex 50 (H<sup>+</sup>)-Säule (20  $\times$  490 mm) gebracht wurde. Es wurde mit 0.1 *N* TCE eluiert, und gemäß den Silbernitrat-Chromatogrammen der aufgefundenen 10-ccm-Einzelfraktionen konnte in einer Vorfraktion (500 ccm) ein Großteil des vorhandenen Hexose-Glycins ( $R_F \approx 0.08$ ) abgetrennt werden. Die übrigen Stoffe erschienen jedoch ungetrennt in einer Hauptfraktion ( $\approx 800$  ccm). Nach der üblichen Aufarbeitung wurden aus der Hauptfraktion 1.25 g hellgelber Sirup erhalten. Das Substanzgemisch wurde nun, an Cellulose adsorbiert, auf eine Cellulosesäule (30  $\times$  650 mm) gebracht und dann mit wassergesätt. *n*-Butanol eluiert. Gemäß den Silbernitrat-Chromatogrammen jeder 5. der aufgefundenen 10-ccm-Fraktionen und dem Resultat des K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]-Tests<sup>4)</sup> wurden folgende Fraktionen zusammengestellt:

Frakt. A: *D*-Mannose-Glycyl-glycyl-L-leucin, *D*-Glucose-Glycyl-glycyl-L-leucin

Frakt. B: *D*-Glucose-Glycyl-glycyl-L-leucin (rein)

Frakt. C: *D*-Fructose-Glycyl-glycyl-L-leucin (*D*-Glucose-Glycyl-glycyl-L-leucin)

Frakt. C': keine Substanz

Frakt. D: Hexose-Glycin (usw.) ( $R_F$  0.08)

Aus Fraktion A ( $\approx 180$  ccm; 0.5 g Substanz) wurde nach üblicher Aufarbeitung über eine weitere Cellulosesäule (30  $\times$  500 mm) in analoger Weise weiteres reines *D*-Glucose-Tripeptid erhalten. Insgesamt wurden von der 2. Cellulosesäule und aus Fraktion B ( $\sim 250$  ccm) von der ersten 0.7 g *D-Glucose-Glycyl-glycyl-L-leucin* als chromatographisch reines, farbloses, amorphes, etwas hygroskopisches Pulver erhalten.

$C_{16}H_{29}N_3O_9$  (407.4) Ber. C 47.1 H 7.17 N 10.3 Gef. C 46.9 H 7.59 N 9.90

*D-Glucose-glutathion*: 6 g *Glutathion* (GSH) und 60 g *D-Fructose* brachte man bei 55° in 600 ccm Dimethylsulfoxyd (DSO) unter Rühren in Lösung und hielt die Mischung 16 Stdn. auf dieser Temperatur. Die gelbbraun gefärbte Lösung wurde dann im Ölpumpenvakuum bei 55° Badtemperatur soweit eingengt, daß ein dünner Sirup zurückblieb. Dieser wurde in Wasser gelöst, auf eine Lewatit S 100 (H<sup>+</sup>)-Säule (35  $\times$  450 mm) gebracht. Es wurde mit Wasser gewaschen und anschließend mit 0.5 *N* TCE eluiert. Die aufgefundenen silbernitrat-

positiven Fraktionen ( $\sim 3$  l) wurden vereinigt. Eine Abtrennung von der restlichen ninhydrinpositiven Substanz (GSSG;  $R_F$  0.27 in n-Butanol/Eisessig/Wasser (10:3:6)) war hier wegen der starken nichtionischen Adsorption der Stoffe zunächst nicht möglich. Nach TCE-Extraktion und Eindampfen i. Vak. wurden 6 g gelber Sirup erhalten. 3 g davon wurden zur direkten Gewinnung von *D-Glucose-GSSG-D-Glucose* auf eine Dowex 50 ( $H^+$ )-Säule (Nr. 1;  $20 \times 440$  mm) gebracht. Eluiert wurde mit 0.25 *N* TCE. Nach einem Vorlauf ( $\sim 1.5$  l) wurden nach Maßgabe der mit Chlor/*o*-Tolidin/KJ<sup>7)</sup> angefärbten Chromatogramme der aufgefundenen 10-ccm-Fractionen (Entwicklung mit Bu/E/W (10:3:6)) folgende Fraktionen zusammengestellt:

Frakt. A<sub>1</sub>: Schneller wandernde (ninhydrinpositive) Verunreinigungen

Frakt. A'<sub>1</sub>: Keine Substanz

Frakt. B<sub>1</sub>: *D-Glucose-GSSG-D-Glucose* (rein)

Frakt. C<sub>1</sub>: *D-Glucose-GSSG-D-Glucose*, (isomere Verbindungen)

Frakt. D<sub>1</sub>: *D-Glucose-GSSG-D-Glucose*, (isomere Verbindungen)

Die Fraktionen B<sub>1</sub> (300 ccm; 0.45 g), C<sub>1</sub> (800 ccm, 1.0 g) und D<sub>1</sub> (1 l; 0.4 g) wurden von der TCE befreit, eingedampft und ergaben die angegebenen Mengen an sehr hygroskopischen farblosen Sirupen, die durch Behandlung mit Methanol/Äther in ein farbloses, amorphes Pulver übergeführt werden konnten. In Methanol waren die Substanzen bereits schwer löslich. Die Substanz der Fraktion C<sub>1</sub> reinigte man in analoger Weise noch über eine weitere Dowex 50 ( $H^+$ )-Säule (Nr. 2) und isolierte weitere 0.3 g reines Material. Die Substanz aus Fraktion D<sub>1</sub> zeigte  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-54^\circ$  ( $c = 2.0$ , in  $H_2O$ ), die reine Substanz (Gesamtausbeute nach Trocknung über  $P_2O_5$  0.75 g)  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-28.5^\circ$  ( $c = 2.0$ , in Wasser). Reduktion der Substanz mit  $H_2S$  erbrachte kein GSH ( $R_F$  0.46 in Bu/E/W (10:3:6), ninhydrinpositiv), sondern nur *D-Glucose-GSH*.

$C_{32}H_{52}N_6O_{22}S_2$  (936.8) Ber. C 41.0 H 5.59 N 8.96 S 6.84

Gef. C 39.7 H 5.36 N 8.10 S 6.46

Die Substanz verbraucht keine Jodlösung und läßt sich auf Chromatogrammen mit Silbernitrat, mit Chlor/*o*-Tolidin/KJ und ferner nach Behandlung mit KCN-Lösung mit Nitroprussid-natrium<sup>10)</sup> anfärben, nicht dagegen mit Ninhydrin.

Die zweite Hälfte des von der Lewatit S 100 ( $H^+$ )-Säule erhaltenen Sirups (3 g) brachte man auf eine Dowex 50 ( $H^+$ )-Säule (Nr. 3; Größe wie Nr. 1) und entfernte dann in einer Vorfraktion (Elution mit 0.25 *N* TCE) schneller wandernde Verunreinigungen. Die übrigen aufgefundenen 10-ccm-Fractionen ( $\sim 2$  l, etwa 1.8–2 g Substanz enthaltend) wurden vereinigt, von TCE befreit und auf etwa 100 ccm eingengt. Sodann wurde unter Eiskühlung bei Gegenwart einiger Quecksilberkügelchen  $H_2S$  zur Reduktion eingeleitet<sup>1)</sup>. Die Lösung ließ man gut verschlossen bei Raumtemperatur mehrere Tage stehen. Das Einleiten von  $H_2S$  wurde zwischendurch noch zweimal in der Kälte wiederholt. Die von reichlich ausgeschiedenem Schwefel abfiltrierte Lösung wurde i. Vak. weitgehend von  $H_2S$  befreit und schließlich unter Stickstoffatmosphäre etwas eingengt. Sodann wurde sie zur Gewinnung von *D-Glucose-GSH* auf eine Dowex 50 ( $H^+$ )-Säule (Nr. 4;  $20 \times 350$  mm) gegeben. Es wurde mit 0.25 *N* TCE eluiert und das Eluat in Fraktionen zu  $\sim 10$  ccm aufgefangan. Gemäß den mit Chlor/*o*-Tolidin/KJ angefärbten Chromatogrammen wurden aus einer zuerst aus der Säule austretenden Fraktion A<sub>4</sub> (50 ccm) nach der üblichen Aufarbeitung 0.4 g farbloser Sirup erhalten. Aus einer darauf folgenden Fraktion B<sub>4</sub> (120 ccm; ca. 0.8 g Substanz) wurde über eine weitere Dowex 50 ( $H^+$ )-Säule (Nr. 5;  $20 \times 300$  mm) weiteres reines *D-Glucose-GSH* gewonnen.

Aus den erhaltenen chromatographisch einheitlichen Sirupen, die sehr hygroskopisch waren und sich in Methanol schwer lösten, wurde durch Behandlung mit Methanol und

trockenem Äther ein farbloses, amorphes, hygroskopisches Pulver erhalten. Gesamtausb. nach Trocknen über  $P_2O_5$  i. Vak. 0.5 g. Die Substanz ließ sich auf Chromatogrammen mit Silbernitrat, mit Chlor/*o*-Tolidin/KJ<sup>7)</sup>, mit Jodazid<sup>9)</sup> und direkt mit Nitroprussid-natrium<sup>10)</sup> anfärben, nicht dagegen mit Ninhydrin.

$C_{16}H_{27}N_3O_{11}S$  (469.5) Ber. C 40.9 H 5.80 N 8.94 S 6.83 SH 7.04

Gef. C 41.0 H 5.84 N 8.72 S 6.53 \*) SH 6.94 \*\*)

\*) Gesamtschwefel nach WURZSCHMITT

\*\*) SH-Gruppen-Bestimmung durch Titration mit  $n/100$  Jod/Thiosulfat (Stärkeindikator)

Die Entwicklung der Chromatogramme wurde im Falle der Glutathion-Verbindungen mit *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (10:3:6) vorgenommen, welches infolge des größeren Wassergehalts eine größere Wanderungsgeschwindigkeit der sonst sehr langsam wandernden Peptide bewirkte. *D*-Glucose-GSSG-*D*-Glucose ( $R_F$  0.21) wanderte etwas langsamer als GSSG ( $R_F$  0.27), *D*-Glucose-GSH ( $R_F$  0.38) etwas langsamer als GSH ( $R_F$  0.46). Entsprechende Verhältnisse lagen bei allen bisher untersuchten Peptiden und Aminosäuren und den entsprechenden *D*-Glucose-Verbindungen im *n*-Butanol/Eisessig/Wasser-System vor.

Zur Rückoxydation zu *D*-Glucose-GSSG-*D*-Glucose löste man 0.2 g *D*-Glucose-GSH in 50 ccm Wasser und brachte die zunächst sauer reagierende Lösung mit verd. Ammoniak auf  $p_H$  9. Sodann wurde 2 Stdn. Sauerstoff eingeleitet. Von der Mercaptoverbindung blieb auch bei noch längerem  $O_2$ -Einleiten ein geringer Rest zurück. Die Lösung mußte deshalb und zur Entfernung der Ammoniumionen in der üblichen Weise noch über eine Dowex 50 ( $H^+$ )-Säule (Nr. 6;  $20 \times 200$  mm; Elution mit 0.25 *n* TCE; Fraktionen zu 8 ccm) geschickt werden. Nach Abtrennung einer Vorfraktion  $A_6$  mit restlicher Mercaptoverbindung konnte aus einer Fraktion  $B_6$  nach der üblichen Aufarbeitung wieder reine *D*-Glucose-GSSG-*D*-Glucose erhalten werden. Die Fraktionen wurden wieder gemäß den Chlor/*o*-Tolidin/KJ-Chromatogrammen zusammengestellt. Die Ammoniumionen verblieben auf der Säule, in den aufgefundenen Fraktionen konnte mit Neßlers Reagenz keine sofortige Orangefärbung festgestellt werden. Ausb. 0.11 g farbloses, amorphes, hygroskopisches Pulver.

Dieses Produkt hatte die gleichen Eigenschaften wie das schon beschriebene „direkt“ gewonnene.  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-27.0^\circ$  ( $c = 2.0$ , in Wasser).

Die Spaltungsversuche wurden in der Weise ausgeführt, daß etwa 5-proz. Lösungen der Substanzen in 2 *n* HCl bzw. 2 *n* Essigsäure im Einschlußröhrchen erhitzt wurden. Bei den salzsauren Spaltungen wurde 6–8 Stdn. auf  $80-100^\circ$  erhitzt, bei der „Rückumlagerung“ mit 2 *n* Essigsäure 4 Stdn. auf  $115^\circ$ . Die Spaltprodukte wurden durch papierchromatographischen Vergleich mit authent. Stoffen identifiziert.

Soweit nichts anderes angegeben, wurden die papierchromatographischen Untersuchungen im absteigenden Verfahren mit *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (70:7:23) (= Bu/E) auf Schleicher & Schüll-Papier 602 h:p durchgeführt. Außerdem wurden als Lösungsmittel zum Entwickeln der Chromatogramme noch *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (10:3:6) (= Bu/E/W) und Pyridin/Isoamylalkohol/Wasser (7:7:6) (= Py/A) verwendet.

Im System *n*-Butanol/Eisessig/Wasser haben die *D*-Mannose-Peptide einen etwas größeren, die *D*-Fructose-Peptide meist einen etwas geringeren  $R_F$ -Wert als die entsprechenden *D*-Glucose-Peptide, was den Erfahrungen bei den Hexose-Aminosäuren<sup>2)</sup> entspricht. Die *D*-Fructose-Peptide (und -Aminosäuren) liefern bei der Anfärbung mit Silbernitrat meist graubraun gefärbte Flecke, während die Aldose-Peptide (und -Aminosäuren) im allgemeinen rein braune Flecke ergeben.

Bei der Papierchromatographie der Glutathion-Verbindungen in der Mercaptoform erhält man infolge von Autoxydation immer Schwanzbildung, was jedoch für die Aufarbeitung keine Störung bedeutet.