

menge blieb verharzt im Kolben zurück. Das Öl erwies sich bei der Analyse als Gemisch aus etwa 43% des gewünschten Ketals und 57% Enolmethyläther:

Für Ketal  $C_7H_{14}O_3$  (146.1) Ber.  $OCH_3$  42.4

Für Enoläther  $C_6H_{10}O_2$  (114.1) Ber.  $OCH_3$  27.2 Gef.  $OCH_3$  33.18 (nach Arndt<sup>32</sup>))

Das UV-Spektrum dieses Enoläther-Ketal-Gemisches zeigte in Methanol bei sofortiger Messung  $\lambda_{max} = 247 m\mu$  ( $\epsilon = 6500$ )<sup>12</sup>).

Die „Säure-Spaltung“ der untersuchten  $\beta$ -Diketone wurde durch den zeitlichen Abfall der  $\epsilon$ -Werte der langwelligen Enolat-Bande in 5 n Natronlauge bei Zimmertemp. verfolgt:

Tafel 3. Abfall der Extinktion der längstwelligen Bande beim Stehenlassen der Lösung in 5 n Natronlauge

$\beta$ -Diketon	$\epsilon_{max}$					
	nach 5	10	15	20	30	60 Min.
VII. Acetylaceton*)	—	—	10000	7000	2400	300
VIII. 2-Acetyl-cyclohexanon	11000	7100	—	4000	2000	—
IV. „Spiran“	22700	—	—	—	—	22700

\*) Messung von E. Merkel<sup>12</sup>).

Durch graphische Extrapolation wurden für die Enolate von VII und VIII die in Spalte 5 der Tafel 1 (S. 110) eingetragenen Werte ermittelt.

Die UV-Spektren wurden mit Hilfe eines Beckman-DU-Quarz-Spektrophotometers (1 cm Küvettenlänge) aufgenommen.

Die Methoxybestimmungen „nach Arndt“ und die meisten Elementar-Analysen wurden vom Mikrolaboratorium des Forschungsinstituts für die Chemie des Holzes und der Polysaccharide, Heidelberg, die übrigen im Untersuchungslaboratorium der BASF ausgeführt.

## 16. Richard Kuhn und Reinhard Brossmer, mitbearbeitet von Walter Schulz: Über die prosthetische Gruppe der Mucoproteine des Kuh-Colostrums

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

(Eingegangen am 9. November 1953)

Mit verdünnter Säure ( $p_H \sim 1$ ) läßt sich aus der durch Dialyse gereinigten Mucoprotein-Fraktion des Kuh-Colostrums eine schön kristallisierende, niedrigmolekulare Substanz abspalten, deren Eigenschaften mit denjenigen der Sialinsäure von G. Blix und der Methoxyverbindung der Neuraminsäure von E. Klenk verglichen werden.

Die Hämagglutination durch Influenza-Virus<sup>1)</sup> wird durch zahlreiche Mucoproteine bzw. Mucopolysaccharide gehemmt<sup>2)</sup>. A. Gottschalk<sup>3)</sup> fand, daß unter der Einwirkung des Influenza-Virus aus diesen Substanzen eine stick-

<sup>1)</sup> G. K. Hirst, J. exp. Med. **76**, 195 [1942]; **78**, 99 [1943].

<sup>2)</sup> F. M. Burnet, Austral. J. exp. Biol. med. Sci. **26**, 403 [1948]; Proc. Roy. Soc. [London], Ser. B. **188**, 47 [1951]; I. Tamm u. F. L. Horsfall, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **74**, 108 [1950]; J. exp. Med. **95**, 71 [1952].

<sup>3)</sup> Nature [London] **167**, 845 [1951].

stoffhaltige Verbindung in Freiheit gesetzt wird, die er für ein N-substituiertes Fructosamin hielt<sup>4)</sup>. L. Odin<sup>5)</sup> erkannte, daß die auf die Agglutination durch Influenza-Virus hemmend wirkenden Produkte aus Eiklar, Ovomuclin, Allantois-Flüssigkeit, Ovarial-Cysten, Follikelflüssigkeit u. a. beim Erwärmen mit salzsaurem *p*-Dimethylamino-benzaldehyd nach P. Ehrlich – ohne vorangehende Einwirkung von Alkali – eine purpurrote Farbreaktion geben. Diese führte er auf einen Gehalt an Sialinsäure zurück, die I. Werner<sup>6)</sup> auch in dem von R. J. Winzler<sup>7)</sup> und K. Schmid<sup>8)</sup> aus Blutplasma isolierten sauren Mucoprotein nachgewiesen hatte. Bereits 1936 konnte G. Blix<sup>9)</sup> aus Submaxillaris-Mucin Sialinsäure kristallisiert gewinnen, die aber aus anderen Mucinen bisher noch nicht isoliert worden ist. Noch ehe die Entwicklung auf dem Virus-Gebiet einsetzte, hat N. Hiyama<sup>10)</sup> die Aufklärung der die Ehrlich-Reaktion direkt gebenden Strukturen der Mucine als „very fascinating problem“ bezeichnet und durch alkalischen Abbau einer amorphen prosthetischen Gruppe des Submaxillaris-Mucins Pyrrol- $\alpha$ -carbonsäure erhalten. E. Klenk und K. Lauenstein<sup>11)</sup> verdankt man die wichtige Feststellung, daß sich aus den virus-hemmenden Mucoproteinen des Harns und der Submaxillarisdrüsen durch Erhitzen mit methanolischer Salzsäure auf 105° die gut kristallisierende Methoxy-Verbindung der Neuraminsäure gewinnen läßt, die E. Klenk 1941 als Abbauprodukt von Gangliosiden entdeckt hatte<sup>12)</sup>. Nach dem Verfahren von E. Klenk konnte auch aus Mucopolysacchariden der Frauenmilch<sup>13)</sup> und aus dem Stroma von Pferde-Erythrocyten<sup>14)</sup> die Methoxy-Verbindung der Neuraminsäure erhalten werden.

Im Zusammenhang mit den dargelegten Problemen<sup>15)</sup> haben wir die mit Ehrlichs Aldehyd direkt Farbstoff bildende Substanz der Kuhmilch (L. Odin)<sup>5)</sup> näher untersucht und gefunden, daß Kuh-Colostrum daran noch reicher ist. Die Farbstoff bildenden Mucoproteine dialysieren nicht durch Cellophan und lassen sich im Gegensatz zu anderen Proteinen des Colostrums weder durch Erhitzen noch durch Trichloressigsäure oder Sulfosalicylsäure in der Kälte fällen.

Aus den durch Dialyse gereinigten Mucoprotein-Fractionen kann man durch verdünnte Säure in der Wärme eine niedrigmolekulare, leicht dialysierende stickstoffhaltige Substanz gewinnen, die auf dem im Versuchsteil beschrie-

<sup>4)</sup> Siehe auch A. Gottschalk, *Nature* [London] **170**, 662 [1952].

<sup>5)</sup> *Nature* [London] **170**, 663 [1952].

<sup>6)</sup> I. Werner u. L. Odin, *Acta Soc. med. Upsal.* **57**, 230 [1952].

<sup>7)</sup> R. J. Winzler und Mitarbb., *J. biol. Chemistry* **185**, 561 [1950].

<sup>8)</sup> *J. Amer. chem. Soc.* **72**, 2816 [1950].

<sup>9)</sup> *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **240**, 43 [1936].

<sup>10)</sup> *Tohoku J. exp. Med.* **51**, 319 [1948].

<sup>11)</sup> *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **291**, 147 [1952].

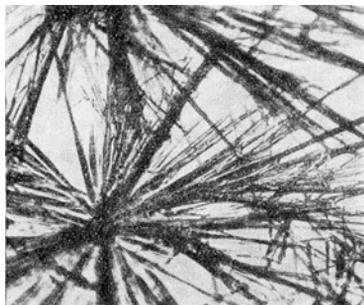
<sup>12)</sup> *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **268**, 50 [1941].

<sup>13)</sup> J. R. E. Hoover, G. A. Braun u. P. György, *Arch. Biochem. Biophysics* (i. Druck).

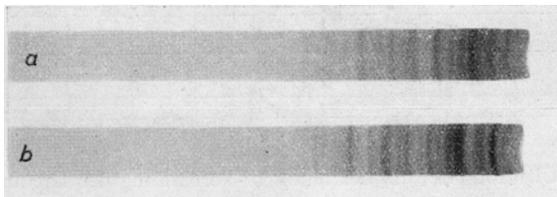
<sup>14)</sup> T. Yamakawa u. S. Suzuki, *J. Biochemistry* [Tokyo] **38**, 199 [1951]; **39**, 175 [1952].

<sup>15)</sup> Siehe auch K. Hummeler, P. György, J. R. E. Hoover u. R. Kuhn, *Science* [Washington] (i. Druck).

benen Wege kristallisiert erhalten worden ist. Ob es sich um die intakte prosthetische Gruppe oder aber bereits um ein Abbau-Produkt derselben handelt, bedarf noch der Prüfung. Die gewonnenen schneeweißen Nadeln (Abbild. 1) zersetzen sich unter Schwarzfärbung bei 183–185°, nachdem erst kurz vorher zunehmende Bräunung einsetzt. In Abbild. 2 sind Debye-Scherrer-Aufnahmen der Methoxy-Verbindungen der Lactaminsäure (a) und der Neuraminsäure (b) wiedergegeben.



Abbild. 1. Prosthetische Gruppe aus den Mucoproteinen des Kuh-Colostrums, umkristallisiert aus Methanol-Äther-Petroläther

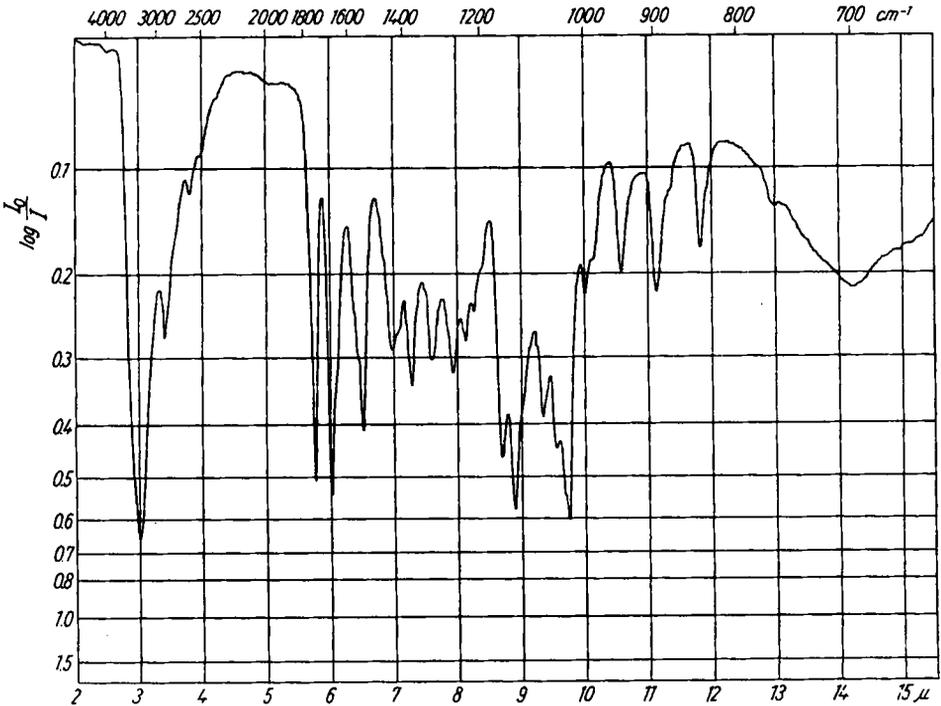


Abbild. 2. Debye-Scherrer-Aufnahmen der Methoxy-Verbindungen der Lactaminsäure (a) und der Neuraminsäure (b)

Die Substanz gibt beim Erwärmen mit salzsaurer *p*-Dimethylamino-benzaldehyd-Lösung (Ehrlich), ohne Vorbehandlung mit Alkali, starke Rotfärbung. Mit einer salzsaurer Lösung von Orcin (Bial) in der Wärme tritt ein violettstichig roter Farbstoff auf, der mit bläulich roter Farbe in Amylalkohol geht. Kocht man mit 2 *n* Salzsäure, so färbt sich die Lösung zunehmend braun und scheidet bald braunschwarze Flocken ab. Mit hochverd. Eisen(III)-chlorid-Lösung tritt eine lebhaft gelbe Färbung auf. Zur Lokalisierung auf Papierchromatogrammen ist Einwirkung von  $\text{Cl}_2$ gas und anschließende Behandlung mit einer alkoholisch-wässrigen Lösung von Benzidin-Hydrochlorid, die eine Spur von  $\text{NaJ}$  enthält, geeignet. Man erhält Blaufärbung, die nach etwa  $\frac{1}{2}$  Stde. in Violett übergeht und später verbleibt<sup>16)</sup>. In *sek.* Butanol: Eisessig: Wasser = 4:1:5 wandert die kristallisierte Substanz aus Kuh-Colostrum einheitlich mit einem  $R_F$ -Wert von 0.85 (Methoxyneuraminsäure 0.72). In *sek.* Butanol: Aceton: Eisessig: Wasser = 3:3:1.5:2.5 ist  $R_F = 0.69$  (Methoxyneuraminsäure 0.37). Mit saurem Anilinphtalat bekommt man keine

<sup>16)</sup> Vergl. H. N. Rydon u. P. W. G. Smith, Nature [London] 169, 922 [1952]; R. Kuhn, F. Zilliken u. A. Gauhe, Chem. Ber. 86, 466 [1953].

braune Färbung. Fehlingsche Lösung wird auch in der Siedehitze nicht reduziert; Hypojodit unter den Bedingungen von M. Macloed und R. Robinson<sup>17)</sup> nicht verbraucht. Die Ninhydrin-Probe ist völlig negativ, auch in streng neutraler Lösung.



Abbild. 3. Ultrarotspektrum der Methoxy-Verbindung der Lactaminsäure

Die bisher durchgeführten Elementaranalysen, die wir als vorläufig betrachten, sprechen für die Bruttoformel  $C_{11}H_{19}O_9N$ . Die Substanz enthält weder Phosphor noch Schwefel (Schmelze mit Kaliummetall). Sie enthält eine Methoxyl-Gruppe und gibt bei der Oxydation mit Chromsäure 1 Mol. flüchtige Säure (Essigsäure). Auch bei der Verseifung mit *p*-Toluolsulfonsäure tritt 1 Mol. flüchtige Säure auf. Bei der katalytischen Hydrierung mit  $PtO_2$  in Eisessig wurden nur sehr langsam nahezu 2 Moll.  $H_2$  aufgenommen. Allem Anschein nach liegt die Methoxy-Verbindung einer noch unbekannt Substanz vor, für die wir im Einvernehmen mit Herrn Prof. Dr. E. Klenk den Namen Lactaminsäure vorschlagen. Eine Gegenüberstellung der Eigenschaften von Sialinsäure<sup>9)</sup> mit denen der Methoxy-Verbindungen von Lactaminsäure und Neuraminsäure ergibt Übereinstimmung in den Farbreaktionen nach Ehrlich (direkt) und Bial sowie in der Huminbildung mit Mineralsäure, jedoch folgende Unterschiede:

<sup>17)</sup> Biochem. J. **23**, 517 [1929].

Eigenschaft	Sialinsäure	Methoxy-Verb. der Lactaminsäure	Methoxy-Verb. der Neuraminsäure
Schmp. (Zers.) . . . . .	140—150°	183—185°	199—200°
Bruttoformel . . . . .	C <sub>14</sub> H <sub>23</sub> O <sub>11</sub> N	C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> O <sub>9</sub> N	C <sub>11</sub> H <sub>21</sub> O <sub>9</sub> N
in CH <sub>3</sub> OH . . . . .	sehr leicht	sehr leicht	schwer löslich
Fehling . . . . .	reduziert	—	—
Ninhydrin . . . . .	—	—	positiv

Es ist anzunehmen, daß zwischen diesen drei Substanzen nahe chemische Beziehungen bestehen, die aber noch der Klärung bedürfen.

### Beschreibung der Versuche

Von den verschiedenen Wegen, die wir besprochen haben, sei der folgende, verhältnismäßig kurze beschrieben:

1) Entrahmung des Colostrums (Zentrifuge), 2) Dialyse des Mager-Colostrums (Cellophan) gegen fließendes Leitungswasser, wobei das Volumen um 60% zunimmt, 3) De-proteinisierung durch Säure und 4) Abspaltung der prosthetischen Gruppe durch 40 Min. langes Erhitzen auf 70—80° bei  $p_H \sim 1$ , wobei keine Huminbildung stattfindet, 5) Neutralisation und Entsalzung, 6) Chromatographie aus wäßriger Lösung durch Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Säulen, Waschen mit dest. Wasser, 7) Elution der Ehrlich-positiven Substanzen mit  $n/_{20}$  NaOH, 8) Entfernung des Alkalis durch Kationenaustauscher, 9) Verdampfen i. V. und Gefriertrocknung, 10) Lösen des Rückstandes in wenig absol. Methanol und Fällung von Begleitstoffen durch trockenen Äther, 11) Versetzen des Filtrats mit steigenden Mengen von Petroläther (Sdp. 30—40°), wobei Kristallisation eintritt, 12) Umkristallisieren aus Methanol-Äther-Petroläther (Abbild. 1). Zur Analyse wurde über Kieselgel bei etwa 20° i. Hochvak. getrocknet.

C<sub>11</sub>H<sub>19</sub>O<sub>9</sub>N (309.3) Ber. C 42.72 H 6.19 N 4.53 OCH<sub>3</sub> 10.02 CH<sub>3</sub>CO 13.90  
Gef. C 42.39 H 6.25 N 4.53 OCH<sub>3</sub> 8.96 CH<sub>3</sub>CO 13.71

Für eine nicht ganz so reine Substanz fanden wir

C 42.26 H 6.70 (C)CH<sub>3</sub> 5.48 (ber. 4.85)

und  $[\alpha]_D^{20}$ : -35° ( $c = 1.00$ ) in absol. Methanol.

Herrn Dr. W. Otting danken wir für das Ultrarot-Spektrum, Herrn E. Röhm für die Debye-Scherrer-Aufnahme und Herrn Prof. Dr. E. Klenk für die Überlassung von Neuraminsäure (Methoxy-Verbindung).

## 17. Hans Plieninger: Notiz über die Alkylierung des Indols

[Aus dem Forschungslaboratorium der Knoll A.G., Ludwigshafen a. Rhein, und dem Chemischen Institut der Universität Heidelberg]

(Eingegangen am 14. November 1953)

Indol wird in flüssigem Ammoniak ausschließlich am Stickstoff alkyliert.

Das Indol liefert bekanntlich bei der Alkylierung, je nach den Versuchsbedingungen, N- oder C-Alkyl-Derivate. Bei der Suche nach einer Methode der ausschließlichen Benzylierung des Indols am Stickstoff fanden wir folgendes:

1. Die Umsetzung des Indol-natriums mit Benzylchlorid führte unter den verschiedensten Bedingungen stets zu Gemischen mit wechselnden Anteilen an N- und 3-Benzyl-indol.