

das Mercaptan abscheidet. Es wird wie üblich über das Natriumsalz gereinigt. Nach dem Ausfällen mit Salzsäure trennen sich die Schichten schlecht; man setzt daher zur besseren Trennung 50 ccm Äther zu, trocknet über Natriumsulfat, destilliert den Äther ab und fraktioniert das Benzylmercaptan bei 193–195°; Ausb. 105 g (85% d.Th.).

Dithioglykol wird aus 2 Mol Kaliumsulfhydrat und $\frac{1}{2}$ Mol (94 g) Äthylendibromid bei 45° dargestellt und wie das Benzylmercaptan aufgearbeitet. Die Ausbeute an Dithioglykol vom Sdp. 144–146° beträgt 30 g (69% d.Th.).

136. Richard Kuhn, Adeline Gauhe und Hans Helmut Baer: Über ein N-haltiges Tetrasaccharid aus Frauenmilch

[Aus dem Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Heidelberg.
Institut für Chemie]

(Eingegangen am 20. April 1953)

Aus Frauenmilch konnte ein in feinen Nadeln kristallisierendes Tetrasaccharid gewonnen werden, das bei der Hydrolyse 1 Mol. Glucosamin + 2 Moll. Galaktose + 1 Mol. Glucose + 1 Mol. Essigsäure liefert. Aus wasserhaltigem Alkohol erhält man ein Hydrat der α -Form. Die Anfangsdrehung des wasserfreien Tetrasaccharids beträgt $[\alpha]_D^{25}$: +38°, die Enddrehung +25.5° (in Wasser).

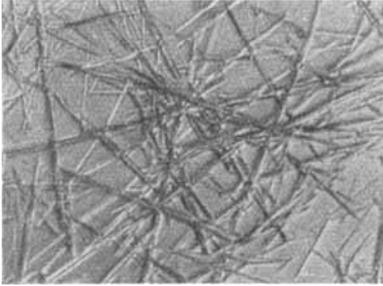
Untersuchungen über den Bifidus-Faktor¹⁾ haben zu der Erkenntnis geführt, daß in der Frauenmilch neben Lactose eine Reihe von Oligosacchariden vorkommen, die papierchromatographisch getrennt werden konnten²⁾. Die als IIIc bezeichnete Komponente ($R_{Lactose} = 0.38$ in Pyridin: Essigester: Wasser = 1:2:2), die schätzungsweise 5–10% des Oligosaccharid-Gemisches ausmacht und sich durch ihre Rechtsdrehung von den langsamer wandernden linksdrehenden Komponenten abhebt sowie frei von Fucose ist, ließ sich durch Chromatographie an Kohle-Celite-Säulen so weit anreichern, daß es gelang, sie in kristallisierter Form zu gewinnen. Aus wenig Wasser scheidet sie sich auf Zusatz von Alkohol in feinen, gerade auslöschenden Nadeln ab (Abbild. 1), die sich aus wasserhaltigem Alkohol leicht umkristallisieren lassen und dann papierchromatographisch einheitlich sind. Die lufttrockenen Nadeln verlieren, wenn man sie bei 110° trocknet, 10.6% an Gewicht unter Erhaltung der Kristallstruktur, wie an Debye-Scherrer-Aufnahmen festgestellt werden konnte. Bei 200–205° beginnt Zersetzung unter Braunfärbung; der Geschmack ist kaum süß.

Beim Liegen an der Luft nimmt die bei 110° getrocknete Substanz das Kristallwasser teilweise wieder auf. Das Drehungsvermögen der frisch bereiteten Lösung in Wasser strebt mit einer Halbwertszeit von 30 Min. dem Endwert von $[\alpha]_D^{25}$: +25.5° zu (Abbild. 2). Die für $t=0$ extrapolierte Anfangsdrehung beträgt $[\alpha]_D^{25}$: +38° (Wasser). Die Substanz gibt nach 5 Min. langem Erhitzen mit 0.05 n Soda-Lösung auf 100° mit salzsaurer alkohol.

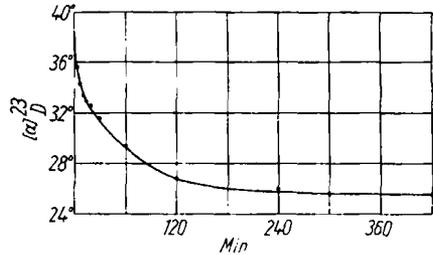
¹⁾ P. György, *Pediatrics* 11, 98 [1953]; R. Kuhn, *Angew. Chem.* 64, 493 [1952].

²⁾ A. Gauhe, P. György, J. R. E. Hoover, R. Kuhn, C. S. Rose, H. W. Ruelius u. F. Zilliken, *J. biol. Chemistry* (im Druck [1953]).

Lösung von *p*-Dimethylamino-benzaldehyd intensive Violettfärbung (Morgan-Elson); sie reduziert Fehlingsche Lösung in der Hitze.

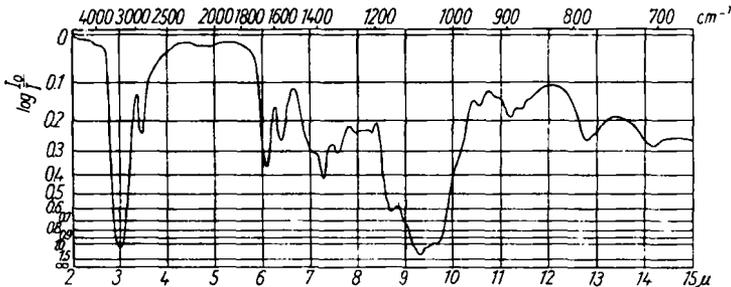


Abbild. 1. Lacto-*N*-tetraose aus 80-proz. Äthanol



Abbild. 2. 68.2 mg bei 110° getrocknete Substanz in 3 ccm Wasser, 1-dm-Rohr; 23°, D-Licht

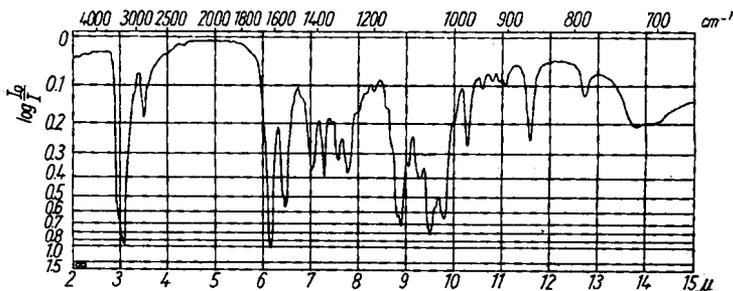
Aus dem Stickstoffgehalt (ber. N 1.98%, gef. 2.00%) und dem Verbrauch an Hypojodit (ber. Mol.-Gew. 708, gef. 690) folgt, daß ein Tetrasaccharid vorliegt. Nach durchgreifender saurer Hydrolyse findet man papierchromatographisch Glucosamin³⁾, Galaktose und Glucose. Der Galaktose-Fleck ist stärker als derjenige der Glucose (saures Anilinphthalat). Durch Oxydation mit Salpetersäure zu Schleimsäure ergab sich, daß 2 Moll. Galaktose vorliegen; durch Vergärung von Hydrolysaten mit Hefe, daß 1 Mol. Glucose am



Abbild. 3. Ultrarot-Spektrum von Tetrasaccharid

Aufbau des Tetrasaccharids beteiligt ist. Nach partieller Säurehydrolyse ließ sich *N*-Acetyl-glucosamin an seinem R_F -Wert erkennen. Das Ultrarotspektrum (Abbild. 3 u. 4) zeigt bei 6.10 und 6.43 μ die für $\text{-NH}\cdot\text{CO-}$ charakteristischen Banden. Für das N-haltige, in der Frauenmilch vorkommende Tetrasaccharid schlagen wir den Namen Lacto-*N*-tetraose vor.

³⁾ Aus dem Gemisch der Oligosaccharide der Frauenmilch ist kristallisiertes *d*-Glucosamin-hydrochlorid bereits²⁾ erhalten worden.

Abbild. 4. Ultrarot-Spektrum von *N*-Acetylglucosamin

Der Firma Rohm & Haas Company, Philadelphia, USA, danken wir für die Überlassung von Amberliten, den Farbwerken Bayer, Leverkusen, für die Überlassung von Carboraffin.

Hrn. Dr. W. Otting danken wir für die Ultrarot-Aufnahmen, Hrn. E. Röhm für die Debye-Scherrer-Aufnahme. Für eifrige präparative und analytische Hilfe haben wir Frln. D. Tschampel, Frln. A. Seeliger und Frln. E. Crummenerl-Pollich zu danken.

Beschreibung der Versuche

Die chromatographische Reinigung der Kohle-Eluate²⁾ aus Frauenmilch erfolgte nach dem von R. L. Whistler und D. F. Durso⁴⁾ angegebenen Prinzip. Die Säulen waren mit Carboraffin : Celite 535 (1:1) beschickt. Die Desorption erfolgte mit steigenden Konzentrationen von Alkohol (mit 2,5% Methanol vergällt) in Wasser⁴⁾. Im allgemeinen waren die mit 15–20-proz. Alkohol gewonnenen Eluate anfangs linksdrehend; dann folgten rechtsdrehende Anteile, zuletzt wieder linksdrehende Fraktionen. Die rechtsdrehenden Anteile schickten wir durch neue Carboraffin-Celite-Säulen, wobei Wasser und 5-proz. Alkohol nur wenig eluierten. Bei 10–15% Alkohol folgte IIIc, das noch von I, IIa und IIb begleitet war. Der Trockenrückstand eines solchen Eluates (3,0 g) wurde in 10 ccm Wasser gelöst, nach Zusatz von Tierkohle filtriert und mit 20 ccm absol. Alkohol versetzt. Dabei fielen Flocken aus, worauf zum Sieden erhitzt und heiß filtriert wurde. Dem Filtrat setzten wir weitere 20 ccm heißen absol. Alkohol zu. Beim Erkalten und Reiben mit einem Glasstab bildete sich ein dicker Brei von Kristallnadeln, der nach mehreren Stunden (4^o) abgesaugt und zunächst mit eiskaltem 90-proz., dann mit 96-proz. Alkohol gewaschen wurde; Ausb. 1,82 g. Umkristallisiert wurde aus 7,5 ccm Wasser (filtrieren) + 22,5 ccm absol. Alkohol; Ausb. 1,35 g (exsiccator-trocken).

Zur Analyse wurde bei 110^o/5 Torr über Diphosphorpentoxid getrocknet. Die letzten Reste an Asche (Celite) ließen sich auch durch wiederholtes Umkristallisieren, wobei die Vorfällungen mit Alkohol verworfen wurden, nicht entfernen. Die bei 110^o getrocknete Substanz ist hygroskopisch. Eine Probe nahm an der Luft 8,19% an Gewicht zu, was 3,22 Moll. H₂O je Mol. Tetrasaccharid entspricht.

$C_{26}H_{45}O_{21}N$ (707,6) Ber. C 44,13 N 1,98 $CO \cdot CH_3$ 6,08 Äquiv.-Gew. 707,6
 Gef. C 43,26^{*)} H 6,32^{*)} N 1,93^{□)} $CO \cdot CH_3$ 6,49^{×)} Äquiv.-Gew. 700,0^{†)}
 Gef. C 44,91^{†)} H 6,47^{†)} N 2,07^{□)} $CO \cdot CH_3$ 6,89^{×)} Äquiv.-Gew. 679,0^{†)}

^{*)} Aschegeh. 1,07%; $OC_2H_5 = 0,70\%$.

^{□)} Dumas.

^{†)} Aschegeh. 1,11%; $OC_2H_5 = 0,75\%$ (lufttrocken). ^{×)} Verseifung mit 25-proz. *p*-Toluolsulfonsäure.

^{†)} Mit Hypojodit nach M. Macloed u. R. Robison (Biochem. J. 23, 517 [1929]).

Durch Reinigung über die chloroformlösliche Peracetyl-Verbindung, die mit methanolischem Ammoniak verseift wurde, gelang es, die Lacto-*N*-tetraose frei von Asche zu gewinnen und richtige C—H-Werte zu erhalten.

$C_{26}H_{45}O_{21}N$ (707,6) Ber. C 44,13 H 6,41 Gef. C 44,37 H 6,35

⁴⁾ J. Amer. chem. Soc. 72, 677 [1950].

Bestimmung der Galaktose: Je 98.5 mg Sbst. wurden mit 1.2 ccm Salpetersäure (d 1.15) im siedenden Wasserbad im Laufe von $1\frac{1}{2}$ —2 Stdn. auf 0.4 ccm eingedampft. Zum Vergleich dienten 2 Mischungen von je 50 mg Galaktose⁵⁾ + 25 mg Glucose + 25 mg *N*-Acetyl-glucosamin. Die Ausbeuten an kristallisierter Schleimsäure betragen: 28.9 und 24.7 mg aus dem Tetrasaccharid, 35.7 und 33.2 mg aus dem Vergleichsgemisch. In % d.Th. wurden aus IIIc erhalten: 50% und 42%, aus den Vergleichsversuchen 60% und 57%. Das Ergebnis spricht für einen Gehalt von 2 Moll. Galaktose.

Bestimmung der Glucose: Diese erfolgte durch Vergärung (nach Hydrolyse) mit Bäckerhefe bei 28°. Da die angewandte Hefe aus reiner Glucose etwas weniger als die berechnete Menge an Kohlendioxyd bildete, ließen wir in der Warburg-Apparatur zum Vergleich mit den Hydrolysaten des Tetrasaccharids gleichzeitig Lösungen von reiner Glucose gären. Auch wurden zum Vergleich künstliche Gemische von Glucosamin-hydrochlorid: Galaktose: Glucose = 1:2:1 herangezogen.

20.05 mg IIIc wurden in einer zugeschmolzenen Ampulle 16 Stdn. mit 1 ccm $2n$ H₂SO₄ auf 97° erhitzt. Nach Neutralisation mit Bariumhydroxyd (auf p_H 8) wurde zentrifugiert und das Bariumsulfat 3mal mit heißem Wasser gewaschen. Je 1 ccm der auf genau 5 ccm gebrachten Lösung versetzten wir mit 1 ccm 1-proz. KH₂PO₄-Lösung + 0.5 ccm einer 2-proz. Suspension von Bäckerhefe, die 2mal mit 1-proz. KH₂PO₄-Lösung gewaschen worden war.

Es wurden folgende CO₂-Mengen (cmm) gebildet:

Versuchs-Nr.*) (Gärdauer)	1.02 mg Glucose	Vergleichsgemisch mit 1.02 mg Glucose	Hydrolysat entspr. 1.02 mg Glucose
I (275 Min.)	—	206	220; 206
II (70 Min.)	159	164	169; 171
III (120 Min.)	182; 178	—	179; 191

*) Die Versuche I—III sind an verschiedenen Tagen mit verschiedenen Hefen durchgeführt worden.

137. J. P. Wibaut: Über Bis-[pyridyl]-ketone. Bemerkung zur Abhandlung von Wilhelm Mathes und Walter Sauermilch*): Notiz über Bis-[α -pyridyl]-ketone

[Aus dem Laboratorium für Organische Chemie der städtischen Universität Amsterdam]
(Eingegangen am 15. Juni 1953)

Es wird auf die vom Verfasser in den Jahren 1950 und 1951 durchgeführten Synthesen von Bis-[pyridyl]-ketonen hingewiesen.

In der obengenannten Abhandlung beschreiben Mathes und Sauermilch*) die Umsetzung von α -Pyridyl mit Bleioxyd in der Hitze, wobei Bis-[α -pyridyl]-keton erhalten wird. Die Autoren bemerken, daß dieses heterocyclische Analogon des Benzophenons noch nicht bekannt war. Demgegenüber ist festzustellen, daß verschiedene Bis-[pyridyl]-ketone im Jahre 1951 von mir und meinen Mitarbeitern beschrieben worden sind. Nach der von uns gefundenen Methode^{1,2)}, Umsetzung von Lithium-pyridylen mit Cyan-

⁵⁾ Unter der Annahme, daß das Tetrasaccharid 2 Moll. Galaktose enthält, entspricht die Einwaage von 98.5 mg Lacto-*N*-tetraose einem Galaktosegehalt von 50 mg.

*) W. Mathes u. W. Sauermilch, Chem. Ber. 86, 109 [1953].

¹⁾ J. P. Wibaut, Recherches sur la Synthèse dans la série de la pyridine, Chim. et Ind. 63, 609 [1950].

²⁾ J. P. Wibaut, A. P. de Jonge, H. G. P. van der Voort u. P. Ph. H. L. Otto, Rec. trav. chim. Pays-Bas 70, 1054 [1951].