

nahezu quantitativer Ausbeute erhalten, wenn man mit Methanol/Morpholin oder mit Dimethylformamid/Anilin arbeitet. Methanol/Piperidin führt nach 7 Std. nur zu einem 33-proz. Umsatz. Ohne Aminzusatz oder bei Anwesenheit primärer Amine findet in methanolischer Lösung keine Reaktion statt.

Eigenartigerweise vermag Schwefelwasserstoff in sorgfältig gereinigtem Dimethylformamid das 1,2-Diketon ohne Aminzusatz quantitativ zum Monoketon (4) zu reduzieren, bei Gegenwart eines sekundären Amins aber nur zum Hydroxyketon (5).

Mit Piperidin ist die quantitative Reduktion zu (5) schon nach 1 Std. beendet; bei Gegenwart von Morpholin entsteht nach 4 Std. ein Gemisch der beiden Reduktionsprodukte (4) und (5). Ohne Lösungsmittel katalysieren nur Pyridin, Morpholin und Piperidin die Reduktion.

#### *Reduktion von 1,2-Diketonen mit Schwefelwasserstoff:*

In eine Lösung von 0,2 Mol des 1,2-Diketons und etwa 30 ml Amin in Methanol oder Dimethylformamid leitet man bis zu 4 Std. unter Eiskühlung Schwefelwasserstoff ein, wobei sich schon während des Einleitens elementarer Schwefel abscheidet. Dann wird mit verdünnter Salzsäure angesäuert, der sich absetzende Niederschlag abgesaugt, durch leichtes Erwärmen mit Methanol grob vom Schwefel getrennt und das in Methanol gelöste Reduktionsprodukt durch Umkristallisieren gereinigt. Beim Ansäuern anfallende flüssige Reduktionsprodukte werden ausgeäthert und nach dem Trocknen über Natriumsulfat destilliert.

Beispiele:

*Benzoin aus Benzil:* Reaktion in Piperidin/Dimethylformamid; einstündiges Einleiten von H<sub>2</sub>S; Ausbeute quantitativ. Identifizierung durch Analyse, Mischschmelzpunkt, 2,4-Dinitrophenylhydrazone und Vergleich der IR-Spektren.

*Desoxybenzoin aus Benzil:* Reaktion in Pyridin/Methanol; vierständiges Einleiten von H<sub>2</sub>S; Ausbeute quantitativ. Identifizierung wie oben.

Eingegangen am 7. Januar 1963 [A 287]

## Analytisch-technische Untersuchungen

### Permethylierung von oligomeren und polymeren Kohlenhydraten und quantitative Analyse der Spaltungsprodukte

VON PROF. DR. K. WALLENFELS [\*] UND DR. G. BECHTLER,  
CHEMISCHES LABORATORIUM DER UNIVERSITÄT FREIBURG i. BR.

UND VON PROF. DR. RICHARD KUHN, H. TRISCHMANN UND DR. H. EGGE  
MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE FORSCHUNG, HEIDELBERG,  
INSTITUT FÜR CHEMIE

*Mit Dimethylsulfoxid als Lösungsmittel und Methyljodid/Bariumoxyd oder Dimethylsulfat/Bariumhydroxyd als Methylierungsmittel lassen sich bei Mono-, Oligo- und Polysacchariden schnell hohe Methylierungsgrade erreichen. Je nach Struktur und Löslichkeit des Substrates gelingt die Permethylierung in einem Arbeitsgang oder erst nach Wiederholung desselben. Es werden Vorschriften für die Permethylierung verschiedener Kohlenhydrate angegeben. – Die nach einer Methanolyse erhaltenen Methylglykoside werden gaschromatographisch getrennt und quantitativ bestimmt. In diesem Zusammenhang wird die Herstellung von Trennsäulen mit minimaler Retention beschrieben. Für das Pullulan wird die Konstitution einer vollständig linearen,  $\alpha$ -1 → 6-verknüpften Poly-maltotriose bewiesen. In einem Anhang wird über die gaschromatographische Identifizierung von Methyläthern des Glucosamins und Galaktosamins berichtet.*

#### Einleitung

Die Struktur eines aus wenigen oder vielen Monosaccharid-Einheiten aufgebauten Kohlenhydrat-Moleküls ist bestimmt durch:

1. die Natur der Monomeren,
2. die Konfiguration der glykosidischen Bindungen,
3. die Stellung der C-Atome, zu denen die glykosidischen Bindungen führen,

4. das Molekulargewicht,
5. die topographische Verteilung verschiedener Bindungstypen bei Makromolekülen.

Auch wenn ein Polysaccharid nur aus Monomeren einer Art besteht, bereitet die Aufklärung der Verteilung verschiedener Bindungsarten im Molekül viel größere Schwierigkeiten als bei einem Eiweißmolekül mit 20 oder mehr verschiedenartigen Bausteinen. So kommt es, daß die vollständige Formulierung der Struktur z. B. eines Glykogenmoleküls noch nicht möglich ist. Die Schwierigkeit besteht darin, die Sequenz der Bindungstypen (1 → 4- und 1 → 6-Bindungen) sowie Art und Zahl

[\*] 3. Mitteilung über Untersuchungen an Pullulan. 2. Mitteilung: H. Bender u. K. Wallenfels, Biochem. Z. 334, 79 (1961).

der Verzweigungen zu ermitteln. Die wichtigste Methode der Strukturaufklärung besteht in der Methylierung sämtlicher OH-Gruppen und der anschließenden solvolytischen Spaltung des Polysaccharids.

### A. Methoden der Methylierung

In Analogie zur Äthersynthese von Williamson haben vor allem Purdie und Irvine [1] sowie Haworth [2] und seine Schule Methoden zur Permethylierung von Kohlenhydraten und Glykosiden entwickelt. Dabei wurden meist Silberoxyd/Methyljodid oder Dimethylsulfat/Natronlauge angewendet, in Sonderfällen auch Natrium in flüssigem Ammoniak/Methyljodid [3]. Im allgemeinen waren mehrere aufeinanderfolgende Methylierungen erforderlich, um alle OH-Gruppen zu veräthern.

Mit Dimethylformamid als Lösungsmittel gelang es, Saccharose in einem Schritt glatt zu permethylieren [4]. Folgende Arbeitsweisen haben sich bewährt:

I. Methyljodid mit Silberoxyd: a) in Dimethylformamid (DMF) [4] (Beispiele: Solanin, Tomatin, Fructose, Lacto-N-tetrait); b) in Dimethylsulfoxid (DMSO) [5] (Beispiele: Pullulan [\*], Stärke, Dextran).

II. Methyljodid mit Bariumoxyd und/oder Bariumhydroxyd:

a) in DMF [7,8] (Beispiele: N-Acetyl-lactosaminol, Indigo); b) in Dimethylsulfoxid (DMSO) [5]; c) in DMF + DMSO.

III. Dimethylsulfat mit Bariumoxyd und/oder Bariumhydroxyd:

a) in DMF [9]; b) in DMF + DMSO [9] (Beispiele: Inosit, Loliin).

[1] T. Purdie u. J. C. Irvine, J. chem. Soc. (London) 83, 1021 (1903).

[2] W. N. Haworth et. al., J. chem. Soc. (London) 1928, 2681; W. N. Haworth u. H. Machemer, ibid. 1932, 2270.

[3] J. E. Muskat, J. Amer. chem. Soc. 56, 693, 2449 (1934); K. Freudenberg u. H. Boppel, Ber. dtsch. chem. Ges. 71, 2435, 2505 (1938).

[4] R. Kuhn, H. Trischmann u. I. Löw, Angew. Chem. 67, 32 (1955).

[5] G. Bechtler, Diplomarbeit, Universität Freiburg 1960; Dissertation, Universität Freiburg 1962.

[\*] Pullulan ist das aus dem Kulturfiltrat isolierte und aus kaltem Wasser gefällte Polysaccharid der Schleimhülle von *Pullularia pullulans* [6]. Nach Aufkochen in Wasser und erneuter Fällung erhält man ein „Restpullulan“. Im Überstand bleiben Glucose und ein Oligosaccharid, die zusammen etwa 8 bis 9% des Pullulans ausmachen. Das Restpullulan ergibt beim enzymatischen Abbau mit Pullulanase reine Maltotriose. – Anm. b. d. Korr.: Es hat sich gezeigt (Diplomarbeit D. Freudenberger, Freiburg 1962), daß Pullulan außer diesen Nebenkomponenten noch eine kleine Menge Amylase (Glucamylase-Typ) in adsorptiver Bindung enthält, welche die Chromatogramme enzymatischer Hydrolysate verfälschen kann. Der Name Pullulan soll in Zukunft nur für das reine Polysaccharid („Restpullulan“) benutzt werden.

[6] H. Bender, J. Lehmann u. K. Wallenfels, Biochim. biophysica Acta 36, 309 (1959).

[7] R. Kuhn, H. H. Baer u. A. Seeliger, Liebigs Ann. Chem. 611, 236 (1958).

[8] R. Kuhn u. H. Trischmann, Chem. Ber. 94, 2258 (1961).

[9] R. Kuhn u. H. Trischmann, Chem. Ber. 96, 284 (1963).

Dimethylsulfat ist billiger und wirkt in manchen Fällen besser als Methyljodid. Bariumoxyd und/oder Bariumhydroxyd sind im allgemeinen dem Silberoxyd vorzuziehen. Erfahrungen liegen für die Methylierung von 50 mg bis 20 g Kohlenhydrat oder bereits teilweise methyliertes Kohlenhydrat vor.

Da meso-Inosit, Loliin, lösliche Stärke, Pullulan, Dextran u. a. in DMF praktisch unlöslich sind, benutzten wir in solchen Fällen Methode IIb oder IIc, mit DMSO als Lösungsmittel, gegebenenfalls nach anfänglicher Methylierung mit Dimethylsulfat/NaOH. In zahlreichen Fällen arbeiteten wir nach Methode IIIb, wobei die Substanzen zunächst in DMSO gelöst wurden. Es ist jedoch davon abzuraten, die Methylierung größerer Mengen in reinem DMSO durchzuführen, da die Reaktion zu heftig werden kann [10]. Ratsam ist dann eine Verdünnung des DMSO mit DMF (z. B. im Volumenverhältnis 1:1), sofern das Substrat in Lösung bleibt. Da DMSO erst bei 18,7 °C schmilzt, kann man es bei Methylierungen mit Dimethylsulfat (Methode III) nicht ohne Verdünnung verwenden, da diese bei 0 °C angesetzt werden.

Nach bekannten Verfahren acetylierte oder durch Acetolyse gewonnene Produkte kann man mit Dimethylsulfat ohne Zusatz von DMSO (Methode IIIa) in vorzüglichen Ausbeuten methylieren (Beispiele: Hexamethyl-meso-inositol aus Hexaacetyl-mesoinositol; Permethylierung von Pentaacetyl-D-glucosamin zu β-Methyl-2-acetamino-2-desoxy-3,4,6-trimethyl-D-glucopyranosid, Ausbeute 90%).

### Partielle Methylierung von Pullulan mit Dimethylsulfat/Natronlauge:

3 g Pullulan (Restpullulan) werden in 30 ml Wasser gelöst, unter Rühren bei 20 °C unter Stickstoff tropfenweise mit 100 ml 38-proz. Natronlauge und 45 ml Dimethylsulfat versetzt. Nach ca. 6 Std. ist das Eintropfen beendet, worauf noch 3 Std. bei 35 bis 40 °C gerührt, anschließend 20 min auf 100 °C erhitzt und dann abgekühlt wird.

Das auf dem Reaktionsgemisch schwimmende partiell methylierte Polysaccharid wird abgehoben, die Flüssigkeit von den Salzen dekantiert, mit Wasser auf das doppelte Volumen verdünnt und fünfmal mit je 200 ml Chloroform extrahiert. In diesem Chloroformextrakt wird auch das abgehobene Polysaccharid gelöst. Anschließend wäscht man den Extrakt einmal gut mit Wasser, trocknet mit Natriumsulfat und destilliert das Chloroform ab. Der Rückstand wird in sehr wenig Chloroform gelöst und diese Lösung in niedrigsiedenden, eiskalten Petroläther getropft. Das partiell methylierte Polysaccharid fällt als weiße, fadenförmige Substanz aus. Ausbeute: 2 g mit ca. 32 % OCH<sub>3</sub>.

### Nachmethylierung nach Methode IIb:

1 g dieses Produktes wird in 5 ml DMSO gelöst, mit 10 ml Methyljodid und 12 g Bariumoxyd versetzt, über Nacht zwischen 35 und 40 °C gehalten. Es werden nochmals 10 ml Methyljodid und 12 g Bariumoxyd zugegeben und wieder 24 Std. bei 35 bis 40 °C gehalten. Man extrahiert den Kolbeninhalt viermal mit je 50 ml Chloroform und arbeitet diese Lösung in der oben beschriebenen Weise auf.

[10] Aus Dimethylsulfoxid/Methyljodid bildet sich u. a. das von R. Kuhn u. H. Trischmann, Liebigs Ann. Chem. 611, 117 (1958), beschriebene Trimethylsulfoxoniumjodid. Die Einschränkung gilt nicht für bereits teilweise methylierte Produkte.

Den leicht gelblichen Rückstand löst man in sehr wenig Chloroform zu einem zähen Sirup, den man mit Benzol zu einer leicht flüssigen Lösung verdünnt. Durch Eingießen in eiskalten Petroläther fällt das permethylierte Polysaccharid (45,6% OCH<sub>3</sub>) als weißes Pulver aus. Ausbeute: 800 mg. Im IR-Spektrum ist keine OH-Bande zu erkennen (vgl. Abb. 9d). Dextran (Knoll 100) [\*] und Stärke (Amylum solubile, Merck) wurden in gleicher Weise und mit gleich gutem Ergebnis methyliert. Ausbeute: aus 1 g Stärke 650 mg und aus 1 g Dextran 700 mg permethyliertes Produkt.

Die Grenzen der hier genannten Methoden sind einerseits durch die Löslichkeit der zu methylierenden Verbindungen in DMSO und in DMSO/DMF-Gemischen gegeben (native Cellulose, native Stärke, Pullulan und Indanthren lassen sich auch nach Methode III nicht permethylieren), andererseits durch die Alkaliempfindlichkeit glykosidischer Bindungen, Amid-Gruppierungen usw. (1 → 3-gebundene Disaccharide aus zwei Hexosen würden zerfallen; aus Glykolipiden wird etwas Fettsäuremethylester gebildet; Sialinsäure-Reste werden teilweise abgespalten).

Bei manchen Substraten, z. B. bei löslicher Stärke, kommt es vor, daß Methode III Produkte mit geringem Schwefelgehalt (ca. 1%) liefert. Vermutlich handelt es sich um Schwefelsäureester. In solchen Fällen sind die Methoden IIb oder IIc vorzuziehen. Schließlich können auch Wasserstoffbrücken die Methylierung – jedenfalls die Permethylierung in einem Schritt – sehr erschweren (Alizarin gibt nach Methode III hauptsächlich den 2-Methyläther und nur wenig 1,2-dimethyliertes Derivat, welches nach Methode IIa mit ca. 15% Ausbeute anfällt).

Weitere Besonderheiten treten bei reduzierenden Zuckern auf: von Glucose, Lactose und anderen Oligosacchariden, die Glucosereste als reduzierende Gruppe enthalten, wurden bisher nur die permethylierten Pyranosederivate isoliert. Die Methylierung von Fructose nach Methode I lieferte jedoch 50–60% Pentamethyl-D-fructofuranose [11]. Auch ein reduzierender Galaktoserest kann in der Furanoseform permethyliert werden [12]. Das ungefähre Mengenverhältnis, in dem α- und β-Pentamethylglucose aus Glucose, sowie α- und β-Octamethylallactose aus Lactose entstehen, ist aus den Abbildungen 1 und 2 bzw. aus den Abbildungen 3 und 4 ersichtlich.

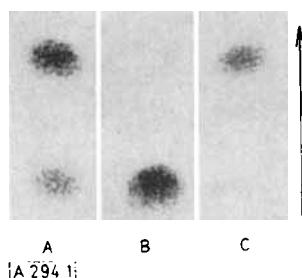


Abb. 1. Dünnschichtchromatogramme von (A) methylierter Glucose, (B) methyliertem  $\alpha$ -Methylglucosid und (C) methyliertem  $\beta$ -Methylglucosid. Der Pfeil gibt die Laufrichtung an. Methylierung mit  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$  nach Methode IIIa.

[\*] Wir danken der Firma Knoll AG, Ludwigshafen, für ein Präparat.

[11] R. Kuhn u. H. Grassner, Liebigs Ann. Chem. 610, 122 (1957).

[12] W. T. J. Morgan, persönliche Mitteilung.

meso-Inosit, der bei einmaliger Methylierung mit  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4/\text{NaOH}$  vier Produkte liefert, läßt sich mit  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4/\text{BaO}/\text{Ba}(\text{OH})_2$  in DMF/DMSO (1:1) bei 0 bis 20 °C in einem Schritt permethylieren (Abb. 5). Der Hexamethyläther des meso-Inosits ( $F_p = 18$  °C) bildet sich im zweiten Fall mit 85% Ausbeute.

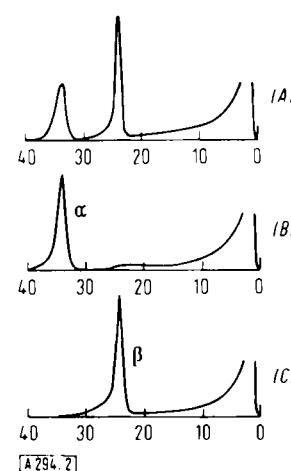


Abb. 2. Gaschromatogramme von (A) methylierter Glucose, (B) methyliertem  $\alpha$ -Methylglucosid und (C) methyliertem  $\beta$ -Methylglucosid (nach Versuchen von H. Egge).

Chromatographiert wurde bei 200 °C an einer mit 20% Poly- $\beta$ -butan-1,4-diolsuccinat auf Celite gefüllten Säule (Länge: 2 m, Durchmesser: 4,6 mm). Trägergas: Helium. Strömungsgeschwindigkeit: 100 Nml/min. Druck: 2 atm.  
Abszisse: Zeit [min].

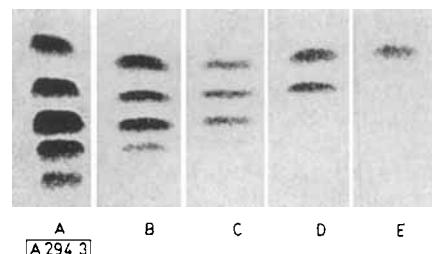


Abb. 3. Dünnschichtchromatogramme methylierter Lactose (der Pfeil gibt die Laufrichtung an).

A = Nach einer Haworth-Methylierung [12a] (46,2 Gew.-% Methoxyl).

B = Nach zwei Haworth-Methylierungen [12a] (50,3 Gew.-% Methoxyl).

C = Nach drei Haworth-Methylierungen [12a] (52,8 Gew.-% Methoxyl).

D = Nach einer Methylierung mit  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4/\text{Ba}(\text{OH})_2$  in DMF (Methode IIIa) (54,3 Gew.-% Methoxyl).

E = Kristalline  $\beta$ -Octamethylallactose (54,5 Gew.-% Methoxyl; berechnet: 54,6%).

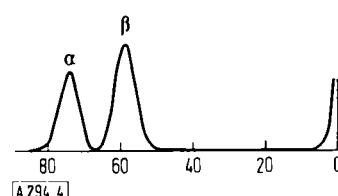


Abb. 4. Gaschromatogramm von Präparat D in Abb. 3 (nach Methode IIIa permethylierte Lactose;  $\alpha$ - und  $\beta$ -Octamethylallactose).

Chromatographie-Bedingungen siehe Legende zu Abb. 2.

Abszisse: Zeit [min].

[12a] Methylierungsvorschrift: W. N. Haworth u. G. C. Leitch, J. chem. Soc. (London) 113, 188 (1918).

Zur dünnenschichtchromatographischen Prüfung von Methylierungsprodukten trägt man eine Aufschlämung von 30 g Kieselgel G (Merck) in 60 ml Wasser auf 5 Glasplatten von  $20 \times 20 \text{ cm}^2$  auf. Die Platten werden 5 Std. bei  $130^\circ\text{C}$  getrocknet; 3 bis 4 cm vom Rand entfernt werden in Abständen von 2 cm je 6 bis 8 Flecken mit ausgezogenem Schmelzpunktstäbchen aufgetragen. Man chromatographiert aufsteigend

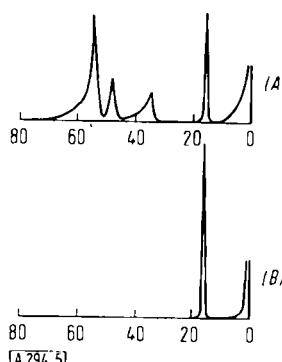


Abb. 5. Gaschromatogramm von methyliertem Inositol (nach Versuchen von H. Egge).

A = Inositol, einmal mit  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4/\text{Natronlauge}$  methyliert.  
B = Inositol, einmal mit  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4/\text{BaO}/\text{Ba}(\text{OH})_2$  in DMF: DMSO (1:1) bei 0 bis  $20^\circ\text{C}$  methyliert.

Gaschromatographie-Bedingungen siehe Legende zu Abb. 2.  
Abszisse: Zeit [min].

mit einem Gemisch von 200 ml Benzol und 40 ml absolutem Äthanol; Dauer: 1 bis  $1\frac{1}{2}$  Std. Nach dem Trocknen wird mit 50-proz. Schwefelsäure besprüht und anschließend ca. 20 min auf  $130^\circ\text{C}$  erhitzt.

## B. Bestimmung des Methoxyl-Gehaltes methylierter Polysaccharide

Jedes nur aus Hexosen aufgebaute Polysaccharid hat die Summenformel  $\text{H}-(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n-\text{OH}$ , das permethylierte Polysaccharid dementsprechend die Formel  $\text{CH}_3-(\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_5)_n-\text{OCH}_3$ . Daraus errechnet sich bei hohen Molekulargewichten ( $n > 300$ ) ein theoretischer Methoxyl-Wert von 45,6 Gew.-%. Bei kleineren Molekulargewichten fallen die beiden  $\text{CH}_3\text{O}$ -Gruppen, welche die Hauptkette am reduzierenden und nicht-reduzierenden Ende abschließen, immer stärker ins Gewicht (Abb. 6).

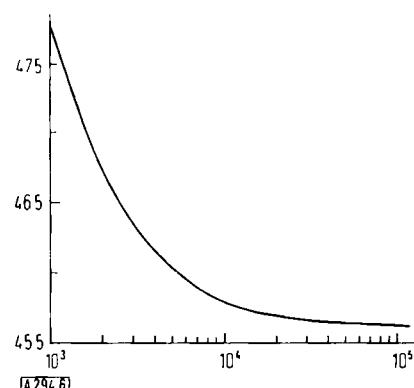


Abb. 6. Zusammenhang von Molekulargewicht und Methoxyl-Gehalt methylierter Polyhexosen.

Ordinate: Methoxyl-Gehalt des permethylierten Polysaccharids [Gew.-%].  
Abszisse: Molekulargewicht des permethylierten Polysaccharids.

Die Fehlerbreite der Methoxyl-Bestimmung läßt sich durch Standardisierung der Arbeitsgänge bei Verwendung von ca. 20 mg Substanz auf  $\pm 0,1$  bis  $0,2\%$  herabsetzen [\*]. Bei Verwendung der Apparatur nach Vieböck und Schwappach [13] und iodometrischer Titration [14] fanden wir für permethyliertes Pullulan einen  $\text{CH}_3\text{O}$ -Gehalt von  $45,5 \pm 0,1\%$ .

Jede Verzweigungsstelle liefert bei der Hydrolyse der permethylierten Polyhexose 1 Mol dimethylierter Hexose und 1 Mol tetramethylierter Hexose (vom nicht-reduzierenden Ende der Zweigkette). Die Beziehung zwischen prozentualen Anteil an dimethylierter Hexose und Verzweigungsgrad ist in Abb. 7 dargestellt.

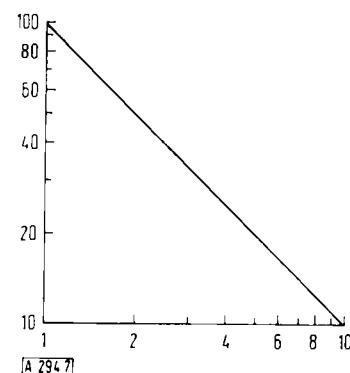


Abb. 7. Zusammenhang zwischen der Zahl der Verzweigungsstellen in einer Polyhexose und dem Anteil an dimethylierter Hexose im Hydrolysat des permethylierten Polysaccharids.

Ordinate: Glucose-Reste pro Verzweigung.  
Abszisse: Dimethylglucose [Gew.-%].

Abbildung 8 zeigt, wie sich bei einer Polyhexose vom angenommenen Molekulargewicht 100000 eine statistisch verteilte unvollständige Methylierung auf den Methoxyl-Gehalt auswirkt. Wenn der tatsächliche Methoxyl-Gehalt z. B. um 0,5 % unter dem theoretischen von 45,6 % liegt, so bedeutet dies, daß im Mittel

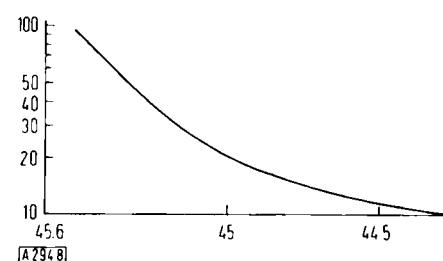


Abb. 8. Durch unvollständige Methylierung vorgetäuschte Verzweigungen.

Ordinate: Glucose-Reste pro scheinbare Verzweigung.  
Abszisse: Methoxyl-Gehalt des methylierten Polysaccharids [Gew.-%].

jede 26. Hexose-Einheit an einer Hydroxylgruppe nicht methyliert wurde; dem entsprechen dann 3,9 % dimethylierter Hexose im Hydrolysat, die einen Verzweigungsgrad vortäuschen können, wie er etwa im Amylo-

[\*] Analytisches Ergebnis der Freiburger Arbeitsgruppe.

[13] F. Vieböck u. A. Schwappach, Ber. dtsch. chem. Ges. 63, 2818 (1930).

[14] F. Vieböck u. C. Brecher, Ber. dtsch. chem. Ges. 63, 3207 (1930).

pektin vorliegt. Man erkennt, eine wie große Bedeutung der vollständigen Methylierung und ihrem sicheren analytischen Nachweis zukommt.

IR-Spektroskopische Messungen gestatten die Bestimmung freier OH-Gruppen. Mit ihnen läßt sich daher die Vollständigkeit einer Methylierung kontrollieren (Abb. 9). Feste Methylierungsprodukte werden in gut getrocknetem Tetrachlorkohlenstoff gelöst, die Spektren sirupöser Stoffe lassen sich ohne Lösungsmittel aufnehmen.

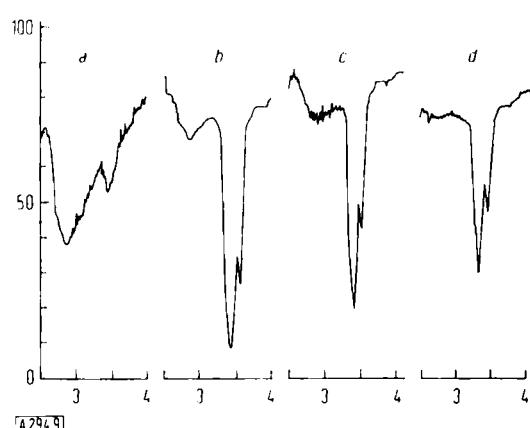


Abb. 9. Ausschnitte aus den IR-Spektren methylierter und nicht methylierter Restpullulanen.

- (a): Restpullulan
- (b): Restpullulan, partiell methyliert (32 % OCH<sub>3</sub>)
- (c): Probe b, nachmethyliert (45 % OCH<sub>3</sub>; 1% Hexosedimethyläther im Hydrolysat)
- (d): Probe c, nachmethyliert (45,6 % OCH<sub>3</sub>; 0,1 bis 0,2 % Hexosedimethyläther im Hydrolysat).

Ordinate: Durchlässigkeit [%].

Abszisse: Wellenlänge ( $\mu$ ).

Glasig erstarrte Verbindungen können in dünner Schicht auf eine Kochsalzplatte aufgeschmolzen werden. Bei Ausschluß von Wasser zeigen die Proben keine Absorptionsbande bei 2,8 bis 2,9  $\mu$  mehr, wenn sie vollständig methyliert sind (Abb. 9d). Dagegen findet man im IR-Spektrum eines unvollständig methylierten Polysaccharids schon eine deutliche OH-Bande, wenn das Hydrolysat dieses linearen Polysaccharids nur 1% Hexosedimethyläther enthält (Abb. 9c).

Sind einzelne OH-Gruppen mit Methylschwefelsäure verestert, so findet man, trotz erheblicher Untermethylierung (die sich aus der Methoxylbestimmung ergibt) unter Umständen keine OH-Banden. Meist wird eine Schwefelbestimmung genügen, um die Resultate richtig zu deuten.

### C. Spaltung und quantitative Bestimmung der methylierten Monomeren

Zur papierchromatographischen Bestimmung eignen sich die reduzierenden Zucker, die bei der Hydrolyse der methylierten Oligo- oder Polysaccharide entstehen. Zur Gaschromatographie verwendet man die Methylglycoside, die man durch 24- bis 90-stündiges Erhitzen mit 2 proz. methanolischer Salzsäure auf 80 bis 85 °C gewinnt.

### 1. Papierchromatographische Bestimmung der methylierten Monomeren

Die Methode der Chromatographie mit umgekehrten Phasen [15] gestattet z. B. die vollständige Trennung von 2.3.4- und 2.3.6-Trimethylglucose sowie die Trennung jedes der beiden Monosaccharide in die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Form (Abb. 10). Kein anderes bisher beschriebenes chromatographisches Verfahren weist eine solche Trennfähigkeit auf.

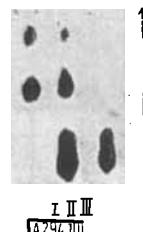


Abb. 10. Papierchromatographische Trennung von 2.3.4- und 2.3.6-Trimethylglucose (der Pfeil gibt die Laufrichtung an).

- I: 2.3.4-Trimethylglucose
- II: 2.3.4- und 2.3.6-Trimethylglucose (Hydrolysat von permethyliertem Pullulan)
- III: 2.3.6-Trimethylglucose.

### Arbeitsvorschrift:

Die Papierbögen (Whatman Nr. 1) werden durch eine Mischung von Toluol und Dimethylsulfoxid (5:1) gezogen, kurz zwischen Filtrierpapier abgepreßt und anschließend 1 min in einen 60 °C warmen Trockenschrank gehängt. Nach Wiederholung dieser Imprägnierung wird das Papier zwischen zwei Glasplatten aufbewahrt. Zum Auftragen der Zuckerproben zieht man es bis etwas über die Auftragungslinie aus den Platten hervor und setzt die in Chloroform gelösten Proben im Abstand von 40 mm auf. Als Laufmittel und Bodenphase wird Diisopropyläther benutzt, der bei der Temperatur des Chromatographieraumes mit Dimethylsulfoxid gesättigt ist. Es wird absteigend im Glasschliffgefäß chromatographiert. Bei der Prüfung auf Tetramethylglucose muß die Chromatographie nach 6 Std. abgebrochen werden. Zur Trennung der Trimethylglucosen voneinander und von Dimethylglucose chromatographiert man 40 bis 48 Std. Das Chromatogramm wird bei 100 °C im Luftstrom getrocknet und dann von beiden Seiten gleichmäßig mit einer 2,5-proz. Lösung von Anilinphosphat (frisch destilliertes Anilin und kristallisierte Phosphorsäure, Molverhältnis 1:1) in Eisessig [16] besprüht. Man läßt 2 min zur gleichmäßigen Verteilung des Reagens hängen und hält den Bogen dann 3 min bei 100 °C. Die Zucker erscheinen als braune oder rotbraune Flecke. Zur quantitativen Bestimmung werden die ausgeschnittenen Flecke mit je 5 ml eines frisch hergestellten Gemisches aus n-Butanol und konzentrierter Salzsäure (5:2) cluiert. Nach 3 Std. kolorimetriert man die klar filtrierten Extrakte bei 405 m $\mu$ . In der Vergleichsküvette befindet sich ein analog hergestellter Extrakt des leeren Papiers. Das Ergebnis läßt sich auf  $\pm 5\%$  reproduzieren.

### 2. Gaschromatographische Bestimmung der methylierten Monomeren

Als stationäre Phase [17–20] eignet sich partiell methylierte Hydroxyäthylcellulose am besten [19]. Als Trägermaterial diente meist Chromosorb W. Mit verschiedenen stark methylierten Hydroxyäthylcellulosen zeigten die Säulen auch im besten Fall noch eine starke Reten-

[15] B. Wickberg, Acta chem. scand. 12, 615 (1958).

[16] L. Hough, J. K. N. Jones u. W. H. Wadman, J. chem. Soc. (London) 1950, 1702.

[17] C. D. Chang u. H. B. Hass, J. org. Chemistry 23, 773 (1958).

tion, die sich bei einer Verminderung des Belegungsgrades (zur Erhöhung der Zahl der theoretischen Böden) in zunehmendem Maße bemerkbar machte. Sie führte zu verbreiterten, oft unsymmetrischen Banden, die für die quantitative Auswertung auch bei befriedigender Trennung ungeeignet waren. Der gleichen Schwierigkeit begegneten *Gee* und *Walker* [20], so daß sie auf die quantitative Auswertung überhaupt verzichtet haben. Die starke Retention hydroxylierter Verbindungen beruht beim Chromosorb vermutlich auf der großen inneren Oberfläche.

Die Retention verschwand nahezu völlig, als wir zu Glasperlen als Trägermaterial übergingen. Die Variation von Belegungsstärke und Kolonnenlänge hat zu Säulen geführt, die bei programmiertem Temperaturanstieg zwischen 140 und 155 °C eine Trennung der Trimethyl-methylglucoside ermöglichen (ohne störende Verzerrung der Banden oder Verschiebung der Basislinie). Die Trennfähigkeit, d. h. die Zahl der theoretischen Böden pro Längeneinheit der Kolonne fällt mit zunehmender Länge der Kolonne rasch ab [\*].

Zum Nachweis von Spuren der Tetramethyl- und Dimethyl-methylglucoside wurde eine gewickelte Kolonne von 1,20 m, für Trimethyl-methylglucoside eine solche von 3 m Länge verwendet. Die quantitative Auswertung der Chromatogramme erfolgte nach dem Dreieckverfahren [21], die Prozentberechnung nach der Methode der inneren Normierung. Die Ergebnisse ließen sich für die Hauptbanden auf ± 1 bis 2 % genau reproduzieren.

#### Arbeitsvorschriften:

##### Herstellung von partiell methylierter Hydroxyäthylcellulose:

10 g Hydroxyäthylcellulose [\*\*] in 150 ml H<sub>2</sub>O zu einem zähen Sirup gelöst, werden mit 150 ml Dimethylsulfat und 425 ml 37-proz. Natronlauge methyliert. Dann wird dreimal mit 300 ml Chloroform extrahiert, zweimal mit Wasser gewaschen und verdampft. Nach Fällen mit Petroläther aus Benzol/Chloroform wird die Substanz (ca. 9 g) in 75 ml trockenem Dimethylformamid gelöst, mit 2 g wasserfreiem Calciumsulfat, 50 ml Methyljodid und 35 g Silberoxyd versetzt. Nach Abklingen der exothermen Reaktion wird auf 40 °C erwärmt. Nach 24 Std. extrahiert man mit 500 ml Chloroform, filtriert den Extrakt, wäscht ihn mit NaHSO<sub>3</sub>-Lösung und zweimal mit Wasser. Nach Abziehen des Chloroforms wird in Benzol aufgenommen und mit Petroläther gefällt. Auf diese Weise erhält man 4,5 g weiße, partiell methylierte Hydroxyäthylcellulose mit einem Methoxylgehalt von ca. 30 %.

#### Bereitung der Kolonnenfüllung:

Die methylierte Hydroxyäthylcellulose wird in Benzol gelöst, trockene, entfettete Glasperlen werden zugegeben, und die Mischung wird im Rotationsverdampfer bis zu breiiger Konsistenz eingedickt. Im Vakuum destilliert man unter stetem

[18] *S. W. Gunner, J. K. N. Jones u. M. B. Perry*, Chem. and Ind. (London) 1961, 255.

[19] *H. W. Kircher*, Analytic. Chem. 32, 1103 (1960).

[20] *M. Gee u. H. G. Walker jr.*, Analytic. Chem. 34, 650 (1962).

[\*] Die theoretischen Bodenhöhen wurden an einer 0,6-, 1,2- und 3-m-Kolonne mit β-2.3.4-Trimethyl-methylglucosid zu 0,35 bzw. 0,60 bzw. 1,38 mm bestimmt.

[21] *A. T. James*, Methods biochem. Analysis 8, 1 (1960).

[\*\*] Die Hydroxyäthylcellulose mit einem Substitutionsgrad von ca. 1,34 überließ uns freundlicherweise Herr Dipl.-Chem. E.

Schütteln noch so lange Benzol ab, bis der Inhalt anfängt zusammenzubacken. Er wird auf Petrischalen ausgebreitet und mit einem Spatel zerdrückt, bis die Perlen nicht mehr aneinander kleben. Bei richtiger Ausführung wird ein trockenes, nicht schmierendes Produkt vorliegen. Die so präparierten Perlen werden 24 Std. auf 100 °C erhitzt und von Zeit zu Zeit gewendet, anschließend mit Petroläther gewaschen, filtriert und nochmals 6 Std. bei 140 °C aufbewahrt.

#### Füllen der Kolonnen:

Stahlkolonnen, die mit Swagelock-Armaturen ausgerüstet sind, lassen sich leicht füllen. Auf der einen Seite der Kolonne wird eine aus Messing gedrehte Schlauchfülle, die im Innern ein feines Maschennetz besitzt, aufgeschraubt und Wasserstrahlvakuum angelegt. Mit Hilfe eines kleinen Trichters wird die Kolonne vom anderen Ende gefüllt und an beiden Enden mit Glaswolle verschlossen. Die Füllung läßt sich auch bei der 3-m-Säule reproduzieren.

#### Gaschromatographische Trennung:

Trägermaterial: Glasperlen, 0,3 mm Ø [\*]. Aktive Phase: partiell methylierte Hydroxyäthylcellulose. Belegung: 4 mg/g, 135 mg pro Meter Kolonne. Länge der gewickelten Säulen: 0,6; 1,2 und 3 m. Temperatur der Säule: 140 bis 155 °C. Programmierung: 1,6 °C Temperaturerhöhung pro Minute. Temperatur der Einspritzöffnung: 270 °C. Temperatur des Detektors: 280 °C. Strömungsgeschwindigkeit: 21 bis 22 Nml He pro Minute. Empfindlichkeit des Detektors: 1.

## D. Anwendungen auf spezielle Strukturprobleme

### 1. Untersuchung von Monosaccharid-Gemischen

Die Verfahren zur Trennung anomerer Methylglucoside ermöglichen die direkte Bestimmung der Zusammensetzung von Gleichgewichtsgemischen, die sich bisher nur aus Drehwerten berechnen ließ. Auch die im Gleichgewicht vorliegenden Furanoside oder Anhydrozucker können bestimmt werden. Nach 40-stündiger Behandlung mit 2 % HCl in Methanol bei 85 °C ließen sich folgende Verbindungen nachweisen:

Im 2.3.4-Trimethyl-methylglucosid-Gemisch: 74 % α-Methyl-pyranosid, 25,6 % β-Methyl-pyranosid und 0,4 % 2.3.4-Trimethylglucosan.

Im 2.3.6-Trimethyl-methylglucosid-Gemisch: 61,9 % α-Methyl-pyranosid, 34,7 % β-Methyl-pyranosid und 3,4 % Methyl-furanosid.

### 2. Konstitutionsbeweis für 2.3.6-Trimethyl-1,4-anhydroglucose

Diese neue Substanz [22] und die bekannte isomere 2.3.4-Trimethyl-1,6-anhydroglucose lieferten übereinstimmende Chromatogramme, die beide nur eine einheitliche Bande enthielten. Nach der Methanolyse traten in beiden Chromatogrammen zwei neue Banden auf.

Siefert vom Institut für Makromolekulare Chemie der Universität Freiburg/Brsg.

[\*] Glaswerke Wertheim.

[22] *E. Husemann u. J. Klar*, Makromolekulare Chem. 53, 223 (1962).

Für das unbekannte Produkt entsprachen diese Banden denen des  $\alpha$ - und  $\beta$ -2.3.6-Trimethyl-methylglucosids. Dies beweist, daß 2.3.6-Trimethyl-1.4-anhydroglucose vorgelegen hat.

### 3. Struktur der Maltotriose

Die enzymatische Hydrolyse von Restpullulan [23] mit Pullulanase aus *Aerobacter aerogenes* liefert in quantitativer Ausbeute als einziges Oligosaccharid Maltotriose, für die der einwandfreie Identitätsbeweis noch ausstand. Das nach Methode II b dargestellte Permethylierungsprodukt wurde nach der Methanolysen an einer 1,2-m-Säule, wie im Abschnitt C beschrieben, chromatographiert (siehe Abb. 11). Durch das Ergebnis der quan-

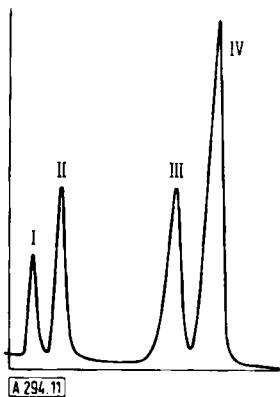


Abb. 11. Gaschromatogramm des Methanolysates von methylierter Maltotriose. Bedingungen (siehe Abschnitt C 2): 140 bis 150 °C;  $\Delta t = 1,6$  °C/min; 1,2-m-Säule.

- I: 2.3.4.6-Tetramethyl- $\beta$ -D-methylglucosid
- II: 2.3.4.6-Tetramethyl- $\alpha$ -D-methylglucosid
- III: 2.3.6-Trimethyl- $\beta$ -D-methylglucosid
- IV: 2.3.6-Trimethyl- $\alpha$ -D-methylglucosid

titativen Auswertung (33,5 % 2.3.4.6-Tetramethyl-methylglucosid und 66,5 % 2.3.6-Trimethylmethylglucosid) ist bewiesen, daß wie in der Maltotriose zwei 1→4-Bindungen vorhanden sind.

### 4. Strukturuntersuchungen an Polysacchariden

#### a) Restpullulan

Die Verknüpfungsweise der Trisaccharid-Einheiten im Pullulan ergab sich erst aus der quantitativen Analyse des Methanolysates des permethylierten Restpullulans (Abb. 12): 0,6 % 2.3.4.6-Tetramethyl-methylglucosid, 31,9 % 2.3.4-Trimethyl-methylglucosid, 67,3 % 2.3.6-Trimethyl-methylglucosid und 0,2 % Dimethyl-methylglucosid (aus einem zweiten Chromatogramm mit stark erhöhter Einspritzmenge ermittelt).

Die gefundene Menge an Tetramethyl-methylglucosid zeigt, daß bei der Methylierung ein geringfügiger Abbau bis zum Molekulargewicht von 50000 eintritt. Einen solchen Abbau beobachteten wir auch beim Erhitzen des Restpullulans mit sehr verdünnter Säure [24].

[23] H. Bender u. K. Wallenfels, Biochem. Z. 334, 79 (1961).

[24] K. Wallenfels u. G. Keilich, unveröffentlicht.

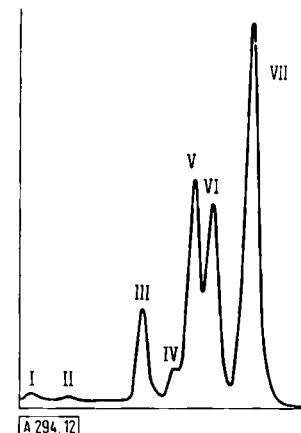


Abb. 12. Gaschromatogramm des Methanolysates von permethyliertem Pullulan. Bedingungen (siehe Abschnitt C 2): 140 bis 155 °C;  $\Delta t = 1,6$  °C/min; 3-m-Säule.

- I: 2.3.4.6-Tetramethyl- $\alpha$ -D-methylglucopyranosid
- II: 2.3.4-Trimethyl- $\beta$ -D-glucosan
- III: 2.3.4-Trimethyl- $\beta$ -D-methylglucopyranosid
- IV: 2.3.6-Trimethyl-methylglucofuranosid
- V: 2.3.6-Trimethyl- $\beta$ -D-methylglucopyranosid
- VI: 2.3.4-Trimethyl- $\alpha$ -D-methylglucopyranosid
- VII: 2.3.6-Trimethyl- $\alpha$ -D-methylglucopyranosid

Der Gehalt von nur 0,2 % Dimethyl-methylglucosid spricht für die völlige Linearität des Restpullulans. Dieses besteht also aus Glucoseketten, die in regelmäßiger Folge abwechselnd durch zwei 1→4-Bindungen und eine 1→6-Bindung verknüpft sind.

#### b) Lösliche Stärke

Permethylierte lösliche Stärke unterwarfen wir einer 24-stündigen Methanolysen und fanden gaschromatographisch 5,2 % 2.3.4.6-Tetramethyl-methylglucosid, 89,9 % 2.3.6-Trimethyl-methylglucosid und 4,9 % 2.3-Dimethyl-methylglucosid.

#### c) Dextran

Nach 90-stündiger Methanolysen von permethyliertem Dextran änderte sich die Zusammensetzung des Methanolysates bei weiterer Methanolysen nicht mehr. Das Verhältnis von Tetra-, Tri- und Dimethyl-methylgluco-

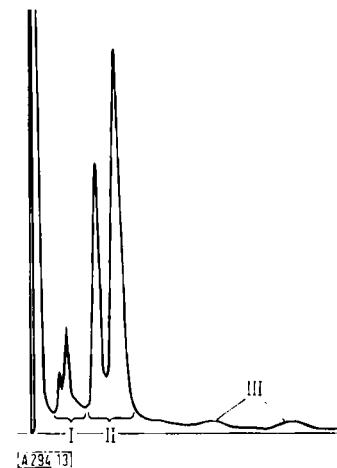
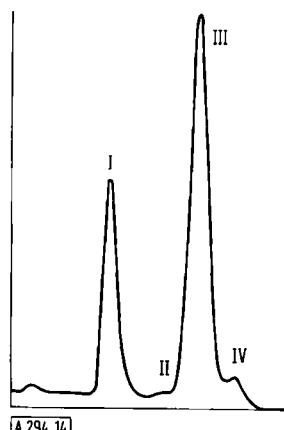


Abb. 13. Gaschromatogramm des Methanolysates von permethyliertem Dextran. Bedingungen (siehe Abschnitt C 2): 180 °C; isotherm; 1,2-m-Säule.

- I: 2.3.4.6-Tetramethyl-D-methylglucosid (7,1 %)
- II: Trimethyl-D-methylglucosid (81,8 % 2.3.4-Trimethyl-methylglucosid und 4,4 % 2.3.6-Trimethyl-methylglucosid)
- III: Dimethyl-methylglucosid (6,7 %)

siden bestimmten wir an einer 1,20 m langen Säule (Abb. 13); die Fraktion der trimethylierten Methylglucoside wurde an einer 3 m langen Säule in ihre Komponenten zerlegt (Abb. 14).



A 294.14

Abb. 14. Gaschromatogramm der Trimethyl-methylglucoside aus permethyliertem Dextran (Fraktion II aus dem in Abb. 13 wiedergegebenen Chromatogramm). Bedingungen (siehe Abschnitt C 2): 140 bis 150 °C;  $\Delta t = 1,6$  °C/min; 3-m-Säule.

- I: 2.3.4-Trimethyl- $\beta$ -D-methylglucosid
- II: 2.3.6-Trimethyl- $\beta$ -D-methylglucosid
- III: 2.3.4-Trimethyl- $\alpha$ -D-methylglucosid
- IV: 2.3.6-Trimethyl- $\alpha$ -D-methylglucosid

Die Dimethyl-methylglucosid-Fraktion (III in Abb. 13) ist mit 2.3-Dimethyl-methylglucosid nicht identisch. Nach Whelan [25] enthält Dextran in erheblichem Umfang 1→3-Bindungen. Wir vermuten daher, daß es sich um 2.4-Dimethyl-methylglucosid handelt, das von den Glucoseresten stammt, die an der Verzweigung beteiligt sind. Das Auftreten von 2.3.6-Trimethyl-methylglucosid und die Abwesenheit des 2.3-Dimethyläthers zeigt, daß die 1→4-Bindungen nicht die Verzweigungen bilden, sondern in der Grundkette vorliegen.

## E. Anhang

### Gaschromatographische Identifizierung von Methyläthern des Glucosamins und Galaktosamins [\*]

Bekannt sind Methoden zur gaschromatographischen Trennung flüchtiger Derivate von Hexosen und Pentosen (Methyläther [26–31], Peracetylverbindungen [32], Trimethylsilyläther [33] u. a. [34]). Wir versuchten, diese Methode auf Derivate von Aminozuckern anzuwenden.

[25] W. J. Whelan, Bull. Soc. Chim. biol. 42, 1570 (1960).

[\*] Von R. Kuhn und H. Egge, mitbearbeitet von W. Lochinger. Auszugsweise vorgetragen von R. Kuhn auf dem 4. Internationalen gaschromatographischen Symposium in Hamburg am 13. Juni 1962 und von H. Egge auf dem Kolloquium über Gaschromatographie am 6. September 1961 in Karlsruhe.

[26] A. G. McInnes, D. H. Ball, F. P. Cooper u. C. T. Bishop, J. Chromatogr. 1, 556 (1958).

[27] H. W. Kircher, Analytic. Chem. 32, 1103 (1960).

[28] C. T. Bishop u. F. P. Cooper, Canad. J. Chemistry 38, 388 (1960).

[29] C. T. Bishop u. F. P. Cooper, Canad. J. Chemistry 38, 793 (1960).

[30] G. A. Adams u. C. T. Bishop, Canad. J. Chemistry 38, 2380 (1960).

Tabelle 1. Relative Retentionswerte [a] bezogen auf  $\alpha$ -Methyl-N-acetyl-3.4.6-trimethyl-glucosaminid = 1.

1 m lange Säule, 10% Polyester auf Kieselgur, 228 °C, 210 cm<sup>3</sup> He/Minute.

Substanz	Retentionsindizes [35]	rel. Retentionswert	Fp [°C]	Lit.
$\alpha$ -Methyl-N-acetyl-3.4.6-trimethyl-glucosaminid	3015	1,00 [b]	153–154	[36]
$\beta$ -Methyl-N-acetyl-3.4.6-trimethyl-glucosaminid	3110	1,37 [b]	199	[37][c]
$\alpha$ -Methyl-N-acetyl-4.6-dimethyl-3-O-acetyl-glucosaminid	3050	1,13	109–110	[d]
$\alpha$ -Methyl-N-acetyl-3.6-dimethyl-4-O-acetyl-glucosaminid	3285	2,53	163	[e]
$\alpha$ -Methyl-N-acetyl-3.4-dimethyl-6-O-acetyl-glucosaminid	3335	3,00	171	[36]
$\alpha$ -Methyl-N-acetyl-3-methyl-4.6-di-O-acetyl-glucosaminid	3555	6,27	167–168	[38]
$\alpha$ -Methyl-N-acetyl-3.4.6-trimethyl-galaktosaminid	3095	1,31 [b]	185–186	[39]
$\beta$ -Methyl-N-acetyl-3.4.6-trimethyl-galaktosaminid	3195	1,82 [b]	232	[39][f]
$\alpha$ -Methyl-N-acetyl-4.6-dimethyl-3-O-acetyl-galaktosaminid	3145	1,56	111–112	[40]
$\alpha$ -Methyl-N-acetyl-3.4-dimethyl-6-O-acetyl-galaktosaminid	3420	3,95	202–203	[40]
$\beta$ -1,6-Anhydro-N-acetyl-3.4-dimethyl-galaktosamin	3050	1,12	108–110	[40]

[a] Angegeben sind Mittelwerte aus mindestens drei Chromatogrammen. Die maximalen Abweichungen betrugen  $\pm 2\%$ .

[b] Im Gegensatz zu den Methylglykosiden methylierter Glucosen und Galaktoseen laufen hier die  $\alpha$ -Methylglykoside schneller als die entsprechenden  $\beta$ -Anomeren.

[c] Die Verbindung entsteht auch bei der direkten Methylierung von N-Acetylglucosamin nach R. Kuhn, H. Trischmann und I. Löw [41].

[d] Die Verbindung wurde aus permethylierter Lacto-N-tetraose [42] gaschromatographisch-präparativ gewonnen.

[e] Die Verbindung wurde aus permethyliertem N-Acetyl-lactosamin [43] nach Methanolysen und Reacetylierung gaschromatographisch-präparativ gewonnen.

[f]  $\beta$ -Methyl-N-acetyl-3.4.6-trimethyl-galaktosaminid entsteht auch bei der direkten Methylierung von N-Acetyl-galaktosamin in Dimethylformamid mit BaO/Ba(OH)<sub>2</sub>·8H<sub>2</sub>O und Dimethylsulfat in Ausbeuten von 10 %.

[31] E. Bayer: Gas-Chromatographie. Springer-Verlag, Heidelberg 1962, S. 133.

[32] J. K. N. Jones u. S. W. Cramer, Chem. and Ind. 1961, 255.

[33] R. Kaiser: Chromatographie in der Gasphase. Bibliographisches Institut, Mannheim 1962, Bd. III, S. 29.

[34] C. T. Bishop in D. Glick: Methods of Biochemical Analysis. Interscience Publishers, New York 1962, Bd. X, S. 1.

[35] A. Wehrli u. E. Kovats, Helv. chim. Acta 24, 2709 (1959).

[36] R. W. Jeanloz, J. Amer. chem. Soc. 74, 4597 (1952).

[37] W. O. Cutler, W. N. Haworth u. S. Peat, J. chem. Soc. (London) 1937, 1979.

[38] R. Kuhn, H. H. Baer u. A. Seeliger, Liebigs Ann. Chem. 611, 236 (1957).

[39] M. Stacey, J. chem. Soc. (London) 1944, 272.

[40] R. W. Jeanloz, D. M. Schmidt u. P. J. Stoffyn, J. Amer. chem. Soc. 79, 2586 (1957).

[41] R. Kuhn, H. Trischmann u. I. Löw, Angew. Chem. 67, 32 (1955).

[42] R. Kuhn u. H. H. Baer, Chem. Ber. 89, 504 (1956).

[43] R. Kuhn u. W. Kirschenlohr, Chem. Ber. 87, 560 (1954).

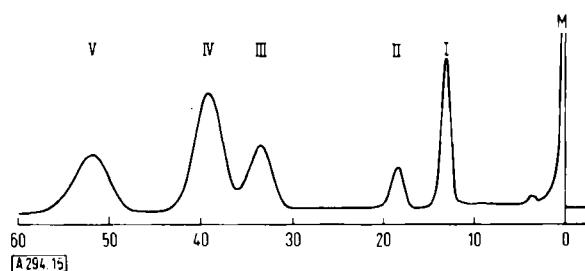


Abb. 15. Quantitative Analyse eines synthetischen Gemisches der Substanzen I-V in 93 mm<sup>3</sup> Methanol. Eingespritzt 3 mm<sup>3</sup> der Lösung, 1 m lange Säule, 10 % Polyester auf Kieselgur, 226 °C, 212 cm<sup>3</sup> He/Minute. M = Methanol. Abszisse: Zeit [min].

		eingewo- gene Menge Gs [mg]	ausgewo- gene Flä- che unter der Kurve Gp [mg]	Gp/Gs
I	$\alpha$ -Methyl-N-acetyl- 3,4,6-trimethyl- glucosaminid	5,45	15,3	2,81
II	$\beta$ -Methyl-N-acetyl- 3,4,6-trimethyl- glucosaminid	2,12	6,1	2,88
III	$\alpha$ -Methyl-N-acetyl-3,6- dimethyl-4-acetyl- glucosaminid	5,43	15,2	2,80
IV	$\alpha$ -Methyl-N-acetyl-3,4- dimethyl-6-acetyl- glucosaminid	10,71	30,0	2,80
V	$\alpha$ -Methyl-N-acetyl-3,4- dimethyl-6-acetyl- galaktosaminid	7,70	20,5	2,67

Als geeignet erwiesen sich methylierte Methyl-N-acetylhexosaminide, deren eventuell noch freie OH-Gruppen acetyliert sind. Solche Verbindungen sind bei  $10^{-3}$  Torr zwischen 120 und 150 °C unzersetzt flüchtig und lassen sich aus permethylierten Oligo- und Polysacchariden leicht durch Methanolyse und anschließende Reacetylierung in Ausbeuten von ca. 80 % erhalten (bei der Methanolyse wird ein Teil der N-Acetylgruppen abgespalten). Die untersuchten Derivate des Glucosamins und Galaktosamins waren durch Schmelzpunkt, Analysen und Vergleich der IR-Spektren mit denen authentischer Derivate charakterisiert worden.

Zur Gaschromatographie verwendeten wir Säulen von 1 m Länge mit einer Füllung von 8 bis 10 % Butanolberstein-säure-polyester [28] auf Kieselgur in einem Gaschromato-graphen Perkin-Elmer 116E. Das Kieselgur (E. Merck für Gaschromatographie) wurde vor dem Belegen mit der flüs-sigen Phase 3 Stunden bei 80 °C mit 2 N NaOH gerührt, mit dest. Wasser neutral gewaschen, dann 3 Stunden mit konz. HCl bei 80 °C gerührt und wieder gewaschen, bis der Ablauf frei von Cl<sup>-</sup>-Ionen war. Von dem bei 160 °C getrockneten Kieselgur wurde die Fraktion mit 0,125 bis 0,175 mm Durch-messer ausgesiebt.

Wir arbeiteten bei Temperaturen zwischen 200 und 250°C und Strömungsgeschwindigkeiten von 70 bis 220 cm<sup>3</sup> He/min. Die Retentionszeiten lagen zwischen 15 Minuten und 2 Stunden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Abbildung 15 zeigt ein Trennbeispiel.

Eingegangen am 2. Juli 1962; ergänzt am 17. Dezember 1962 auf Grund des Vortrags von R. Kuhn „Problems of Methylation“ auf dem Internationalen Symposium über Kohlenhydratchemie in Birmingham, 16. Juli 1962 [vgl. Angew. Chem. 74, 786 (1962)]. Anhang eingegangen am 10. Juni 1963. [A 294]

ZUSCHRIFTEN

## Zur Frage der Zusammensetzung der aus Wolfram-bromid und Lithiumphenyl entstehenden metall-organischen Verbindung des Wolframs

Von Prof. Dr. Brigitte Sarry und Dipl.-Ing. M. Dettke

Anorganisch-Chemisches Institut  
der Technischen Universität Berlin

Wolframpentabromid gibt mit einer ätherischen Lithium-phenyl-Lösung eine metallorganische Verbindung, die von *W. Hanke* dargestellt und als



formuliert wurde [1]. Die Bestimmung des Lithiumgehaltes der Substanz erfolgte seinerzeit durch Solvolyse der Verbindung, Versetzen der Lösung mit überschüssiger Säure und Rücktitration der nicht verbrauchten H<sup>+</sup>-Ionen [2].

Wir haben nun bei direkter Titration der alkalischen Solvolyselösung mit Säure zwei pH-Sprünge festgestellt, von denen der erste nach Verbrauch von zwei Äquivalenten, der zweite nach Verbrauch eines dritten Äquivalentes Säure auftritt. Deshalb bestimmten wir in der austitrierten Lösung das Lithium zusätzlich flammenphotometrisch und fanden dabei ein Atomverhältnis Li:W = 2:1. Die Neutralisation des durch Hydrolyse entstandenen LiOH verursacht demnach den ersten pH-Sprung. Bei einer Rücktitration erhält man naturgemäß nur die Summe der insgesamt verbrauchten  $\text{H}^+$ -Ionen. Die nach der von Hanke angegebenen Vorschrift dargestellte Verbindung enthält also zwei Lithiumphenyl pro

Wolframatom. Da sie sich – wie Molekulargewichtsbestimmungen zeigen – ohne jede Dissoziation löst, wird sie am besten als



formuliert. Diese Formel steht mit dem Diamagnetismus in Einklang.

Eingegangen am 16. September 1963 [Z 581]

[1] H. Funk u. W. Hanke, Angew. Chem. 71, 408 (1959).

[2] W. Hanke, Dissertation Halle 1959; B. Sarry, Angew. Chem. 71, 776 (1959).

## Sulfimine aus Sulfoxiden mit N-Sulfinyl-sulfonamiden

Von Dr. Gerhard Schulz und Prof. Dr. G. Kraatz

Organisch-chemisches Institut der TH München

Wie Aldehyde und Formamide reagieren auch Sulfoxide mit N-Sulfinyl-sulfonamiden (1) nach Art einer Wittig-Reaktion; unter SO<sub>2</sub>-Abspaltung werden N-Sulfonyl-sulfimine (2) gebildet.

