

DIE UMSETZUNG VON KETOHEXOSEN MIT SEKUNDÄREN AMINOSÄUREN UND SEKUNDÄREN AMINEN¹

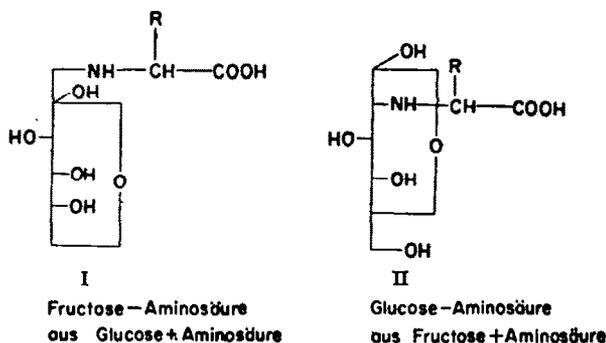
K. HEYNS, H. PAULSEN und H. SCHROEDER
Chemisches Staatsinstitut, Universität Hamburg,
Institut für Organische Chemie

(Received 16 November 1960)

Zusammenfassung—Die Umsetzung von D-Fructose mit L-Prolin liefert 2-Desoxy-2-N-L-prolino-D-glucose neben 2-Desoxy-2-N-L-prolino-D-mannose und 1-Desoxy-1-N-L-prolino-D-fructose, die auch durch direkte Reaktion von D-Glucose mit L-Prolin erhältlich ist. Die Umsetzung von L-Sorbose mit L-Prolin liefert 1-Amino-1-N-L-prolino-L-sorbose und nur sehr wenig Reaktionsprodukte der Ketosylamin-Umlagerung.

Durch Einwirkung von Piperidin wird D-Fructose in hohem Masse zu D-Glucose, durch Morpholin, Dicyclohexylamin und andere Amine zu D-Psicose isomerisiert. Diese Reaktion ist zur präparativen Darstellung von D-Psicose geeignet.

BEI der Umsetzung von Hexosen mit Aminosäuren lassen sich zwei unterschiedliche Reaktionstypen unterscheiden. Aldosen reagieren mit Aminosäuren primär zu N-Glycosiden, den äusserst labilen Aldosylaminosäuren, die sehr leicht unter dem katalytischen Einfluss der in der Aminosäure vorhandenen Carboxylgruppe einer Amadori-Umlagerung (Aldosylamin-Umlagerung) unterliegen, wobei Verbindungen vom Typ I gebildet werden.²⁻⁴ Aus D-Glucose und L-Alanin entsteht auf diesem Wege 1-Desoxy-1-N-L-alanino-D-fructose (I, R = CH₃), welche abgekürzt als Fructose-L-alanin bezeichnet wird. Eine Reihe derartiger "Fructose-Aminosäuren" einer grossen Zahl von Aminosäuren ist dargestellt worden.^{2,3}



Ketosen reagieren gleichfalls mit Aminosäuren unter intermediärer Bildung von N-Glycosiden, die mittels Säurekatalyse auf dem Wege einer analogen Ketosylamin-Umlagerung zu Verbindungen vom Typ II umlagern. So entsteht aus D-Fructose und

¹ Vorhergehende Mitt. K. Heyns und M. Rolle, *Chem. Ber.* **92**, 2439, 2451 (1959).

² A. Abrams, P. H. Lowy und H. Borsook, *J. Amer. Chem. Soc.* **77**, 4794 (1955); P. H. Lowy und H. Borsook, *Ibid.* **78**, 3175 (1956); A. Klemer und F. Micheel, *Chem. Ber.* **89**, 1242 (1956); F. Micheel und A. Frowein, *Ibid.* **92**, 304 (1959).

³ K. Heyns und H. Paulsen, *Liebigs Ann.* **622**, 160 (1959).

⁴ E. F. L. J. Anet, *Austr. J. Chem.* **10**, 193 (1957); E. F. L. J. Anet und T. M. Reynolds, *Ibid.* **10**, 182 (1957).

L-Alanin 2-Desoxy-2-N-L-alanino-D-glucose II ($R = CH_3$), abgekürzt "Glucose-L-alanin". Auch hier sind mehrere Vertreter dieser "Glucose-Aminosäuren" dargestellt worden.^{1,5} Die Ketosylamin-Umlagerung, die von Heyns und Koch⁶ an der Umsetzung von D-Fructose mit Ammoniak unter Bildung von D-Glucosamin im Jahre 1952 aufgefunden wurde, ist im Gegensatz zur Aldosylamin-Umlagerung mit der Ausbildung eines neuen Asymmetriezentrums verbunden, das am C-Atom 2 gebildet werden kann. Aus diesem Grunde werden neben den Glucose-Aminosäuren je nach den Reaktionsbedingungen in wechselnden Mengen Mannose-Aminosäuren erhalten. Beide Reaktionstypen haben sich bisher mit einer grossen Anzahl verschiedenster Aminosäuren, die eine primäre Aminogruppe aufweisen, an einer Reihe von Aldosen und Ketosen durchführen lassen. Diese Umsetzungen stellen den wichtigen Primärschritt für die als Maillard-Reaktion bezeichneten nichtenzymatischen Bräunungsreaktionen dar.⁷ Bezüglich Entstehung bzw. Vorhandenseins von Hexose-Aminosäuren in Leberextrakten sei auf unsere letzte Mitteilung hierüber verwiesen.³

Umsetzung von D-Fructose mit L-Prolin

In der vorliegenden Untersuchung werden die Reaktionen von Fructose mit sekundären Aminen und sekundären Aminosäuren behandelt. Glucose lässt sich mit sekundären Aminen umsetzen, wie bereits Hodge und Rist⁸ gezeigt haben. Sie erhielten mit Piperidin das entsprechende N-Glucosid, welches unter Amadori-Umlagerung in 1-Desoxy-1-piperidino-D-fructose überführbar war. Diese Versuche zeigen, dass als Ausgangsprodukte der Amadori-Umlagerung stets die N-Glycoside angesehen werden müssen und kaum offene Formen nach Art der Schiff'schen Basen. Auch mit aromatischen sekundären Aminen und 4,6-Benzalglucose ist nach Weygand *et al.*⁹ eine Umlagerung zu 1-Desoxy-1-Amino-D-fructose-Verbindungen möglich.

N-Glucoside von sekundären Aminen sind allgemein leichter spaltbar als entsprechende Verbindungen von primären Aminen und lassen sich schwieriger umlagern. Dies zeigte sich erwartungsgemäss bei der Umsetzung von L-Prolin mit Fructose, deren N-Fructoside wiederum leichter als N-Glucoside spaltbar sind. L-Prolin setzt sich wesentlich schwieriger um als alle vorher untersuchten Aminosäuren mit primärer Aminogruppe.^{1,5} Unter extrem wasserfreien Bedingungen wurde in Methanol ein Gemisch von 3 Hexoseaminosäuren in einer Gesamtausbeute von nur etwa 10% erhalten. Die Bildung des primär unter Wasserabspaltung entstehenden leicht spaltbaren N-Fructosyl-L-prolin (IV) führt offenbar zu einem Gleichgewicht, welches sehr zu Ungunsten des N-Fructosids liegt. Eine Ketosylamin-Umlagerung findet, wie bei den anderen Aminosäuren, ohne Säurezusatz statt, da bereits die Carboxylgruppe des Prolins die Umlagerung katalysiert.

Als störende Nebenreaktion tritt eine vielfältige Aufspaltung des L-Prolins auf. L-Prolin, welches unter vergleichbaren Bedingungen äusserst stabil ist, erleidet bei Gegenwart von Fructose sowohl in Methanol, Dimethylsulfoxyd und Wasser eine Reihe noch nicht aufgeklärter Umwandlungs- und Zersetzungsreaktionen. So treten

⁵ K. Heyns, H. Breuer und H. Paulsen, *Chem. Ber.* **90**, 1374 (1957); K. Heyns und H. Breuer, *Ibid.* **91**, 2750 (1958).

⁶ K. Heyns und W. Koch, *Z. Naturf.* **7b**, 486 (1952).

⁷ K. Heyns und H. Paulsen, *Wissenschaftl. Veröffentlichungen der Deutschen Gesellschaft für Ernährung* Bd. 5, 15. Steinkopff-Verlag, Darmstadt (1960).

⁸ J. E. Hodge und C. E. Rist, *J. Amer. Chem. Soc.* **75**, 316 (1953).

⁹ F. Weygand, H. Simon und R. v. Ardenne, *Chem. Ber.* **92**, 3117 (1959).

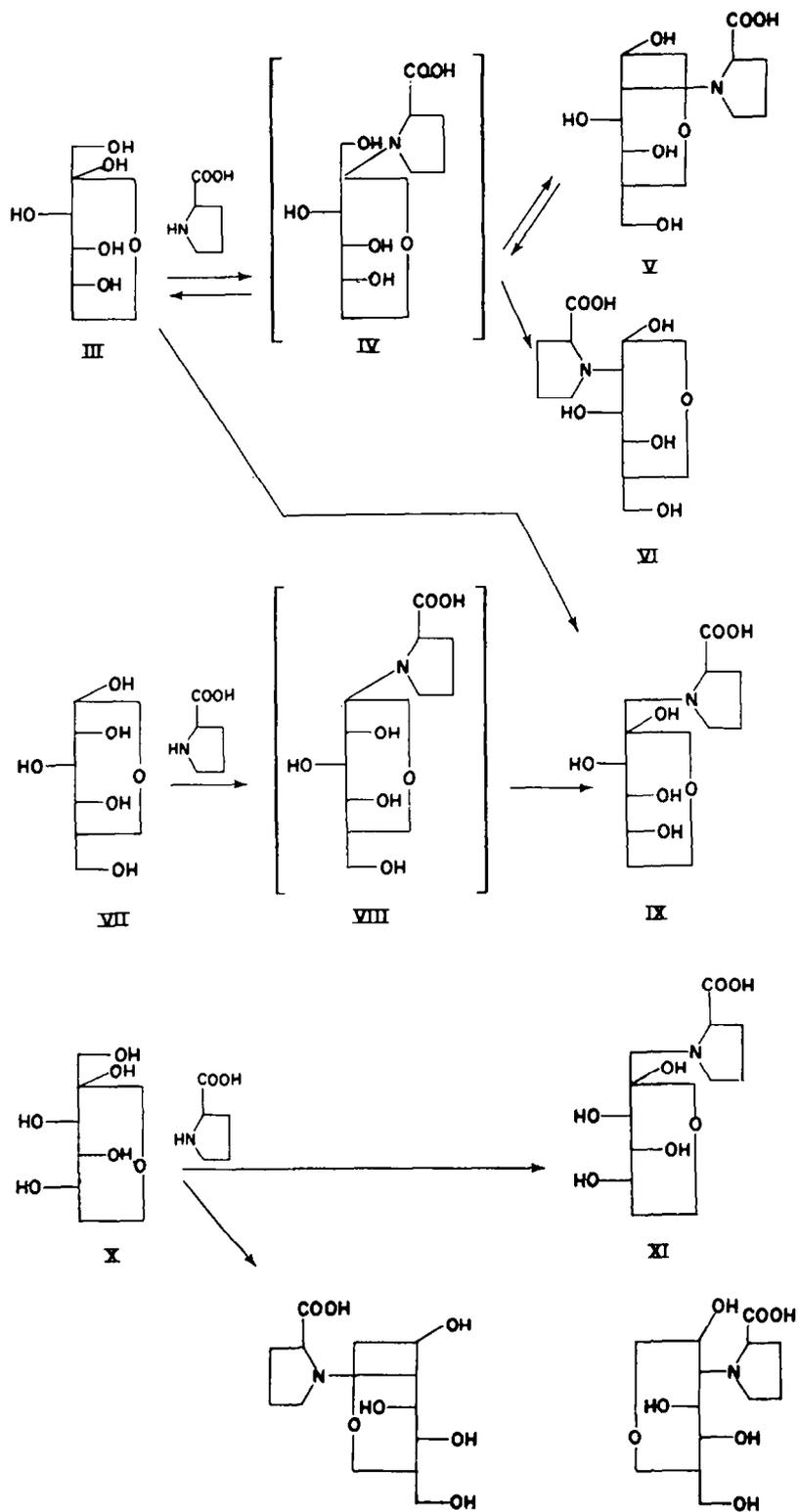
auch unter mildesten Bedingungen (37°) bei der Einwirkung von Fructose auf L-Prolin in kurzer Zeit vier neue Ninhydrin-positive (drei blau anfärbbar, eine gelb anfärbbar) Substanzen auf, deren Anzahl bei längerer Einwirkungszeit sich noch vermehrt. Diese Zersetzungsreaktion tritt ausschliesslich nur mit Fructose auf. Gegenüber anderen Zuckern, wie D-Glucose und L-Sorbose, ist L-Prolin stabil.

Die durch Ketosylamin-Umlagerung entstandenen Hexose-Aminosäuren wurden mittels saurem Austauscher abgetrennt und an Austauschersäulen mehrfach fraktioniert. Es wurden zwei einheitliche kristallisierte Verbindungen erhalten, die sich als 2-Desoxy-2-N-prolino-D-glucose (D-Glucose-L-prolin, V) und 1-Desoxy-1-N-L-prolino-D-fructose (D-Fructose-L-prolin, IX) erwiesen. Die zu erwartende dritte, nur in geringer Menge gebildete Substanz, das D-Mannose-L-prolin (VI), liess sich nicht völlig rein erhalten. Das ungefähre Mengenverhältnis der drei entstandenen Hexose-Aminosäuren beträgt: D-Glucose-L-prolin 30–40%, D-Mannose-L-prolin 5–10%, D-Fructose-L-prolin 40–60%. Alle drei Substanzen sind papierchromatographisch trennbar. Die Glucose- und Mannose-Verbindungen geben mit Silbernitrat einen hellbraunen, die Fructose-Verbindungen den für Amadori-Verbindungen typischen schwarzbraunen Fleck. D-Glucose-L-Prolin wird entgegen den bisherigen Erfahrungen bei anderen Glucose-Aminosäuren nicht als erste, sondern als letzte Substanz bei der Säulenchromatographie an saurem Austauscher eluiert.⁵

D-Glucose-L-prolin (V) liess sich auf Grund der optischen Drehung in seiner Konfiguration zuordnen. Die Substanz besitzt eine optische Drehung von $[\alpha]_D^{20} + 2^\circ$, welche erheblich niedriger als die der anderen Glucose-Aminosäuren liegt, die einen Drehwert zwischen $[\alpha]_D^{20} + 48^\circ$ bis $+81^\circ$ aufweisen. Die niedrige optische Drehung ist offenbar durch den hohen negativen Drehwertanteil des L-Prolins von $[\alpha]_D^{20} - 85^\circ$ bedingt, welcher additiv den positiven Anteil der Kohlenhydratgruppe überlagert. Durch Anwendung der Regel von Bosc und Chatterjee¹⁰ lässt sich folgern, dass Mannose-Aminosäuren gegenüber Glucose-Aminosäuren stets eine negativere optische Drehung haben müssen. Dies ist bei den bisher dargestellten Mannose-Aminosäuren, welche einen Drehwert zwischen $[\alpha]_D^{20} - 7^\circ$ bis -16° besitzen, stets bestätigt gefunden. Die weitgehend angereicherten Fraktionen des sirupös erhaltenen D-Fructose-L-prolin (IX) waren, zeigten gleichfalls eine negative optische Drehung von $[\alpha]_D^{20} - 25^\circ$. Damit ist erwiesen, dass die kristallisierte Substanz eine D-Glucose-, die als Sirup erhaltene Substanz eine D-Manno-Konfiguration besitzt. D-Glucose-L-prolin zeigt beim Auflösen in H₂O eine dextrorotäre Mutarotation. Die Verbindung liegt in kristallisierter Form demnach in der β -Konfiguration vor. Alle anderen Glucose-Aminosäuren kristallisierten in der α -Form.

Überraschend ist der mengenmässig hohe Anteil des aus Fructose und L-Prolin gebildeten D-Fructose-L-prolins (IX), welches bei der Umsetzung von Fructose mit Prolin über die Ketosylamin-Umlagerung nicht zu erwarten ist. Wir haben die gleiche Substanz auf anderem Wege durch direkte Umsetzung von D-Glucose mit L-Prolin, also über die Aldosylamin-Umlagerung, erhalten. Glucose (VII) setzte sich in Methanol bei 60° sehr schnell und in hoher Ausbeute mit L-Prolin um, wobei unter Amadori-Umlagerung des intermediär gebildeten Glucosyl-L-prolins (VIII) D-Fructose-L-prolin (IX) entsteht, welches leicht in kristalliner Form isoliert werden konnte. Die Verbindung zeigt die charakteristischen Reduktionsreaktionen für Amadori-Verbindungen

¹⁰ A. K. Bose und B. G. Chatterjee, *J. Org. Chem.* **23**, 1425 (1958).



und ist in allen Eigenschaften identisch mit der auch aus Fructose und L-Prolin erhaltenen zweiten kristallinen Hexose-Aminosäure.

D-Glucose-L-prolin (V) ist in stark saurer Lösung stabil. In schwach saurer Lösung erfolgt verhältnismässig leicht eine Rückumlagerung⁶ zum N-Fructosid (IV), welches sofort in die Ausgangskomponenten gespalten wird. So wird durch Erhitzen von D-Glucose-L-prolin (V) in verdünnter Essigsäure Prolin, Fructose und Hydroxymethylfurfurol erhalten. Diese Rückspaltung erfolgt bei p_H 4,2 bereits bei Zimmertemperatur in einigen Tagen. Sie steht in gewisser Analogie zu der von Anet¹¹ aufgefundenen Rückspaltung von Di-D-fructose-glycin, einer Verbindung, die gleichfalls ein tertiäres Stickstoffatom am Kohlenhydratrest besitzt. Bei p_H 5,5 in wässriger Lösung bei Zimmertemperatur erleidet sie eine Rückspaltung in D-Fructose-glycin und 3-Desoxy-D-erythrohexoson, einer Verbindung, die sich leicht in saurer Lösung in Hydroxymethylfurfurol umwandeln kann. Glucose tritt als Spaltprodukt dieser Reaktion, wie bei jeder Rückspaltung von Fructose-Aminosäuren,⁷ nicht auf. Auch die Rückspaltung von D-Fructose-L-prolin in verdünnter Essigsäure liefert nur L-Prolin und Hydroxymethylfurfurol.

Als weitere Ketose haben wir L-Sorbose (X) mit L-Prolin umgesetzt. Die Reaktion gelingt nur in extrem wasserfreiem Dimethylsulfoxid und führt zu zwei Hexose-Aminosäuren. Die Säulenauftrennung lieferte in weitaus grösster Menge als Hauptprodukt nicht die durch Ketosylamin-Umlagerung entstehenden Verbindungen, sondern kristallisiertes L-Sorbose-L-prolin (XI), welches normalerweise durch Amadori-Umlagerung aus L-Gulose oder L-Idose mit L-Prolin entstehen sollte. Die Verbindung reagiert als Amadori-Verbindung positiv mit alkalischer $K_3[Fe(CN)_6]$ -Lösung, ihre Spaltung mit verdünnter Essigsäure liefert nur L-Prolin und Hydroxymethylfurfurol und keine L-Sorbose, die aus einer Aldose-Aminosäure zu erwarten ist. Aus den Mutterlaugen wurde eine amorphe Substanz erhalten, die ein Gemisch aus L-Sorbose-L-prolin und einer erwartungsgemäss durch Ketosylamin-Umlagerung entstandene Aldose-Aminosäure darstellt. Die Rückspaltung dieser Substanz mit verdünnter Essigsäure liefert neben L-Prolin und Hydroxymethylfurfurol auch L-Sorbose, was einwandfrei für das Vorliegen einer Aldose-Aminosäure spricht. Es handelt sich vermutlich um L-Gulose-L-prolin (XII) und nicht L-Idose-L-prolin (XIII), da nach unseren Erfahrungen bei der Umsetzung von L-Sorbose mit Glycin bevorzugt L-Gulose-glycin gebildet wird.

L-Hydroxyprolin liess sich weder mit Fructose noch mit Sorbose zu den entsprechenden Hexose-Aminosäuren umsetzen. Dies Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen bei aliphatischen Aminosäuren überein. Auch dort reagieren Oxyaminosäuren z.B. L-Serin, schwieriger als L-Alanin.⁵

In den IR-Spektren von D-Glucose-L-prolin, D-Fructose-L-prolin und L-Sorbose-L-prolin lassen sich keine Carbonylbanden nachweisen. Es liegen demnach auch die Ketose-L-prolin-Verbindungen in cyclischer Halbacetallform vor. Sie stimmen in ihrer Struktur durchaus mit anderen Ketose-Aminosäuren und mit 1-Desoxy-piperidino-D-fructose überein. Offenkettige Amadori-Verbindungen mit sekundären Aminen liegen vor in den 1-Desoxy-(1-methylaryl-amino)D-fructosen.⁹ Ebenfalls offenkettig sind nach Heyns und Schulz¹² die Fructuron-Aminosäuren.

Die Bildung von D-Glucose-L-prolin (V) und D-Mannose-L-prolin (VI) aus Fructose

¹¹ E. F. L. J. Anet, *Austr. J. Chem.* **12**, 280 (1959); *J. Amer. Chem. Soc.* **82**, 1502 (1960).

¹² K. Heyns und W. Schulz, *Chem. Ber.* **93**, 128 (1960).

(III) und L-Prolin verläuft über ein intermediär gebildetes N-Fructosid (IV), welches eine normale Ketosylamin-Umlagerung eingeht. Das Mengenverhältnis von V und VI wird offenbar durch sterische Effekte bestimmt, da es durch Variation des Lösungsmittels nicht wesentlich zu beeinflussen ist. Das Kalotten-Modell lässt erkennen, dass axial-ständiges Prolin im D-Mannose-L-prolin (VI) stärker behindert ist, als äquatorial-ständiges Prolin im D-Glucose-L-prolin (V), so dass das Mengenverhältnis der Umlagerungsprodukte zu Gunsten der letzteren Verbindung verschoben sein dürfte, wie es auch gefunden wurde.

Schwieriger ist die Bildung von D-Fructose-L-prolin (IX) aus Fructose und L-Prolin zu erklären, da diese Verbindung normalerweise nur aus Glucose (VII) und L-Prolin über eine Amadori-Umlagerung des entsprechenden N-Glucosids (VIII) entstehen kann. In früheren Modellversuchen an entständigen Ketolen mit der Gruppierung $R-CO-CH_2OH$ konnten wir zeigen,¹³ dass diese Verbindungen mit Aminen in der Regel aus der Form ihrer isomeren Hydroxyaldehyde unter anschliessender Umlagerung zu ω -Aminoketonen und nicht zu α -Aminoaldehyden reagieren. Es setzen sich hierbei die im Gleichgewicht vorhandenen geringen Hydroxyaldehydanteile infolge ihrer höheren Reaktivität in Richtung zum ω -Aminoketon um. Da bekanntlich ein sehr geringer Anteil der offenen Form der Fructose stets im Gleichgewicht mit der Halbacetalform vorliegt, wäre eine Konkurrenzreaktion der offenen Fructose im Sinne der obigen Modellversuche zu diskutieren, die dann zu Fructose-Aminosäuren führen müsste. Glucose liess sich allerdings in derartigen Reaktionslösungen im Sinne eines vorgelagerten Gleichgewichts- oder Umlagerungsproduktes niemals nachweisen. Als zweiter Mechanismus der Fructose-L-prolin-Bildung wäre eine Sekundärreaktion von Glucose-L-Prolin mit überschüssigem L-Prolin in Betracht zu ziehen. Glucose-L-prolin kann mit L-Prolin, wie wir fanden, am C-Atom 1 zu einem N-Glycosid reagieren, welches einer Amadori-Umlagerung zu einem Umlagerungsprodukt unterliegt, dessen Spaltung dann Fructose-L-prolin liefert. So lässt sich beim Erhitzen von Glucose-L-prolin in Methanol mit L-Prolin die Bildung von Fructose-L-prolin, beim Erhitzen mit L-Valin gewissermassen im Kreuzversuch die Bildung von Fructose-L-Valin nachweisen. Ein derartiger Reaktionsverlauf lässt sich auch bei anderen Glucose-Aminosäuren zeigen, z.B. gibt Glucose-L-Valin durch Umsetzung mit L-Valin Fructose-L-Valin. Über das Ausmass beider nebeneinander verlaufenden Reaktionswege können nur quantitative Untersuchungen Aufschluss geben.

Das Verhältnis der entstehenden Glucose- und Fructose-Aminosäuren ist durch die Bildungsgeschwindigkeit der Glucose-Aminosäuren bestimmt. Werden diese sehr rasch gebildet, so wird die angebotene Aminosäure schnell zur Glucose-Aminosäure umgesetzt und Nebenreaktionen treten kaum ein. Dies entspricht in der Tat den Beobachtungen. Mit ω -ständigen Aminosäuren, wie z.B. β -Alanin, γ -Aminobuttersäure und ϵ -Aminocaprinsäure, lässt sich die Ketosylamin-Umlagerung sehr leicht bereits bei Zimmertemperatur durchführen. Die Konkurrenzreaktion kommt hier kaum zum Tragen und es werden nur untergeordnete Mengen von Fructose-Aminosäure neben Aldose-Aminosäuren gefunden. Je grösser der Rest der Seitenkette bei einer α -Aminosäure ist, desto mehr wird die Ketosylamin-Umlagerung erschwert. Dies ist bei L-Valin, insbesondere aber bei L-Phenylalanin, L-Asparaginsäure und L-Glutaminsäure der Fall. Diese Aminosäuren liefern daher bei der Reaktion mit Fructose neben Aldose-Aminosäuren einen beträchtlichen Anteil an Fructose-Aminosäuren. Bei der

¹³ K. Heyns und W. Stumme, *Chem. Ber.* **89**, 2833, 2844 (1956).

Umsetzung mit Prolin ist durch die sekundäre Aminogruppe die Ketosylamin-Umlagerung weiterhin erschwert, wodurch sich die durch Nebenreaktion gebildete Menge an Fructose-Aminosäure auf über die Hälfte der gesamten Reaktionsprodukte erhöht.

Mit Sorbose lässt sich, wie wir von den Umsetzungen mit Ammoniak wissen,¹⁴ die Ketosylamin-Umlagerung erheblich schwerer durchführen als mit Fructose. Bei der Reaktion von Sorbose mit L-Prolin wird demnach die Ketosylamin-Umlagerung zusätzlich von der Kohlenhydratkomponente her erschwert. Dies hat zur Folge, dass die Nebenreaktion zur Ketose-Aminosäure zur Hauptreaktion wird und in überwiegender Menge L-Sorbose-L-prolin neben nur wenig Aldose-L-prolin erhalten wird.

Reaktion von Fructose mit sekundären Aminen

Nach Heyns u. Mitarbeitern und Carson^{15,16} reagieren primäre Amine bei 0° glatt mit Fructose, wobei unter Ketosylamin-Umlagerung der primär gebildeten N-Fructoside N-substituierte Derivate des Glucosamins entstehen. Mit sekundären Aminen konnten wir unter vergleichsweisen Bedingungen mit Fructose keine Reaktion feststellen.

Bei erhöhten Temperaturen (40–60°) liess sich durch Umsetzung von Fructose mit Piperidin ein sirupöses, durch Säure leicht spaltbares N-Glycosid gewinnen. Dieses konnte mit Essigsäure als Katalysator in guter Ausbeute zu einem säurestabilen Amino-zuckergemisch umgelagert werden, das im wesentlichen aus zwei Substanzen bestand, von denen die eine Komponente in weitaus grösserer Menge gebildet worden war. Die Reaktionslösung enthielt neben Fructose in grossen Mengen durch Lobry de Bruyn-van Ekenstein-Umlagerung unter dem Einfluss des stark basischen Piperidins entstandene Glucose.

Das mittels Austauschersäulenfraktionierung abgetrennte Hauptprodukt erwies sich als identisch mit der von Hodge und Rist⁸ beschriebenen 1-Desoxy-1-piperidino-D-fructose. Das zweite Produkt, vermutlich das erwartete durch Ketosylamin-Umlagerung gebildete Derivat des Glucosamins, erwies sich als recht empfindlich. Es zersetzte sich beim Stehen und konnte nicht in reiner Form erhalten werden. Bei der Umsetzung von Fructose mit Piperidin erfolgt demnach bevorzugt eine Isomerisierung zwischen C-Atom 2 und 1 zu Glucose, die dann unter Amadori-Umlagerung weiterreagiert. Die Bildung von Glucosamin-Derivaten über eine Ketosylamin-Umlagerung erfolgt nur in untergeordnetem Masse.

Bei der Umsetzung von Fructose mit Piperidin konnten wir als Nebenprodukte zwei Reductone erhalten: Ein im Hochvakuum sublimierbares, extrem hygroskopisches zersetzliches Reducton und ein kristallisiertes stabiles Reducton, welches mit dem kürzlich von Weygand und Hodge¹⁷ in seiner Struktur aufgeklärten Piperidino-hexose-reducton (N-[1-Methyl-1,2,3-trihydroxy-cyclopenten(2)yliden-(4)]piperidini-umbetain) identisch ist. Die Bildung dieses Reductons dürfte demnach nicht aus Fructose direkt geschehen, sondern aus der durch primäre Umlagerung entstandenen Glucose über die 1-Desoxy-1-piperidino-D-fructose.

Wir haben ferner Fructose unter verschiedenen Reaktionsbedingungen mit

¹⁴ K. Heyns, H. Paulsen, R. Eichstedt und M. Rolle, *Chem. Ber.* **90**, 2039 (1957).

¹⁵ J. F. Carson, *J. Amer. Chem. Soc.* **77**, 1881, 5957 (1955); **78**, 3728 (1956).

¹⁶ K. Heyns, R. Eichstedt und K. H. Meinecke, *Chem. Ber.* **88**, 1551 (1955).

¹⁷ F. Weygand, H. Simon, W. Bitterlich, J. E. Hodge und B. E. Fisher, *Tetrahedron* **6**, 123 (1959).

Morpholin, Äthyl-n-butylamin, Di-n-butylamin, Dicyclohexylamin und Dibenzylamin behandelt, und konnten in keinem Fall Aminozyucker als Umlagerungsprodukte nachweisen. In den Reaktionslösungen war Glucose, die bei der Umsetzung mit Piperidin das Hauptisomerisierungsprodukt darstellt, nur in geringer Menge vorhanden. Dagegen trat in allen Ansätzen D-Psicose als wesentliches Isomerisierungsprodukt der Fructose auf. Besonders bei der Umsetzung von Fructose mit Dicyclohexylamin und Morpholin waren etwa 20–25% der Fructose zu D-Psicose umgelagert.

Aus Ansätzen mit Dicyclohexylamin erhielten wir nach Abtrennung desamins und Entfernung der überschüssigen Fructose durch Gärung mit Hefe einen stark angereicherten Sirup von D-Psicose, der nur geringe Mengen an Sorbose enthält. Wir haben die D-Psicose in die gut kristallisierende Diisopropyliden-D-psicose überführt, welche gegenüber der von Steiger und Reichstein¹⁸ beschriebenen entsprechenden Verbindung der L-Psicose den gleichen Schmelzpunkt und die gleiche Drehung in umgekehrter Richtung zeigt. Fructose erfährt demnach mit Dicyclohexylamin, Morpholin und anderen Aminen eine Isomerisierung zwischen C-Atom 2 und 3 zu D-Psicose. Das Verfahren kann zur einfachen Gewinnung von D-Psicose benutzt werden. D-Psicose ist neuerdings als Baustein des anti-bakteriell und anti-carcinogen wirksamen Antibiotikums 6-Amino-9-D-psicofuranopurins erkannt worden.¹⁹

Mit tertiären Aminen, wie Triäthylamin, in denen Fructose nur sehr wenig löslich ist, wird Fructose zu D-Psicose isomerisiert wie mit sekundären Aminen, jedoch in geringerem Ausmass. Schwach basische aromatische tertiäre Amine wie Pyridin sind auf Fructose und Sorbose ohne Einfluss.

EXPERIMENTELLER TEIL

D-Glucose-L-prolin (V). 64 g getrocknete D-Fructose und 7.4 g wasserfreies L-Prolin werden in 600 ml frisch absolutiertem Methanol unter Feuchtigkeitsausschluss bei 50° gelöst. Die Lösung wird 8 Std bei 60° gehalten. Es empfiehlt sich, die Reaktion papierchromatographisch zu verfolgen. Die Reaktion soll abgebrochen werden, wenn eine Maximalmenge an reduzierenden mit AgNO₃ anfärbaren Hexose-Aminosäuren entstanden ist, aber die gleichzeitig fortschreitende Zersetzung des Prolins in Grenzen bleibt. Es sollen sich nicht mehr als 4 Ninhydrin-anfärbbare neue Aminosäuren gebildet haben, da sonst die spätere Trennung sehr schwierig ist. Wenn die Entwicklung der Chromatogramme erst abgewartet werden muss, kann die Reaktion durch Abkühlen auf –20° gestoppt und nach Auswertung der Chromatogramme durch Erwärmen fortgesetzt werden.

Das Methanol wird i. Vak. bei 40° entfernt und die Substanz auf eine Säule Lewatit S 100 H⁺-Form (32 × 450 mm) aufgetragen und die überschüssige Fructose durch Waschen mit 2 l Wasser entfernt. Es wird mit 0.25 n Trichloressigsäure (abgekürzt TCE) eluiert und in 10 ml Fraktionen aufgefangen. Frakt. 48–260 enthalten reduzierende Stoffe und werden vereinigt. Sie enthalten alle gleichzeitig Ninhydrin-positive Stoffe und ab Frakt. 72 L-Prolin. Die TCE wird im Perforator mit Äther entfernt und die Lösung i. Vak. eingeengt. Zur völligen Entfernung der TCE mit Äther ist es zu empfehlen, die Perforation zu wiederholen, wenn die Lösung auf ein kleineres Volum eingeengt ist.

Zur weiteren Entfernung der Ninhydrin-positiven Substanzen wird die Substanz auf eine Säule Dowex 50 × 8 (200–400 mesh) H⁺-Form (32 × 42 mm) gegeben, mit 300 ml Wasser gewaschen und mit 0.25 n TCE eluiert. Frakt. 50–76 enthalten alle reduzierende Substanz mit wenig Ninhydrin-positiven Aminosäuren. Sie werden vereinigt, die TCE mit Äther entfernt, i. Vak. eingeengt, ergibt 2.4 g Sirup. Dieser wird auf eine Säule Dowex 50 × 8 (200–400 mesh) H⁺-Form (32 × 300 m) gegeben, mit 0.25 n TCE eluiert und in 10 ml Frakt. gesammelt. Frakt 33–52 enthalten reduzierende Substanz und sind frei von Ninhydrin-positiven Stoffen. Ein kleiner Vor- und Nachlauf mit Ninhydrin-positiven Substanzen wird verworfen. Frakt 36–41 werden vereinigt zu Frakt. A (800 mg

¹⁸ M. Steiger und T. Reichstein, *Helv. Chim. Acta* **18**, 790 (1935).

¹⁹ T. E. Eble, H. Hoeksema und G. A. Boyak, *J. Amer. Chem. Soc.* **81**, 1767 (1959).

Sirup), Frakt 42–48 ergeben Frakt B (620 mg Sirup, jeweils nach Abtrennen der TCE mit Äther und Einengen).

Die papierchromatographische Untersuchung der Trennungen im Fließmittel Bu-Ä-W ergibt, dass vom sauren Austauscher die Zuckeraminosäuren in folgender Reihenfolge eluiert werden: D-Mannose-L-Prolin, D-Fructose-L-Prolin, D-Glucose-L-Prolin. Jedoch treten von allen Substanzen weite Überlappungszonen auf, so dass eine mehrfache Säulentrennung erforderlich ist, s. Abb. 1.

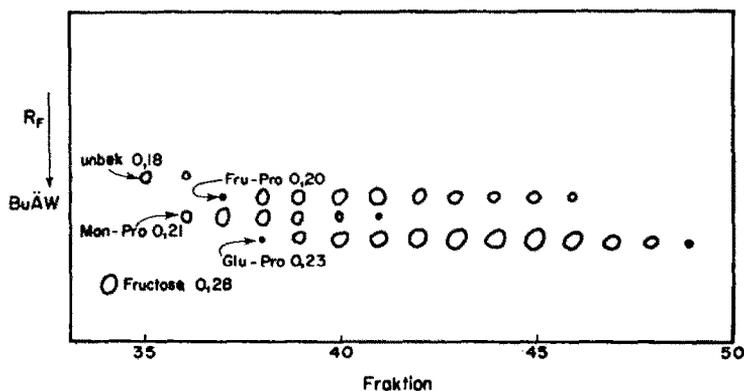


ABB. 1. Es ergibt sich folgendes Trennungsschema

Frakt. A	<table border="0"> <tr><td>A₁ enthält 130 mg</td><td>-----</td><td>-----</td></tr> <tr><td>A₂ enthält 250 mg</td><td>liefert 80 mg Krist. Glu-Prol.</td><td></td></tr> <tr><td>A₃ enthält 170 mg</td><td>liefert 80 mg Krist. Glu-Prol.</td><td></td></tr> <tr><td>A₄ enthält 70 mg</td><td>-----</td><td>-----</td></tr> </table>	A ₁ enthält 130 mg	-----	-----	A ₂ enthält 250 mg	liefert 80 mg Krist. Glu-Prol.		A ₃ enthält 170 mg	liefert 80 mg Krist. Glu-Prol.		A ₄ enthält 70 mg	-----	-----	Frakt. D. enth. Man.-Prol.
A ₁ enthält 130 mg	-----	-----												
A ₂ enthält 250 mg	liefert 80 mg Krist. Glu-Prol.													
A ₃ enthält 170 mg	liefert 80 mg Krist. Glu-Prol.													
A ₄ enthält 70 mg	-----	-----												
Frakt. B	<table border="0"> <tr><td>B₁ enthält 90 mg</td><td>liefert 30 mg Krist. Glu-Prol</td><td></td></tr> <tr><td>B₂ enthält 100 mg</td><td>liefert 100 mg Krist. Glu-Prol</td><td></td></tr> <tr><td>B₃ enthält 60 mg</td><td>liefert 30 mg Krist. Glu-Prol</td><td></td></tr> </table>	B ₁ enthält 90 mg	liefert 30 mg Krist. Glu-Prol		B ₂ enthält 100 mg	liefert 100 mg Krist. Glu-Prol		B ₃ enthält 60 mg	liefert 30 mg Krist. Glu-Prol		Frakt. C			
B ₁ enthält 90 mg	liefert 30 mg Krist. Glu-Prol													
B ₂ enthält 100 mg	liefert 100 mg Krist. Glu-Prol													
B ₃ enthält 60 mg	liefert 30 mg Krist. Glu-Prol													
		<table border="0"> <tr><td>C₁</td><td>{ 180 mg liefert</td></tr> <tr><td>C₂</td><td>{ 80 mg Krist Fru.-Prol</td></tr> <tr><td></td><td>{ 70 mg</td></tr> </table>	C ₁	{ 180 mg liefert	C ₂	{ 80 mg Krist Fru.-Prol		{ 70 mg						
C ₁	{ 180 mg liefert													
C ₂	{ 80 mg Krist Fru.-Prol													
	{ 70 mg													

Frakt A wird auf eine Säule Dowex 50 × 8 (200–400 mesh) H⁺-Form (18 × 460 mm) gegeben, mit 0·2 n TCE eluiert und nach den Papierchromatogrammen der Einzelfractionen in 4 Fractionen A₁ bis A₄ zusammengefasst, von denen die ersten beiden Mannose-, Fructose- und Glucose-Prolin, die letzten beiden Fructose- und Glucose-Prolin enthalten. Frakt B wird gleichfalls an Dowex 50 × 8 (200–400 mesh) H⁺-Form (18 × 180 mm) mit 0·2 n TCE fraktioniert. Es werden 3 Fractionen B₁ bis B₃ gebildet, die wechselnde Mengen Fructose- und Glucose-Prolin enthalten.

Die reinste Fraktion B₃ wird nach Abtrennen der TCE und Einengen zum möglichst trockenen Sirup in Methanol aufgenommen und mit absolutem Äther umgefällt. Nach Wiederaufnehmen in Methanol kristallisiert D-Glucose-L-Prolin aus. Die Reinigung durch Umfällen mit Methanol-Äther wird gleichfalls mit den anderen Fractionen durchgeführt und diese mit den erhaltenen Kristallen angeimpft. Es werden insgesamt 320 mg reine krist. Substanz erhalten. Umkristallisieren erfolgt durch Lösen in 40 ml warmen Methanol mit einigen Tropfen Wasser, Einengen dieser Lösung auf die Hälfte und Kristallisieren im Eisschrank. Die Mutterlauge der Kristalle wird mit 40 ml Methanol verdünnt und die Lösung auf 20 ml eingengt, worauf im Eisschrank unter Wiederholung dieser Operation weitere Fractionen zu gewinnen sind.

Ausb. 300 mg. F 171°. Zers.

$[\alpha]_D^{20}$ -23° in 0 Min. (extrapoliert), -15° in 15 Min., +2° Endwert ($c = 2$ in H₂O)

$[\alpha]_D^{20}$ 0° ($c = 1\cdot5$ in 2 n HCl) (C₁₁H₁₈NO₇ (277·3) Ber. C, 47·64; H, 6·91; N, 5·05; Gef. C, 46·63; H, 7·06; N, 5·16%). R_F 0·15 (BuEW); R_F 0·23 (BuÄW); $R_{Fructose}$ 0·73 (BuEW); $R_{Fructose}$ 0·82 (BuÄW).

Die vereinigten Mutterlauge der Fractionen A₃, A₄ B₁ und B₂ werden über eine Säule Dowex 50 × 8 (200–400 mesh) H⁺-Form (12 × 290 mm) mit 0·2 n TCE fraktioniert. Aus der Hauptfraction kristallisierte nach Beimpfung 80 mg D-Fructose-L-Prolin (IX), welches mit der aus Glucose und L-Prolin dargestellten Verbindung identisch ist.

Die Frakt. A₁ und A₂ werden zur Gewinnung von D-Mannose-L-Prolin (VI) noch zweimal an kleinen Säulen von Dowex 50 × 8 (200–400 mesh) H⁺-Form (12 × 250 mm) mit 0·2 n TCE fraktioniert. Reines D-Mannose-L-prolin R_F 0·21 (BuÄW) lässt sich dabei nicht erhalten. Eine Reihe Fractionen in denen diese Verbindung am meisten angereichert ist, wird nach Abtrennung der TCE zur

Trockne eingeengt, ausgewogen und spez. Drehung bestimmt. Diese beträgt zwischen $[\alpha]_D^{20} - 12^\circ$ bis -24° . Damit ist erwiesen, dass diese Verbindung die Manno-, die kristallisiert erhaltene dagegen, die Gluco-Konfiguration besitzt.

D-Fructose-L-Prolin (IX). 102 g getrocknete D-Fructose und 9.0 g getrocknetes L-Prolin werden in 1250 ml abs. Methanol unter Feuchtigkeitsausschluss bei 50° gelöst und 2.5 Std. bei 60° gehalten. Das Methanol wird i. Vak. abgedampft, der Sirup in Wasser gelöst und auf eine Säule Dowex 50 \times 8 (200–400 mesh) H⁺-Form (32 \times 500 mm) gebracht, mit 1.5 l Wasser gewaschen, um die Fructose zu entfernen, und mit 0.2 n TCE eluiert in Fraktionen zu 10 ml. Frakt 2–137 enthalten D-Fructose-L-Prolin, ab Frakt 138 erscheint Prolin. Die vereinigten Fraktionen werden zur Entfernung von TCE mit Äther perforiert. Die Extraktion wird nach Einengen i.V. auf ein kleines Volum wiederholt. Der erhaltene Sirup wird mehrmals mit Methanol aufgenommen und eingeengt. Bei Wiederaufnahme in 100 ml Methanol kristallisieren in einigen Tagen 10.8 g D-Glucose-L-Prolin im Eisschrank. Durch Einengen der Mutterlauge und Aufnehmen in Methanol werden weitere 1.25 g in zwei Fraktionen erhalten.

Gesamtausb. 12.05 g (50% d.Th.).

Zum Umkristallisieren werden 4.0 g Rohprodukt in 600 ml Methanol heiss gelöst. Im Eisschrank und nach Einengen scheiden sich 2.7 g Kristalle ab, die 1 Mol. Kristall-Methanol enthalten. F 80–81°.

$[\alpha]_D^{20} - 82^\circ$ ($c = 3$ in H₂O); $[\alpha]_D^{20} - 87^\circ$ ($c = 2$ in 2 n HCl) (C₁₁H₁₂NO₇·CH₂OH (309.3) Ber. C, 46.60; H, 7.49; N, 4.53; Gef. C, 46.71; H, 7.41; N, 4.70%).

Werden 5.4 g des Rohproduktes in 100 ml Methanol mit 5% Wasser heiss gelöst, so kristallisieren in einigen Tagen 3.05 g aus. Diese Verbindung enthält 1 Mol Kristallwasser F 119° (Zers. bei 134°).

$[\alpha]_D^{20} - 86^\circ$ ($c = 2$ in H₂O); $[\alpha]_D^{20} - 89^\circ$ ($c = 2$ in 2n HCl) (C₁₁H₁₃NO₇·H₂O (295.3) Ber. C, 44.71; H, 7.17; N, 4.74; Gef. C, 44.80; H, 7.01; N, 4.54%).

Die Kristall-Methanol-haltige Verbindung gibt bei 0.1 Torr 80° über P₂O₅ getrocknet den Methanol ab. Das Kristallwasser kann nicht ohne Zersetzung der Verbindung abgetrennt werden. Freie Verb. F 137° (Zers). $[\alpha]_D^{20} - 92^\circ$ ($c = 2$ in H₂O) (C₁₁H₁₂NO₇ (277.3) Ber. C, 47.64; H, 6.91; N, 5.05; Gef. C, 46.84; H, 6.82; N, 5.14%).

R_F 0.12 (BuEW); R_F 0.20 (BuÄW); $R_{Fructose}$ 0.61 (BuEW); R_{Prolin} 0.71 (BuÄW).

L-Sorbose-L-Prolin (XI). 90 g getrocknete L-Sorbose und 8.2 g wasserfreies L-Prolin werden in 500 ml wasserfreiem frisch destillierten Dimethylsulfoxyd suspendiert und die Lösung 3 Tage bei 60° gehalten. Das Dimethylsulfoxyd wird bei 0.2 Torr bei einer Temp. unterhalb 50° abdestilliert. Der Rückstand wird mehrmals in Wasser aufgenommen und wieder im Hochvakuum eingeengt, um das Dimethylsulfoxyd weitgehend zu entfernen. Der erhaltene Sirup wird in Wasser gelöst, auf eine Säule Lewatit S 100 H⁺-Form (32 \times 540 mm) gegeben, die überschüssige Sorbose mit 1.5 l Wasser ausgewaschen und die Hexose-Aminosäuren mit 0.2 n TCE eluiert, wobei Fraktionen zu 10 ml aufgefangen werden. Frakt 65–240 enthält reduzierende Substanz und wird vereinigt. Ab Frakt 170 erscheint L-Prolin. Die vereinigten Fraktionen werden zur Entfernung der TCE im Perforator mit Äther extrahiert, i. Vak. eingeengt und auf eine Säule Dowex 50 \times 8 (200–400 mesh) H⁺-Form (25 \times 320 mm) gebracht und mit 0.25 n TCE eluiert und 10 ml-Fraktionen aufgefangen. Frakt 14–336 enthalten alle reduzierende Substanzen, sie sind frei von Prolin. Nach Entfernen der TCE durch Perforieren mit Äther und Einengen i. Vak. werden 3.9 g Sirup erhalten. Dieser wird in wenig abs. Methanol gelöst und die Substanz mit abs. Äther gefällt. Nach Wiederaufnahme der Substanz in abs. Methanol scheiden sich beim Stehen Kristalle ab, durch Einengen der Mutterlauge und Stehen im Eisschrank ergibt sich eine zweite Fraktion. Ausb. 1.8 g, 26% d.Th.

Das L-Sorbose-L-Prolin wird in 100 ml heissem Methanol mit einigen Tropfen Wasser gelöst. Kristalle im Eisschrank. Durch Einengen der Mutterlauge auf die Hälfte und Zugabe von 100 ml Methanol ergibt sich eine weitere Fraktion (Ausb. 1.6 g) F 167° (Zers.) $[\alpha]_D^{20} - 52^\circ$ ($c = 2$ in H₂O keine Mutarotation).

(C₁₁H₁₂NO₇ (277.3) Ber. C, 47.64; H, 6.91; N, 5.05; Gef. C, 47.04; H, 6.65; N, 5.13%).

R_F 0.07 (BuEW); $R_{Sorbose}$ 0.56 (BuEW).

Die Mutterlauge wird eingeengt und mit Äther eine amorphe Substanz gefällt $[\alpha]_D^{20} - 15^\circ$. Diese enthält zu 3/4 L-Sorbose-L-Prolin und zu 1/4 eine Aldose-L-prolin-Verbindung (vermutlich L-Gulose-L-prolin). R_F 0.08 (BuEW) $R_{Sorbose}$ 0.64 (BuEW).

Fructose mit Piperidin. 7.0 g getrocknete Fructose wird in 45 ml dest. Piperidin gelöst und 8 Std. auf 60° gehalten. Papierchromatographisch ist im Fließmittel P-A-W ein N-Glycosid nachweisbar. Das Piperidin wird schonend i. Vak. weitgehend abdestilliert. Der Sirup wird in 40 ml Methanol

gelöst und 2·5 ml Eisessig als Umlagerungskatalysator zugefügt. Es wird i. Vak. eingeengt und die Substanz auf eine Säule Lewatit S 100 H⁺-Form (32 × 480 mm) gegeben. Zur Entfernung des Zuckers wird mit 2 l Wasser gewaschen. Im Durchlauf befindet sich Fructose und Glucose. Es wird eluiert mit 0·25 n HCl. Alle Silbernitrat-positiven Fraktionen werden vereinigt und i. Vak. unterhalb 45° eingeengt. Um die Salzsäure weitgehend zu entfernen, wird das Einengen nach Wasserzugabe mehrmals wiederholt. Die Substanz wird zur weiteren Reinigung auf eine Säule Dowex 50 × 8 (200–400 mesh) H⁺-Form (32 × 440 mm) gebracht und mit 0·25 n HCl eluiert und in 4 ml Fraktionen aufgefangen. Die ersten Frakt 203–223 enthalten das reine Hauptprodukt von R_F 0·28 (Bu-E-W). Sie werden eingeengt und es ergibt sich eine sirupöse Substanz, die in allen Eigenschaften (Papierchromatographie, Reduktionseigenschaften, Drehung) mit dem Hydrochlorid der 1-Desoxy-1-piperidino-D-fructose von Hodge und Rist⁸ übereinstimmt. Die letzten Frakt. 276–309 enthalten zu 75% angereichert das zweite Umlagerungsprodukt, vermutlich ein entsprechendes N-substituiertes Glucosamin R_F 0·34 (Bu-E-W). Es gelingt nicht, dieses Produkt in reiner Form zu gewinnen. Beim Stehen zersetzt es sich unter Bildung eines Produktes vom R_F 0·23 (Bu-E-W).

Ein anderer Ansatz von Fructose mit Piperidin wird 20 Std. bei 60° stehen gelassen. Das Piperidin wird bei 0·2 Torr abdestilliert und nach Aufnahme mit Methanol wieder eingeengt. Bei 0·1 Torr und 40° unter N₂-Atmosphäre sublimiert ein Reducton ab. Die Nadeln zerfließen sofort bei Luftzutritt und die empfindliche Substanz färbt sich dunkel. Der sirupöse Rückstand wird in Methanol aufgenommen, dabei scheiden sich sofort Kristalle ab F 230°. Die Substanz ist identisch mit dem Piperidino-hexose-reducton von Hodge⁸.

D-Psicose. 18·1 g getrocknete D-Fructose werden in 36·3 ml frisch destilliertem Dicyclohexylamin und 130 ml abs. Methanol gelöst und unter Rühren 20 Std. bei 60° gehalten. Die Lösung wird i. Vak. unterhalb 45° eingeengt, der Sirup mit 200 ml Wasser versetzt. Die sich abscheidende Dicyclohexylamin-Phase wird durch dreimaliges Ausschütteln mit Äther entfernt. Die Lösung wird über eine Säule Lewatit S 100 H⁺-Form (32 × 460 mm) geschickt und der Durchlauf i. Vak. zum Sirup eingeengt. Zur restlosen Entfernung von Methanol wird nochmals mit Wasser eingeengt, ergibt 17·8 g Sirup. Dieser wird in 250 ml Wasser gelöst, mit (NH₄)₂CO₃ auf p_H 7·5 gebracht, 300 mg NH₄H₂PO₄ und 2 g Bäckerhefe zugegeben und 3 Tage bei 37° bebrütet. Die Hefe wird mit wenig Kohle abzentrifugiert, die Lösung durch einen Bakterienfilter filtriert, i. Vak. zum Sirup eingeengt und zur möglichst vollständigen Entfernung des Wasser mehrmals mit Methanol abgedampft. 7·4 g Sirup mit einem Gehalt von etwa 80% D-Psicose $[\alpha]_D^{20} + 2$ ($c = 3$ in H₂O) R_F 0·26, $R_{Fructose}$ 1·32 (Bu-E-W), $R_{Fructose}$ 1·25 (P-A-W). Die Hauptverunreinigung ist eine Ketose vom R_F 0·16, $R_{Fructose}$ 0·81 (B-E-W), $R_{Fructose}$ 0·72 (P-A-W), welcher mit Sorbose übereinstimmt. 3 g des völlig getrockneten Sirups wird mit Aceton nach Steiger u. Reichstein¹⁸ in die Diisopropyliden-D-psicose überführt. 210 mg Krist. aus Petroläther. F. 57°.

$[\alpha]_D^{20} - 98$ ($c = 2$ in Aceton) (C₁₂H₂₀O₆ (260·3) Ber. C, 55·37; H, 7·75; Gef. C, 55·89; H, 7·79%)

Papierchromatographie. Es werden folgende Gemische verwendet: n-Butanol-Eisessig-Wasser (70:7:23) = Bu-E-W; Pyridin-Isoamylalkohol-Wasser (7:7:6) = P-A-W; sek-Butanol-Äthylmethylketon-Wasser (25:4:16) = Bu-Ä-W, in dem allein die isomeren Hexose-prolin-Verb. zu trennen sind. Papier Schleicher-Schüll 602 h:p. Anfärben erfolgt mit ammoniakalischer AgNO₃-Lösung, Ninhydrin und Harnstoff-Phosphorsäure für Ketosen. P-A-W-Chromatogramme müssen vor dem Besprühen mit ammon. AgNO₃ erst mit Essigsäure besprüht werden.