Über Molekülverbindungen zwischen α -Aminosäuren und nicht-reduzierenden Zuckern. II *

RUTH WEICHERT

Institutet för organisk kemi och biokemi, Stockholms Högskola, Stockholm, Schweden

Die Synthesen von D,L-, D- und L- γ -(*o*-Oxyphenyl)- α -aminobuttersäure werden beschrieben.

Sowohl die D-, als auch die L-Aminosäure geben eine kristallisierte Molekülverbindung mit Rohrzucker im Mol-Verhältnis 1:1; dagegen erhält man aus einer Lösung von der razemischen Aminosäure und Rohrzucker, nach dem *Dimrothschen* Verfahren, nur die Komponenten zurück.

Bei Desoxokynurenin liegt absolut sterische Spezifität vor; nur die L-Form, nicht aber die D-Form dieser Aminosäure gibt mit Rohrzucker eine kristallisierte Molekülverbindung. Einen Austausch der Kernaminogruppe der Aminosäure gegen OH-Gruppe hebt diese sterische Spezifität auf.

Bei Versuchsbedingungen, unter welchen D,L-Kynurenin und D,L-Tryptophan papierchromatographisch in optische Antipoden gespalten werden, wandern D,L-Dihydrokynurenin, D,L-Desoxokynurenin und D,L- γ -(*o*-Oxyphenyl)- α -aminobuttersäure als einheitliche Flecken. Für die papierchromatographische Spaltbarkeit des D,L-Kynurenins scheint somit die Ketogruppe notwendig zu sein.

In früheren Arbeiten^{1,2} wurde mitgeteilt, dass bei der Bildung einer kristallisierten Molekülverbindung zwischen L-Kynurenin und Rohrzucker^{3,4} die Ketogruppe des Kynurenins ohne Bedeutung für die Bindung zum Rohrzucker war, dagegen erwies sich die Kernaminogruppe als notwendig. In Übereinstimmung hiermit lieferte L-Desoxokynurenin eine kristallisierte Molekülverbindung mit Rohrzucker im Mol-Verhältnis 1:1. Sowohl das synthetische Kynurenin, als auch das synthetische Desoxokynurenin wurden über die kristallisierten Molekülverbindungen der L-Form dieser Aminosäuren mit Rohrzucker in optische Antipoden gespalten^{4,2}. Des weiteren ergab sich, dass D-Desoxokynurenin keine kristallisierte Molekülverbindung mit Rohrzucker geben konnte, dass also hier absolut sterische Spezifität vorlag.

* Teil I: Weichert, R. *Arkiv Kemi* 5 (1953) 523.

γ -(*o*-Oxyphenyl)- α -aminobuttersäure und Rohrzucker

Die vorliegende Arbeit behandelt den Austausch der Kernaminogruppe des Desoxokynurenins durch Diazotierung gegen eine OH-Gruppe und das Verhalten der gewonnenen D,L-, D- und L- γ -(*o*-Oxyphenyl)- α -aminobuttersäuren gegenüber Rohrzucker, Raffinose und Melezitose. Die Versuche wurden nach dem Dimrothschen⁵ Verfahren zur Herstellung von kristallisierten Molekülverbindungen im Mol-Verhältnis 1 : 1 durchgeführt.

Es zeigte sich, dass aus einer Lösung von der racemischen Aminosäure und Rohrzucker die Komponenten wieder auskristallisierten, aber dass sowohl die reine L-Aminosäure, als auch die reine D-Aminosäure mit Rohrzucker kristallisierte Molekülverbindungen gaben. In diesem Fall kann also nicht, wie bei Kynurenin und Desoxokynurenin, eine Spaltung des Razemats über eine Rohrzuckerverbindung erzielt werden.

Gibt eine Antipode einer Aminosäure eine kristallisierte Molekülverbindung mit Rohrzucker, so muss folgende Bedingung erfüllt sein, damit aus einer Lösung der racemischen Aminosäure und Rohrzucker die Molekülverbindung auskristallisiert und nicht das Razemat¹:

$$G_{MV} > \sqrt{G_{DL}},$$

wo G_{MV} nach der Dimrothschen Formel die »Stabilitätskonstante« der Molekülverbindung und G_{DL} die des Razemats bedeutet. Bei Desoxokynurenin war diese Bedingung vorhanden. Der Wert $\sqrt{G_{DL}}$ bei D,L-Desoxokynurenin war ca. 2,8. G_{MV} bei der Verbindung L-Desoxokynurenin-Rohrzucker konnte man dadurch abschätzen, dass die Verbindung schon aus einer Lösung auskristallisierte, die in Bezug auf Rohrzucker, bzw. D,L-Desoxokynurenin halbgesättigt war; daraus ergab sich $G_{MV} > 11$. Bei der D,L- γ -(*o*-Oxyphenyl)- α -aminobuttersäure liegt der Wert $\sqrt{G_{DL}}$ im Vergleich mit anderen Aminosäuren¹ sehr hoch, etwa bei 8,8, und daraus erklärt sich wohl, dass in diesem Fall das Razemat auskristallisiert.

Mit dem Austausch der Kernaminogruppe gegen OH-Gruppe ist die sterische Spezifität, wie sie bei Desoxokynurenin vorliegt, wo nur die L-Form eine kristallisierte Verbindung mit Rohrzucker gibt, aufgehoben. Eine Erklärung hierfür steht noch aus.

Weder mit Raffinose noch mit Melezitose geben L- oder D- γ -(*o*-Oxyphenyl)- α -aminobuttersäure kristallisierte Molekülverbindungen.

Papierchromatographisches Verhalten des Desoxokynurenins und der γ -(*o*-Oxyphenyl)- α -aminobuttersäure.

Mehrere racemische Aminosäuren erleiden Spaltungen in optische Antipoden bei Papierchromatographie⁶ und als Erklärung hierfür muss man eine Adsorption an der optisch aktiven Cellulose annehmen; eine Adsorption, die aus sterischen Gründen für die eine Antipode der betreffenden Aminosäuren grösser ist als für die andere.

Zu dieser Gruppe papierchromatographisch spaltbarer Aminosäuren gehört auch das D,L-Kynurenin. Da L-Kynurenin in der kristallisierten Molekülverbindung mit Rohrzucker durch L-Desoxokynurenin und durch L-, bzw.

D- γ -(*o*-Oxyphenyl)- α -aminobuttersäure ersetzt werden kann, liegt die Annahme nahe, dass auch die Razemate der letztgenannten beiden Aminosäuren papierchromatographisch spaltbar wären. Dieses scheint aber nicht der Fall zu sein. Bei Durchlaufchromatographie mit Butanol-Wasser (75 ml Wasser mit *n*-Butanol zu 500 ml Volumen), oder mit Methanol-Wasser (3 : 1), wandern die D-, L- und D,L-Formen der resp. Aminosäuren gleich lange Strecken auf Whatman Nr. 4-Papier. Auch findet man keine Verlängerung des Razematflecks, wie man es bei den spaltbaren Aminosäuren beobachtet, wenn die Wegstrecke für vollständige Spaltung zu kurz ist. Unter den gleichen Versuchsbedingungen und Wanderungsstrecken wird D,L-Tryptophan, bzw. D,L-Kynurenin, gespalten, und erscheint auf dem Papier als zwei deutlich voneinander getrennte Flecke. D,L-Dihydrokynurenin³, mit Methanol-Wasser (3 : 1) chromatographiert, zeigt auch keine Aufspaltung in Antipoden. Wie andere aromatische Aminosäuren wandern auch die oben Genannten mit Wasser unter Verzögerung auf dem Papier.

Tabelle 1. Quotient der Wanderungsstrecken der Antipoden.

	Wasser	Butanol-Wasser		Methanol-Wasser	
	a	a	b	a	b
Kynurenin	0,90	0,83	0,82	0,80	0,79
Tryptophan			0,92		0,91

^a Berechnet aus den optischen Isomeren

^b Berechnet aus den zwei Flecken des gespaltenen Razemats

Tabelle 2. *R_F*-Werte im Wasser.

	L	D,L	D
Kynurenin	0,63	0,62	0,57
Tryptophan	0,53	0,55	
Desoxokynurenin	0,73	0,74	0,74
γ -(<i>o</i> -Oxyphenyl)- α -aminobuttersäure	0,76	0,77	0,76
Dihydrokynurenin		0,69	

Die Ketogruppe des Kynurenins, die bei der Bildung einer kristallisierten Molekülverbindung mit Rohrzucker ohne Bedeutung ist, scheint also bei der papierchromatographischen Antipodentrennung notwendig zu sein, da eine Veränderung der Ketogruppe zur $-\text{CH}(\text{OH})-$ oder $-\text{CH}_2-$ diese Spaltung verhindert.

Ein Grund hierfür kann noch nicht gegeben werden. Vielleicht wäre eine Erklärung, dass durch die Veränderung der Ketogruppe zur $-\text{CH}(\text{OH})-$, bzw. $-\text{CH}_2-$, die Lage der α -Aminosäuregruppe im Raum eine andere wird, und für die Bindung zur Cellulose ungünstiger. Diese räumliche Differenz spielt aber bei der Bildung von kristallisierten Molekülverbindungen mit Rohrzucker keine grössere Rolle. Eine andere Erklärung könnte in der starken Wasserstoffbrücke zwischen Ketogruppe und *o*-Aminogruppe im Kynurenin liegen. Die in der Literatur bisher beschriebenen, papierchromatographisch spaltbaren Aminosäuren sind, mit Ausnahme von Kynurenin und 3-Oxykynurenin, sämtlich aromatische β -Derivate des Alanins, nämlich verschiedene Dioxy-

phenylalanine, Tryptophan und Oxytryptophan. Kynurenin mit einer Wasserstoffbrücke könnte man auch als aromatisches Alaninderivat betrachten und es zeigt eine gewisse Ähnlichkeit mit Tryptophan:

Kynurenin

Tryptophan

Das eigentümliche ist, dass bei Kynurenin die D-Form, bei Tryptophan aber die L-Form vom Papier am stärksten adsorbiert wird.

EXPERIMENTELLER TEIL

D,L- γ -(*o*-Oxyphenyl)- α -aminobuttersäure. 2,05 g D,L-Desoxokynureninsulfat in 80 ml 0,07 N Schwefelsäure suspendiert und auf 0° abgekühlt, wurden mit etwas mehr als der für eine Aminogruppe berechneten Menge Natriumnitrit diazotiert (9 ml von einer 6,7 % Natriumnitritlösung). Nach beendeter Reaktion wurde die klare Lösung 15 Min. gekocht, wobei sie sich braun färbte und eine geringe Menge von einem braunen Niederschlag entstand, der abfiltriert wurde. Das rotbraune Filtrat wurde fünf mal mit Äther ausgeschüttelt, und die Wasserphase mit Kohle gekocht und filtriert. Das Filtrat, das sehr stark gelb gefärbt war, wurde durch Vacuumdestillation auf etwa 45 ml Volumen eingengt und tropfenweise mit konz. Ammoniak versetzt, wobei die D,L- γ -(*o*-Oxyphenyl)- α -aminobuttersäure ausfiel. Nach einmaliger Umkristallisation aus Wasser wogen die stäbchenförmigen Kristalle 0,67 g (49 % der Theorie). Die Aminosäure zeigte positive Ninhydrinreaktion und Blaufärbung mit Folin's Reagenz. Umkristallisation aus Wasser: Schmp.: 287–288° (Zersetz.). * (Gef.: C 61,14; H 6,81; N 7,36. Ber. für C₁₀H₁₃O₃N (195,2): C 61,53; H 6,71; N 7,18).

D- γ -(*o*-Oxyphenyl)- α -aminobuttersäure. 3,76 g D-Desoxokynureninsulfat wurden, entsprechend obiger Beschreibung, in D- γ -(*o*-Oxyphenyl)- α -aminobuttersäure übergeführt. Ausbeute: 1,68 g (67 % d.Th.). Stäbchen (aus Wasser), die positive Ninhydrin- und Folin's Reaktion gaben. Schmp.: 277–278° (Zersetz.). Optische Drehung in 1,0 N HCl, $[\alpha]_D^{20} = +26,4^\circ$ ($c = 0,492$, $l = 2$ dm).

L- γ -(*o*-Oxyphenyl)- α -aminobuttersäure. 2,41 g L-Desoxokynureninsulfat, wie oben behandelt, ergaben 0,91 g L- γ -(*o*-Oxyphenyl)- α -aminobuttersäure (57 % d.Th.). Schmp.: 277–279° (Zersetz.). Optische Drehung in 1,0 N HCl, $[\alpha]_D^{20} = -29,7^\circ$ ($c = 0,454$, $l = 2$ dm).

D,L- γ -(*o*-Oxyphenyl)- α -aminobuttersäure und Rohrzucker. 12,2 mg D,L- γ -(*o*-Oxyphenyl)- α -aminobuttersäure und 53,1 mg Rohrzucker wurden in 1 ml heissem Wasser gelöst, mit 17 ml abs. Alkohol versetzt, filtriert und bei +3° aufbewahrt. Nach 3 Tagen wurden die ausgeschiedenen Kristalle (rhombische Blättchen) abgesaugt. Positive Ninhydrinreaktion, negative Anthronreaktion und ein Schmelzpunkt von 283° (Zersetz.).

* Alle Schmelzpunkte sind bei schnellem Erhitzen und mit kurzem Thermometer gemessen.

zeigten, dass die Kristalle aus D,L- γ -(o-Oxyphenyl)- α -aminobuttersäure bestanden. In dem Filtrat schieden nach weiteren 3 Tagen Rohrzuckerkristalle aus.

Molekülverbindung zwischen D- γ -(o-Oxyphenyl)- α -aminobuttersäure und Rohrzucker. 25,0 mg D- γ -(o-Oxyphenyl)- α -aminobuttersäure und 108,4 mg Rohrzucker wurden in 2 ml heissem Wasser gelöst, mit 34 ml abs. Alkohol versetzt, filtriert und 17 Tage bei +3° aufbewahrt. Es kristallisierten allmählich rosettenförmig angeordnete Nadeln, die positive Ninhydrin- und Anthronreaktion ergaben. Ausbeute: 17,1 mg (25 % d.Th.). Schmp.: 193–194° (Zersetz.). Da die Molekülverbindung sich nicht ohne Zersetzung umkristallisieren liess, wurde sie ohne weitere Reinigung analysiert: (Gef.: N 2,63. Ber. für $C_{22}H_{25}O_{14}N$ (537,5): N 2,60).

Molekülverbindung zwischen L- γ -(o-Oxyphenyl)- α -aminobuttersäure und Rohrzucker. 24,8 mg L- γ -(o-Oxyphenyl)- α -aminobuttersäure und 108,3 mg Rohrzucker unter den gleichen Bedingungen behandelt wie oben für die D-Aminosäure und Rohrzucker beschrieben, ergaben 30,0 mg (44 % d.Th.) Molekülverbindung, bestehend aus nadelförmigen Kristallen, in Rosetten geordnet, die positive Ninhydrin- und Anthronreaktion gaben. Schmp.: 196–198° (Zersetz.). (Gef.: N 2,66. Ber. für $C_{22}H_{25}O_{14}N$ (537,5): N 2,60).

LITERATUR

1. Weichert, R. *Arkiv Kemi* **5** (1953) 523.
2. Weichert, R. *Arkiv Kemi* **5** (1953) 553.
3. Butenandt, A., Weidel, W., Weichert, R. und von Derjugin, W. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **279** (1943) 27.
4. Butenandt, A. und Weichert, R. *Ibid.* **281** (1944) 122.
5. Dimroth, O. und Bamberger, C. *Ann.* **438** (1924) 67.
6. Kotake, M., Sakan, T., Nakamura, N. und Senoh, S. *J. Am. Chem. Soc.* **73** (1951) 2973.
- Sensi, P. *Acta Vitaminol.* **5** (1951) 105.
- Dalgliesh, C. E. *J. Chem. Soc.* **1952** 137, 3940; *Biochem. J. (London)* **52** (1952) 3.
- Mason, M. und Berg, C. P. *J. Biol. Chem.* **195** (1952) 515.
- Closs, K. und Haug, C. M. *Chemistry & Industry* **1953** 103.
- Lambooy, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **76** (1954) 133.
- Miwa, T., Ohsuka, A. und Sakan, T. *J. Inst. Polytech. Osaka City Univ. Ser. C* **3** (1952) 47; *J. Chem. Soc. Japan, Pure Chem. Sect.* **74** (1953) 113; *Chem. Abstracts* **48** (1954) 3958c.

Eingegangen am 21. Juni 1954.