

CHEMISCHE BERICHTE

Fortsetzung der

BERICHTE DER DEUTSCHEN CHEMISCHEN GESELLSCHAFT

87. Jahrg. Nr. 3

S. 289 – 446

45. Richard Kuhn, Adeline Gauhe und Hans Helmut Baer: Über die Lacto-*N*-tetraose und ihre Beziehungen zu den fucose-haltigen Oligosacchariden der Frauenmilch

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

(Eingegangen am 24. Dezember 1953)

Bei partieller Säurehydrolyse der Lacto-*N*-tetraose treten auf: 2 stickstoffhaltige Trisaccharide und 3 Disaccharide, von denen 2 stickstoffhaltig sind. Der reduzierende Baustein der Tetraose ist *d*-Glucose. Das stickstofffreie Disaccharid wurde als α -Lactose-hydrat identifiziert. Der Bauplan der Lacto-*N*-tetraose ist: > *d*-Glucose > *d*-Galaktose > *N*-Acetyl-*d*-glucosamin > *d*-Galaktose. Von den beiden stickstoffhaltigen Disacchariden zeichnet sich das eine, nämlich die schön kristallisierende Lacto-*N*-biose I, durch überraschend hohe Alkaliempfindlichkeit aus. Schon in der Kälte bei p_H 9–10 erfolgt Zerfall in *d*-Galaktose und Anhydro-*N*-acetyl-*d*-glucosamin (AAG). Es wird erörtert, wie weit sich aus der Farbreaktion mit *p*-Dimethylamino-benzaldehyd (Morgan-Elson) Schlußfolgerungen auf die Konstitution von *N*-Acetyl-hexosamin-Derivaten ziehen lassen.

Im Oligosaccharid-Gemisch der Frauenmilch nimmt die Lacto-*N*-tetraose eine zentrale Stellung ein, denn sie entsteht bei gelinder Säure-Einwirkung – unter Abspaltung von *l*-Fucose – auch aus weiteren Komponenten des Bifidus-Faktors.

Das kristallisierte, aus Frauenmilch isolierte stickstoffhaltige Tetrasaccharid, das wir unter dem Namen Lacto-*N*-tetraose¹⁾ beschrieben haben, gab bei der Oxydation mit Hypojodit das für eine reduzierende Tetraose erwartete Äquivalentgewicht und nach 5 Min. langem Erhitzen mit 0.05 *n* Na₂CO₃ auf 100° mit salzsaurer alkoholischer Lösung von *p*-Dimethylamino-benzaldehyd intensive Violettfärbung (Morgan-Elson). Da diese Farbreaktion von freiem *N*-Acetyl-glucosamin gegeben wird, nicht aber von dessen glucosidischen Derivaten (α - und β -Methyl-²⁾, α - und β -Benzyl-*N*-acetyl-*d*-glucosaminid u. a.³⁾), hätte man geneigt sein können zu schließen, daß die reduzierende Gruppe der Tetraose dem *N*-Acetyl-glucosamin-Rest angehört. Die vorliegende Untersuchung hat ergeben, daß dies nicht der Fall ist. Auf zwei unabhängigen Wegen läßt sich zeigen, daß die reduzierende Gruppe des Tetrasaccharids der *d*-Glucose angehört.

Lacto-*N*-tetraose gibt in guter Ausbeute ein in gelben Nadeln kristallisierendes Phenylsazon vom Schmp. 222–223° (Zers.), das 5 Stickstoffatome enthält. Da *N*-Acetyl-glucosamin unter denselben Bedingungen nur

¹⁾ R. Kuhn, A. Gauhe u. H. H. Baer, Chem. Ber. 86, 827 [1953].

²⁾ R. C. G. Moggridge u. A. Neuberger, J. chem. Soc. [London] 1938, 745; A. Neuberger u. R. Pitt Rivers, J. chem. Soc. [London] 1939, 122; R. Kuhn, F. Zilliken u. A. Gauhe, Chem. Ber. 86, 466 [1953]; R. Kuhn u. H. H. Baer, Chem. Ber. 86, 724 [1953].

³⁾ R. Kuhn u. W. Kirschenlohr, Chem. Ber. 86, 1331 [1953].

in geringen Mengen Glucosazon liefert, wobei die Acetamino-Gruppe eliminiert wird, hätte – wenn der Acetylglucosamin-Rest der Tetraose der reduzierende gewesen wäre – nur wenig eines Osazons mit 4 *N*-Atomen auftreten sollen. Nach der Säurehydrolyse des Lacto-*N*-tetraose-phenylosazons war durch Papierchromatographie unter den Spaltstücken keine Glucose mehr nachweisbar; wir fanden nur Glucosamin und Galaktose.

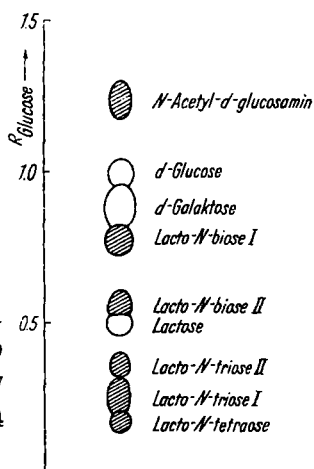
Der zweite Weg, der die Glucose als reduzierenden Baustein erkennen ließ, bestand in Oxydation der Tetraose mit Hypojodit zu Lacto-*N*-tetraonsäure und anschließender Säurehydrolyse. Auch hier wurde keine Glucose mehr gefunden. Das Verhältnis von Glucosamin zu Galaktose im Hydrolysat der Tetraonsäure (ber. 1:2.0; gef. 1:2.2) war dasselbe wie in der Tetraose.

Näheren Einblick in die Reihenfolge der Bausteine gewannen wir durch partielle Säurehydrolyse der Lacto-*N*-tetraose, die auf Grund von Vorversuchen mit n H₂SO₄ bei 97–98° durchgeführt wurde (36 Min.). Aus einem unverzweigten Tetrasaccharid, das aus 1 Mol. Acetylglucosamin + 1 Mol. Glucose + 2 Moll. Galaktose aufgebaut ist, sind bei unvollständiger Spaltung 2 Triosen und 3 Biosen zu erwarten. Diese Spaltstücke lassen sich alle papierchromatographisch eindeutig nachweisen. Beide Triosen, die wir fanden (Lacto-*N*-triose I und Lacto-*N*-triose II), sind stickstoffhaltig. Wäre der *N*-Acetylglucosamin-Rest endständig, so hätte eine der beiden Triosen stickstofffrei sein sollen. Daß beide Triosen *N*-Acetylglucosamin enthalten, ist nicht nur ein weiteres Argument gegen die „Kopfständigkeit“ dieses Bausteins, sondern es spricht auch gegen die „Endständigkeit“ des Aminozuckers.

Von den 3 Biosen, die bei der Partialhydrolyse auftreten, sind 2 stickstoffhaltig (Lacto-*N*-biose I und Lacto-*N*-biose II) und nur eine ist stickstofffrei. Wäre der Aminozucker kopfständig oder endständig, dann hätten 2 stickstofffreie Disaccharide auftreten sollen.

Die R_{Glucose} -Werte betragen für die Lacto-*N*-tetraose, die fünf Produkte der partiellen und die drei Produkte der totalen Hydrolyse*) (Abbild. 1):

Lacto- <i>N</i> -tetraose .. 0.17	Lactose	0.51
Lacto- <i>N</i> -triose I .. 0.26	Glucose	1.00
Lacto- <i>N</i> -triose II 0.36	Galaktose	0.87
Lacto- <i>N</i> -biose I ... 0.76	<i>N</i> -Acetylglucosamin	1.24
Lacto- <i>N</i> -biose II .. 0.57		



*) die nur in sehr geringen Mengen auftretenden Spaltstücke mit primären Aminogruppen, die durch Abspaltung von Essigsäure aus den NH-COCH₃-Gruppen gebildet werden, sind hier nicht mit angeführt.

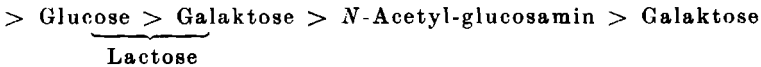
Abbild. 1. Spaltstücke der Lacto-*N*-tetraose. Absteigende Papierchromatographie auf Papier Schleicher & Schüll Nr. 2043 b.

Lösungsmittel*): Essigester: Pyridin: Wasser = 2:1:2 (obere Schicht). Die *d*-Glucose, deren Wanderungsgeschwindigkeit = 1.00 gesetzt wurde, war nach 36 Stdn. 25 cm gelaufen.

*) M. A. Jermyn u. F. A. Isherwood. Biochem. J. 44. 402 [1949].

Das stickstofffreie Disaccharid aus krist. Lacto-*N*-tetraose haben wir in kristallisierter Form erhalten. Nach Elementaranalyse, Schmelzpunkt und Mischprobe, Röntgendiagramm und Drehungsvermögen handelt es sich um α -Lactose-hydrat. Die reduzierende Hälfte der Tetraose ist also Milchzucker.

Diese Feststellung beweist – da der Aminozucker nicht endständig sein kann –, daß die nicht reduzierende Hälfte der Tetraose ein Galaktosido-*N*-acetyl-glucosamin ist. Für die Lacto-*N*-tetraose ist damit die folgende Reihenfolge der Bausteine festgelegt:



Die Lacto-*N*-biose I ist von uns zunächst aus dem Oligosaccharidgemisch der Frauenmilch (Kohleeluat)⁵), später auch aus krist. Lacto-*N*-tetraose in farblosen Nadeln vom Schmp. 166–167°, welche die α -Form darstellen, erhalten worden: $[\alpha]_{\text{D}}^{25}: +32^{\circ} \rightarrow +14^{\circ}$ (Wasser). Das wasserfreie Disaccharid, C₁₄H₂₅O₁₁N, ist sehr hygroskopisch und nimmt an der Luft 2 Moll. Kristallwasser auf. Das Dihydrat wird auch erhalten, wenn man die Lacto-*N*-biose I an feuchter Luft aus trockenem Methanol + absol. Äthanol umkristallisiert. Im Vakuum-Exsiccator über Kaliumhydroxyd geht das Dihydrat in das Monohydrat über. Heiße verd. Mineralsäure spaltet in Galaktose + *N*-Acetylglucosamin bzw. Glucosamin. Durch sehr verd. Alkali erfolgt schon in der Kälte Zerfall in Galaktose + Anhydro-*N*-acetylglucosamin (AAG), wovon eingehend noch auf S. 292 die Rede sein wird. Die Alkali-Empfindlichkeit der Lacto-*N*-biose I ist so groß, daß beim Eindampfen auf dem Wasserbad das Alkali gewöhnlichen Geräteglases genügt, um die Spaltung zu bewirken. Dampft man in Jenaer Glas ein, dann bleibt das Disaccharid unversehrt. Mit Hypodit ließ sich das Äquivalentgewicht der Lacto-*N*-biose nicht bestimmen. Da die verwendete Sodalösung schon ohne Zusatz von Jod weitgehende Spaltung bewirkte, war der Jodverbrauch viel höher als für ein Disaccharid der Formel C₁₄H₂₅O₁₁N berechnet.

Die Lacto-*N*-biose I verbraucht in schwach saurer Lösung 4 Moll. Perjodsäure, davon 2 sehr rasch. In hydrogencarbonat-alkalischer Lösung wurden 1.5 Moll. Formaldehyd als Dimedon-Verbindung erhalten (Schmp. etwa 180°). Lacto-*N*-tetraose gab unter denselben Bedingungen 2.7 bis 3.1 Moll. Formaldehyd-Dimedonverbindung vom Schmp. 190–191°.

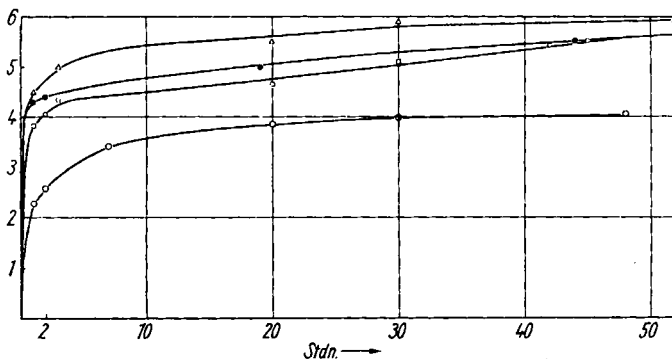
Der zeitliche Verlauf des Perjodsäure-Verbrauchs ist in Abbild. 2 dargestellt. Zum Vergleich mit der alkalilabilen Biose sind die Werte für Lacto-*N*-tetraose sowie für 2 synthetisch gewonnene Disaccharide, nämlich für 6- β -*d*-Galaktosido-*N*-acetyl-*d*-glucosamin⁶) und 6- β -*N*-Acetyl-*d*-glucosaminido-*d*-galaktose⁷) mit aufgetragen. Die beiden synthetischen Disaccharide sind auch

⁵) A. Gauhe, P. György, J. R. E. Hoover, R. Kuhn, C. S. Rose, H. W. Ruelius u. F. Zilliken, Arch. Biochemistry Biophysics 48, 214 [1954].

⁶) R. Kuhn u. H. H. Baer, unveröffentlicht.

⁷) R. Kuhn u. W. Kirschenlohr, Chem. Ber. 87, 384 [1954].

nach ihren R_F -Werten und auf Grund ihres Verhaltens gegen verd. Alkali von Lacto-*N*-biose I mit Sicherheit verschieden.



Abbild. 2. Kinetik des Perjodsäureverbrauchs. Ordinate: verbrauchte Moll. Perjodsäure. ○-○-○ Lacto-*N*-biose I, □-□-□ Lacto-*N*-tetraose, ●-●-● 6-β-*N*-Acetylglucosaminido-galaktose, △-△-△ 6-β-Galaktosido-*N*-acetylglucosamin

Die Einwirkung von verd. Alkali auf *N*-Acetylglucosamin und auf zahlreiche Naturstoffe, die dieses enthalten, ist bereits Gegenstand vieler Untersuchungen⁸⁾ gewesen, da dabei ein Anhydro-acetylglucosamin⁹⁾ (AAG) gebildet wird, das mit *p*-Dimethylamino-benzaldehyd einen rotvioletten Farbstoff liefert. Nachdem die Methylglucoside des *N*-Acetylglucosamins diese Farbreaktion nicht geben, ist vielfach angenommen worden, daß das Auftreten der rotvioletten Farbe darauf schließen lasse, daß das C-Atom 1 des acetylierten Aminozuckers nicht an einer glykosidischen Bindung beteiligt sei. W. T. J. Morgan¹⁰⁾ hat demgegenüber in seinen Untersuchungen über Blutgruppen-Substanzen bereits in Betracht gezogen, daß alkali-labile Bindungen vorliegen könnten, aus denen zunächst beim Erwärmen mit Sodalösung reduzierende Acetylglucosamin-Reste und weiterhin aus diesen AAG bzw. farbstoffliefernde Derivate desselben entstehen könnten.

Die Richtigkeit dieser Auffassung, die sich auf das Studium der hochmolekularen Blutgruppen-Substanzen stützt, läßt sich an den niedrigmolekularen kristallisierten Verbindungen, die wir isoliert haben, unmittelbar erkennen. Die Abstufungen der Alkalilabilität sind überraschend groß:

- I. Bei Zimmertemperatur wird durch 0.025 *n* Na₂CO₃ unter Bildung von AAG glatt gespalten: Lacto-*N*-biose I in *d*-Galaktose und AAG. Die Halbwertszeit dieser Reaktion beträgt bei 20° etwa 30 Minuten.
- II. Im siedenden Wasserbad spaltet 0.05 *n* Na₂CO₃ unter Bildung von AAG: Lacto-*N*-tetraose, Lacto-*N*-triose I und II; synthet. 6-β-[*N*-Acetyl-

⁸⁾ D. Aminoff, W. T. J. Morgan u. W. M. Watkins, *Biochem. J.* **51**, 379 [1952]; A. B. Foster u. M. Stacey, *Advances Carbohydrate Chem.* **7**, 257 [1952].

⁹⁾ Zur Konstitution vergl. Th. White, *J. chem. Soc. [London]* **1940**, 428.

¹⁰⁾ W. T. J. Morgan, *Biochem. J.* **40**, XV [1946]; D. Aminoff u. W. T. J. Morgan, *Biochem. J.* **44**, XXI [1949]; **48**, 74 [1951].

d-glucosaminido]-*d*-galaktose⁷⁾, synthet. 6- β -[*N*-Acetyl-*d*-glucosaminido]-*d*-glucose⁷⁾; Anilin-, *p*-Toluidin- und *p*-Anisidin-*N'*-acetyl-*d*-glucosaminid¹¹⁾).

Das synthet. 6- β -[*d*-Galaktosido]-*N*-acetyl-*d*-glucosamin⁶⁾ reagiert mit Sodalösung ebenfalls erst in der Hitze. Dabei wird jedoch nicht wie bei den bisher angeführten Verbindungen freies AAG ($R_{\text{Glucose}} = 1.7$) gebildet, sondern eine erheblich langsamer wandernde Verbindung ($R_{\text{Glucose}} = 1.03$), die mit Ehrlichs Aldehyd gleichartig reagiert und in der wir ein 6- β -Galaktosido-AAG vermuten.

Unter den eingehaltenen Bedingungen wird auch Lactose, wie wir fanden, weitgehend abgebaut. Dabei handelt es sich nicht um eine glatte Spaltung, sondern um eine weitgehende Umwandlung bzw. Zerstörung der reduzierenden Hexose, so daß man reichlich Galaktose, nicht aber Glucose findet¹²⁾.

III. Nicht gespalten werden und kein AAG liefern mit 0.05 *n* Sodalösung auch im siedenden Wasserbad: α - und β -Methyl-²⁾, α - und β -Benzyl-, β -Äthyl-, β -Propyl- und β -*n*-Butyl-*N*-acetyl-*d*-glucosaminid³⁾).

Die angeführten Befunde zeigen, daß man bei positiver Farbreaktion mit Ehrlichs Aldehyd nicht allgemein schließen darf, daß ein reduzierender *N*-Acetyl-hexosamin-Rest vorliegt. Man darf aber auch nicht annehmen, daß bei alkalilabilen *N*-Acetyl-hexosamin-Derivaten durch das Alkali zunächst stets freies *N*-Acetyl-hexosamin gebildet wird, das erst sekundär in AAG übergeht. Denn dieses entsteht aus Lacto-*N*-biose I unter ungewöhnlich gelinden Bedingungen, unter denen freies *N*-Acetyl-glucosamin noch gar kein AAG bildet.

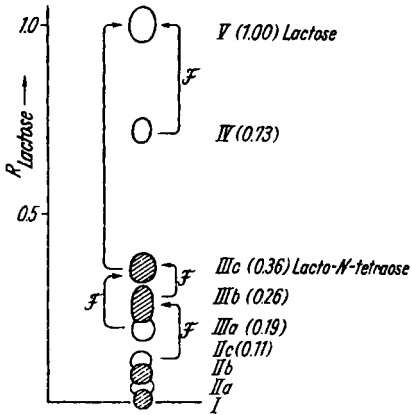
Die Papierchromatographie der durch Elution der Kohleadsorbate aus Frauenmilch gewonnenen Oligosaccharide hat ergeben⁵⁾, daß die Lacto-*N*-tetraose (III c), die am schnellsten wandernde stickstoffhaltige Komponente ist. Sie unterscheidet sich überdies von den linksdrehenden Nachbarkomponenten durch ihre Rechtsdrehung und durch die Abwesenheit von Fucose¹³⁾. Die noch schneller wandernde Komponente IV ist stickstofffrei und besitzt keine Bifidus-Wirksamkeit⁵⁾. Sie liefert bei Einwirkung von 2*n* Essigsäure (2 Stdn. im siedenden Wasserbad) neben unverändertem IV sowie Spuren von Glucose und Galaktose im Papierchromatogramm als Hauptspaltstücke Fucose und Lactose. Unter denselben Bedingungen spalten auch II c, III a und III b, die alle hexosaminhaltig sind, Fucose ab. Neben dieser Methyl-pentose tritt in allen 3 Fällen Lacto-*N*-tetraose (III c) bei der Hydrolyse mit Essigsäure auf. Aus II c wurde etwa 3mal soviel III b wie III c gebildet. Spuren von Glucose, Galaktose und von Lacto-*N*-biose I sowie Spuren weiterer Umwandlungsprodukte, die noch nicht identifiziert sind, traten in jedem Falle auf.

¹¹⁾ R. Kuhn u. F. Haber, unveröffentlicht.

¹²⁾ Vergl. hierzu C. A. Lobry de Bruyn u. W. Alberda van Ekenstein, Recueil Trav. chim. Pays-Bas 18, 147 [1899]; W. M. Corbett u. J. Kenner, J. chem. Soc. [London] 1953, 2245.

¹³⁾ R. Kuhn, Angew. Chem. 64, 498 [1952].

Die zu diesen Versuchen angewandten Präparate der fucosehaltigen Komponenten IIc, IIIa und IIIb waren durch wiederholte Fraktionierungen an Kohle-Celite-Säulen¹⁴) gereinigt, aber amorph¹⁵).



Abbild. 3. Papierchromatographie der Oligosaccharide aus Frauenmilch. Schraffiert sind die Komponenten I, IIb, IIIb und IIIc, die nach Einwirkung von heißer Sodalösung AAG-Reaktion geben. IV ist stickstofffrei. Bei den 4 mit F bezeichneten Teilreaktionen (Pfeilen) wird Fucose in Freiheit gesetzt

Die zwischen den fucosehaltigen Komponenten und der Lacto-*N*-tetraose erkannten Beziehungen sind in Abbild. 3 durch Pfeile dargestellt. Man erkennt, daß die für die Tetraose nachgewiesene Anordnung > Glucose > Galaktose > *N*-Acetyl-glucosamin > Galaktose auch in höheren Komponenten der aus Frauenmilch gewonnenen Oligosaccharide wiederkehrt. Wenn dies verhältnismäßig leicht zu erkennen war, so beruht es darauf, daß – ähnlich wie bei den Blutgruppen-Substanzen¹⁶) – die *l*-Fucose durch verdünnte Säuren besonders leicht abgespalten wird.

Für eifrige technische Hilfe bei Durchführung der Arbeit möchten wir Frl. D. Tschampel sowie Frl. A. Seeliger und Hrn. G. Riethmüller bestens danken.

Beschreibung der Versuche

1. *d*-Glucosamin-Hydrochlorid aus Lacto-*N*-tetraose: 250 mg krist. Lacto-*N*-tetraose wurden mit 2 ccm Wasser + 2 ccm konz. Salzsäure in einer zugeschmolzenen Ampulle 7 Stdn. auf 97–98° erhitzt. Die von dunklen Flocken befreite und mit Tierkohle entfärbte Lösung schied beim Eindunsten auf etwa 0,5 ccm krist. Glucosamin-Hydrochlorid ab. Nach dem Absaugen und Waschen mit 50-proz. Alkohol lagen 37 mg (50% d.Th.) vor. $[\alpha]_D^{20}$: +99.5° (3 Min.) → +72.3° (nach 6 und 12 Stdn., $c = 1.06$ in Wasser, 1-dm-Rohr¹⁷). Papierchromatographie und Debye-Scherrer-Aufnahmen bestätigen das Vorliegen von reinem Glucosamin-Hydrochlorid.

¹⁴) R. L. Whistler u. D. F. Durso, J. Amer. chem. Soc. 72, 677 [1950].

¹⁵) In Amerika ist unter meinem Namen eine Arbeit, die mir nicht vorgelegen hatte, im Druck erschienen: P. György, R. Kuhn, R. F. Norris, C. S. Rose u. F. Zilliken, Amer. J. Dis. Children 84, 482 [1952]. Darin wurde behauptet, es seien aus Frauenmilch kristallisierte linksdrehende, fucosehaltige Oligosaccharide isoliert worden. Das Wort „kristallisierte“ mußte vom Autor berichtigt werden: P. György, Amer. J. Dis. Children 85, 632 [1953]. Der wesentliche chemische Inhalt der angeführten Arbeit, nämlich die Identifizierung von *d*-Glucosamin, *l*-Fucose, *d*-Galaktose und *d*-Glucose in den Oligo- bzw. Polysacchariden der Frauenmilch, ist von Dr. Adeline Gauhe in Heidelberg durchgeführt worden.

Richard Kuhn.

¹⁶) D. Aminoff, W. T. J. Morgan u. W. M. Watkins, Biochem. J. 46, 426 (1950); E. F. Annison u. W. T. J. Morgan, Biochem. J. 52, 247 [1952].

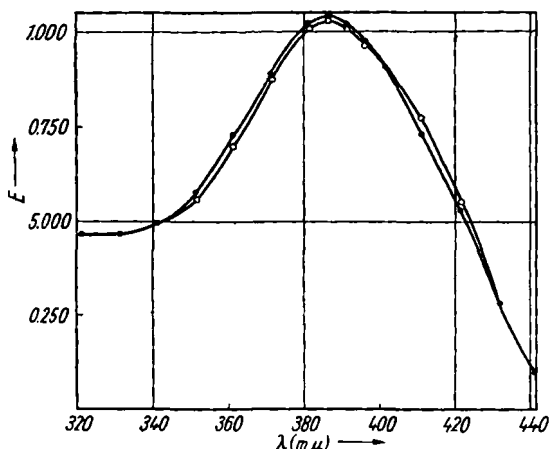
¹⁷) Lit.: +72.5° (Tollens-Elsner, Kurzes Handbuch d. Kohlenhydrate, J. A. Barth, Leipzig 1935, S. 243).

2. Lacto-*N*-tetraose-phenylosazon: Nach E. Fischer: 500 mg krist. Lacto-*N*-tetraose + 300 mg Phenylhydrazin-Hydrochlorid + 750 mg Natriumacetat $\times 3\text{H}_2\text{O}$ + 5 ccm Wasser lieferten nach 2stdg. Erhitzen auf dem Wasserbad nur etwa 100 mg rohes Osazon (16% d.Th.).

Nach F. Weygand¹⁸⁾: 1 g krist. Tetraose + 250 mg frisch dest. *p*-Phenetidin + 0.2 ccm Wasser + 0.025 ccm 2 *n* Essigsäure wurden unter Kneten mit einem Glasstab 10 Min. und nach Zugabe von nochmals 0.2 ccm Wasser + 0.025 ccm 2 *n* Essigsäure weitere 5 Min. auf 97–98° erhitzt. Dann gab man 0.5 ccm Phenylhydrazin + 2.5 ccm 2 *n* Essigsäure zu und erhitzte 45 Min. im Wasserbad. Aus der erkalteten Lösung fiel das gelbe Osazon auf Zusatz von 25 ccm Aceton aus. Es wurde mit Aceton, 1 *n* Essigsäure und erneut mit Aceton gewaschen. Ausb. 500 mg (42% d.Th.). Zur Analyse wurde aus 200 ccm 99-proz. Methanol umkristallisiert, aus dem sich im Eisschrank feine gelbe Nadeln vom Schmp. 222–223° (Zers., Kupferblock auf 215° vorgeheizt) abschieden, die 12 Stdn. bei 100° (3 Torr, P_2O_5) getrocknet wurden.

$\text{C}_{38}\text{H}_{55}\text{O}_{19}\text{N}_5$ (885.9) Ber. C 51.52 H 6.26 N 7.91 Gef. C 51.00 H 6.51 N 7.90

Das Molekulargewicht bestätigten wir durch spektralphotometrischen Vergleich mit Glucose-phenylosazon (Abbild. 4).



Abbild. 4. Übereinstimmung der molaren Absorptionsstärken von Lacto-*N*-tetraose-phenylosazon und Glucosazon (Spektralphotometrische Bestimmung des Molekulargewichts der Tetraose)

Abszissen: Wellenlängen in $\text{m}\mu$

Ordinaten: Extinktionen *E* im Beckman DU (10-mm-Küvetten)

○—○—○ 8.86 mg Tetraose-osazon (Mol.-Gew. 886) } in je 200 ccm
●—●—● 3.60 mg Glucosazon (Mol.-Gew. 358) } 98-proz. Äthanol

Bei neuerlichem Umkristallisieren änderte sich der Schmp. nicht mehr. Das wasserfreie Osazon ist wie die wasserfreie Tetraose hygroskopisch. Wurde das Osazon nur 3 Stdn. bei 64° getrocknet, so stimmten die CH -Werte auf ein Dihydrat. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} : +34.5^{\circ}$ (wasserfreie Substanz in Pyridin, $c = 1$, 1-dm-Rohr, 10 Min. und 15 Min.). Nach 5 Stdn. war der Wert auf +32° und nach 12 Stdn. auf +24° gesunken, doch farbte sich die Lösung zunehmend dunkler.

In heißem Wasser ist das Osazon ziemlich leicht, in siedendem Methanol erheblich schlechter, in kochendem Äthanol nur noch wenig und in siedendem *n*-Butanol kaum noch löslich. Gute Lösungsmittel sind Pyridin, Dimethylformamid und heißer Eisessig. Chloroform und Benzol nehmen nichts auf.

¹⁸⁾ Ber. dtsh. chem. Ges. **73**, 1290 [1940].

Säurehydrolyse des Osazons: 15 mg Lacto-*N*-tetraose-phenylosazon wurden mit 3 ccm 2*n* H₂SO₄ unter Stickstoff in einer zugeschmolzenen Ampulle 3 Stdn. auf 104° erhitzt. Die mit Bariumhydroxyd neutralisierte, von Bariumsulfat abzentrifugierte und mit Äther ausgeschüttelte Lösung wurde bei schwach salzsaurer Reaktion zur Trockne gebracht. Das Papierchromatogramm (Essigester: Pyridin: Wasser = 2:1:2, obere Schicht) zeigte Galaktose und Glucosamin, aber keine Glucose. Als Vergleichszucker dienten Glucose, Galaktose, Glucosamin-Hydrochlorid und Acetylglucosamin.

Glucosazon aus *N*-Acetyl-glucosamin: Nach E. Fischer: Ausbeute 9% d.Th. (2 Stdn. Wasserbad) und 10% d.Th. (6 Stdn. Wasserbad). Nach F. Weygand: Ausbeute 4.7% d.Th. (*p*-Phenetidin) und 2.5% d.Th. (*p*-Foluidin); erhitzt wurde je 15 Min. mit dem Amin und weitere 30 Min. mit dem Phenylhydrazin im Wasserbad.

3. Oxydation der Tetraose mit Hypojodit: 70 mg Lacto-*N*-tetraose wurden mit 30 ccm *n*/50 Jod + 30 ccm Wasser + 2 ccm 5-proz. Sodalösung 30 Min. bei etwa 20° im Dunkeln stehengelassen.

Eine Probe von 5 ccm ergab bei Rücktitration mit Thiosulfat einen Jodverbrauch, der bei Annahme des theoret. Mol.-Gewichts 707 einer Tetraose-Menge von 5.79 mg (ber. aus der Einwaage 5.65 mg) entsprach.

Die Hauptmenge der oxydierten Lösung wurde mit 5 ccm *n*/1 H₂SO₄ angesäuert und das Jod sofort mit Chloroform ausgeschüttelt. Dann wurde durch vorsichtiges Zutropfenlassen von sehr verd. Bromwasser auch das als Jod-Ion vorliegende Jod in Freiheit gesetzt und sofort in Chloroform aufgenommen. Zur Entfernung der Kationen (Na⁺ und K⁺) diente eine kleine Säule, die mit Amberlite IR-120 beschickt war. Das Filtrat wurde i. Vak. auf etwa 10 ccm eingeeengt, bis es etwa *n*/1 an Säure (Schwefelsäure + Bromwasserstoffsäure) war. In verschlossener Ampulle wurde diese Lösung über Nacht auf 98° erhitzt. Nach Entfernung der Schwefelsäure als Bariumsulfat wurde die Bromwasserstoffsäure und die gebildete Glucosäure durch eine Amberlitesäule (IR-4 B) abgetrennt. Das auf 1 ccm eingeeengte Filtrat enthielt laut Papierchromatogramm keine Glucose, aber reichlich Galaktose und Glucosamin.

Die Hauptmenge des eingeeengten Filtrats wurde auf 5 ccm verdünnt und diente zur quantitativen Bestimmung des Verhältnisses Glucosamin: Galaktose.

Nach Morgan-Elson¹⁹) enthielten diese 5 ccm 10.8 bzw. 11.5 mg Glucosamin-Hydrochlorid. Die nach Abtrennung des Glucosamins (Amberlite IR-120) nach Macleod-Robison gefundene Aldosemenge entsprach 21.6 mg Galaktose. Für das molare Verhältnis Glucosamin: Galaktose wurde somit 0.89:2.00 gefunden.

4. Partielle Säurehydrolyse der Lacto-*N*-tetraose: 1.897 g kristallwasserhaltiges Tetrasaccharid wurden mit 250 ccm *n*/1 H₂SO₄ 36 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt. Dann wurde sofort mit Eiswasser gekühlt, mit Barytwasser auf *p*_H 6 gebracht, vom Bariumsulfat abzentrifugiert und auf 75 ccm i. Vak. eingeeengt. Das Papierchromatogramm zeigte neben unveränderter Tetraose 8 neue anilinphthalat-positive Flecken, von denen 5 Morgan-Elson-positiv (schraffiert) und 3 Morgan-Elson-negativ waren. 2 weitere, sehr schwache Flecken gaben die Morgan-Elson-Reaktion nur nach Vorbehandlung mit Acetylaceton und enthielten offenbar Saccharide mit freien Aminogruppen, die durch Entacetylierung entstanden waren (vergl. Abbild. 1).

Die auf 75 ccm eingeeengte Lösung wurde durch eine mit 40 g Carboraffin C, staubfein²⁰) und 40 g Celite 535²¹) beschickte Säule (ø = 47 mm) filtriert. Eluiert wurde mit Wasser, dem steigende Mengen von Äthanol zugesetzt wurden. Zur Elution dienten: 1) 2000 ccm Wasser, 2) 4000 ccm 2-proz. Alkohol, 3) 3500 ccm 10-proz. Alkohol, 4) 2000 ccm 20-proz. Alkohol, 5) 2000 ccm 30-proz. Alkohol.

5. Isolierung der Lactose: Diese fand sich, nachdem die Monosaccharide mit Wasser durchgewaschen waren, im Eluat mit 2-proz. Alkohol neben Lacto-*N*-biose II und 2 weiteren (im Diagramm nicht dargestellten) sehr schwachen etwas langsamer wandern-

¹⁹) L. A. Elson u. W. T. J. Morgan, Biochem. J. 27, 1824 [1933].

²⁰) Farbenfabriken Bayer, Leverkusen.

²¹) Johns-Manville Corp., New York, N. Y.

den Komponenten, die vermutlich Reversionsprodukte darstellten. Der Trockenrückstand (260 mg) wurde in wenig Wasser gelöst und als Streifen auf 4 Schleicher- & Schüll-Bogen 2043b von 30 cm Breite aufgetragen. Nach 44 Stdn. Laufzeit haben wir die Lactose-Zone, die nicht ganz frei von Lacto-*N*-biose II war, mit heißem Wasser wiederholt ausgezogen, den Auszug durch etwas Amberlite IR-120 und IR-4b filtriert und i. Vak. zur Trockne eingedampft (125 mg). Durch Lösen in 1 ccm Wasser, Klären mit etwas Tierkohle und Zugabe von 3 ccm Alkohol erzielten wir die Abscheidung schön krist. Lactose, die mit wenig 50-proz. Alkohol gewaschen und über Diphosphorpentoxyd im Exsiccator getrocknet wurde. Schmp. 203–204° (zugeschmolzenes Röhrchen); Vergleichspräparat von α -Lactosehydrat 203–204°; keine Depression.

$C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$ (360.3) Ber. C 40.00 H 6.71 Gef. C 40.47 H 6.47

$[\alpha]_D^{25}$: +52.0° (Endwert nach 300 und 480 Min., $c = 1.00$, in Wasser), Lit.: +52.3°. Die Debye-Scherrer-Aufnahme war mit einer von α -Lactosehydrat gemachten identisch.

6. Lacto-*N*-biose I: Man findet sie in den ersten 700 ccm des Eluats mit 10-proz. Alkohol (188 mg). 1.10 g aus mehreren Ansätzen stammende rohe Biose wurden in 13 ccm siedendem absol. Methanol gelöst. Die heiß filtrierte, erkaltete Lösung trübte sich auf Zusatz von einigen ccm absol. Äthanol und schied dann bei 0° amorphe Flocken, die Celite enthielten, ab. Ohne zu filtrieren erwärmte man erneut, wobei nur ein Teil der Flocken wieder in Lösung ging, gab etwas Tierkohle zu und filtrierte nach dem Erkalten. Das Filtrat haben wir vorsichtig mit absol. Äthanol bis zur beginnenden Trübung versetzt und bei 20° im leichten Luftstrom eines Digestoriums langsam eindunsten lassen. Die am Rande des Schälchens sich abscheidenden Kristallkrusten haben die Neigung, zu zerfließen, wenn man sie nicht von Zeit zu Zeit mit der Mutterlauge verreibt. Für das Gelingen der Kristallisation scheint es wesentlich zu sein, daß Methanol, in dem die rohe Lacto-*N*-biose I gut löslich ist, leichter flüchtig ist als Äthanol, in dem das Disaccharid nahezu unlöslich ist, und daß überdies aus der Luft soviel Feuchtigkeit angezogen werden kann, als zur Bildung des Disaccharid-hydrates nötig ist. Man wäscht auf der Nutsche mit Methanol/Äthanol 1 : 1 und trocknet die farblosen feinen Nadeln über Kaliumhydroxyd im Vakuumexsiccator. Ausb. 388 mg und weitere 80 mg aus der Mutterlauge. Die auf diese Weise erhaltene kristallwasserhaltige Substanz war in den meisten Fällen analysenrein. Gegebenenfalls wurde aus heißem Methanol umkristallisiert, von dem nunmehr etwa die 3fache Menge wie beim Rohprodukt zum Lösen nötig war. Die über Kaliumhydroxyd getrocknete Substanz ist ein Monohydrat, das bei etwa 140° zu sintern beginnt und bei 80° und 3 Torr über Diphosphorpentoxyd (40 Stdn.) sein Kristallwasser verliert.

$C_{11}H_{20}O_{11}N \cdot H_2O$ (401.4) Gewichtsabnahme Ber. H_2O 4.70 Gef. H_2O 5.04

Die wasserfreie Lacto-*N*-biose I ist hygroscopisch und nimmt an der Luft 2 Moll. Wasser auf.

$C_{14}H_{25}O_{11}N$ (383.4) Gewichtszunahme Ber. 2 H_2O 9.40 Gef. 2 H_2O 10.21

Zur Analyse gelangte das wasserfreie Disaccharid, welches bei 166–167° schmilzt und sich beim Weitererhitzen bräunt.

$C_{14}H_{25}O_{11}N$ (383.4) Ber. C 43.85 H 6.57 N 3.65 Gef. C 43.60 H 6.88 N 3.58

Die krist. Lacto-*N*-biose I stellt die α -Form dar: $[\alpha]_D^{25}$: +32.0° (für $t = 0$) \rightarrow +14.0° (Endwert für wasserfreie Substanz, $c = 2$, in Wasser).

7. Perjodat-Oxydation: Zur Oxydation diente eine stets im Dunkeln aufbewahrte 0.25 *m* $NaJO_4$ -Lösung, die durch Auflösen von 13.370 g $NaJO_4$ in 250 ccm Wasser hergestellt und deren genauer Titer mit 0.1 *n* Natriumarsenit bestimmt worden war. Die bei der Titration verwendete *m* $NaHCO_3$ -Lösung muß frisch bereitet sein und darf sich mit Phenolphthalein höchstens ganz schwach rosa färben.

Oxydation in schwachsaurer Lösung: Je 38.3 mg (0.1 mMol) 6- β -*d*-Galaktosido-*N*-acetyl-*d*-glucosamin und 6- β -*N*-Acetyl-*d*-glucosaminido-*d*-galaktose bzw. 76.6 mg (0.2 mMol) Lacto-*N*-biose I und 141.4 mg (0.2 mMol) Lacto-*N*-tetraose wurden in wenig Wasser gelöst, mit 6.00 bzw. 12.00 ccm Perjodatlösung (entsprechend 15 Moll. $NaJO_4$ pro Mol. Zucker) versetzt, mit Wasser auf 20 ccm aufgefüllt und bei etwa 23° im Dunkeln aufbewahrt. In gegebenen Zeitabständen entnahmen wir je 2 ccm, fügten erst 5 ccm 1 *m* $NaHCO_3$, dann 2 ccm 20-proz. Kaliumjodid-Lösung hinzu und titrierten den

Verbrauch an Oxydationsmittel aus einer Mikrobürette. Der Reduktion eines Mols NaJO_4 durch den Zucker entsprach ein Minderverbrauch der entnommenen Probe von 0.20 bzw. 0.40 ccm 0.1 *n* Arsenit gegenüber 2 ccm einer Blindprobe, deren Gehalt übrigens tagelang unverändert blieb. Die Ergebnisse sind in Abbild. 2 aufgetragen.

Oxydation bei $p_{\text{H}} 7.5$: Die Substanzen wurden in einigen ccm Wasser gelöst, der Reihe nach mit 6 ccm NaJO_4 -Lösung, 5 ccm *n* H_2SO_4 und 25 ccm *m* NaHCO_3 versetzt und mit Wasser auf 50 ccm aufgefüllt. Die Oxydationsdauer betrug 16 und 30 Stdn. bei 23°. Wir bestimmten den Formaldehyd nach der Arbeitsweise von R. Jeanloz²²). Die aus den Zuckern erhaltenen Mengen an krist. Dimedon-Verbindung zeigt Tafel 1.

Tafel 1. Zucker-Abbau mit Perjodat bei $p_{\text{H}} 7.5$

	Dauer Stdn.	Formaldehyd-Dimedon-Verbindung		
		mg	Schmp.	Mol. pro Mol. Zucker
35.4 mg Lacto- <i>N</i> -tetraose ...	16	42.0	190–191°	2.88
35.4 mg „ „ „ „	16.5	39.4	190–191°	2.70
35.4 mg „ „ „ „	30	44.8	190–191°	3.07
70.7 mg*) „ „ „ „	30	82.0	190–191°	2.74
38.3 mg Lacto- <i>N</i> -biose I	16	42.8	~180° (Z.)	1.47

*) in der doppelten Menge Oxydationslösung

8. Alkali-Labilität: Die hohe Alkali-Empfindlichkeit der Lacto-*N*-biose I fiel bei der Oxydation mit Hypojodit nach M. Macleod und R. Robison²³) zuerst auf:

Je 2.083 mg Substanz verbrauchten 3.05 und 3.00 ccm *n*/200 Jod. Hieraus ergab sich das Äquivalentgewicht zu 273 und 278 statt ber. 383! Ließ man das zur Macleod-Bestimmung dienende Alkali ohne Zusatz von Jod einwirken, dann war papierchromatographisch die Bildung von Galaktose und AAG zu erkennen.

N-Acetyl-glucosamin gibt nach Macleod-Robison das richtige Äquiv.-Gew. von 221.

Farbreaktion mit Ehrlichs Aldehyd: Läßt man auf *N*-Acetyl-*d*-glucosamin bei etwa 20° 0.05 *n* Na_2CO_3 30 Min. lang einwirken, so erhält man auf Zusatz von *p*-Dimethylamino-benzaldehyd (0.80 g in 30 ccm Äthanol + 30 ccm konz. Salzsäure) keinen Farbstoff. Lacto-*N*-tetraose verhält sich ebenso. Wiederholt man jedoch den Versuch mit Lacto-*N*-biose I, so erhält man eine kräftige Rotviolett-Färbung. Diese gleicht derjenigen, die man mit *N*-Acetyl-*d*-glucosamin und mit Lacto-*N*-tetraose erhält, wenn man vor Zusatz des Dimethylamino-benzaldehyds mit 0.05 *n* Na_2CO_3 5 Min. im siedenden Wasserbad erwärmt. Für vergleichende Bestimmungen der Farbstärke (Pulfrich-Photometer, Filter S53) wurde 5 Min. mit 1.1 ccm 0.05 *n* Na_2CO_3 auf 97–98° erhitzt und 90 bzw. 120 Min. nach Zusatz von 2 ccm Ehrlich-Reagens und Verdünnen mit Äthanol auf 10 ccm abgelesen. Bei dem mit * bezeichneten Versuch wirkte die Sodalösung nur 30 Min. bei etwa 20° ein.

Wie man sieht, gibt Lacto-*N*-tetraose unter diesen Bedingungen mehr Farbstoff als ihrem Gehalt an *N*-Acetyl-glucosamin entspricht, nämlich 133–135%. Beide synthet. Disaccharide geben Farbstoff, unabhängig davon ob der *N*-Acetyl-glucosamin-Rest reduzierend ist oder nicht. Die Lacto-*N*-biose I gibt nach 30 Min. bei 20° etwa halb soviel Farbstoff wie nach 5 Min. in der Hitze.

9. Papierchromatographische Kennzeichnung: Als Papier diente Nr. 2043b von Schleicher & Schüll, als Lösungsmittel ein Gemisch von Essigester: Pyridin: Wasser = 2:1:2 (obere Schicht)*). Die Laufzeiten der absteigend durchgeführten Chromatogramme betragen 12 Stdn. (für AAG) bis 48 Stdn. (für IIc bis IV aus Frauenmilch). Angesprüht wurden die im kalten Luftstrom (Föhn) getrockneten Papiere mit saurem Anilin-

²²) R. Jeanloz, Helv. chim. Acta 27, 1509 [1944]; vgl. R. Kuhn u. I. Löw, Chem. Ber. 86, 1030 [1953].

²³) Biochem. J. 23, 517 [1929].

Tafel 2.

Substanz	Einwaage mg	entspr. mg Acetylglucosamin	E (nach 90 Min.)	rel. Farbstärke auf gleiche N-Menge bezogen
<i>N</i> -Acetylglucosamin	0.426	0.426	0.68	100
Lacto- <i>N</i> -tetraose	1.543	0.488	1.05	135
Lacto- <i>N</i> -biose I	0.904	0.522	0.87	105
Lacto- <i>N</i> -biose I*	0.904	0.522	0.37	44
			E (nach 120 Min.)	
<i>N</i> -Acetylglucosamin	0.426	0.426	0.73	100
Lacto- <i>N</i> -tetraose	1.268	0.396	0.90	133
6- β - <i>N</i> -Acetylglucosaminido-glucose	0.856	0.494	0.23	27
6- β -Galaktosido- <i>N</i> -acetylglucosamin	0.782	0.451	0.35	45

phthalat nach S. M. Partridge²⁴). Zum Nachweis von AAG und von Galaktosido-AAG, die mit Anilinphthalat nur schwache Gelbfärbung geben, diente eine Lösung von *p*-Dimethylamino-benzaldehyd (1.00 g in 30 ccm Äthanol + 30 ccm konz. Salzsäure + 180 ccm *n*-Butanol)²⁵). Man erhält schön violette Flecken, ohne daß erhitzt werden muß.

Tafel 3.

Substanz	R_{Glucose}	R_{Lactose}
„Anhydro- <i>N</i> -acetylglucosamin“ (AAG) .	1.70	—
<i>N</i> -Acetylglucosamin	1.24	—
6- β -Galaktosido-AAG	1.04	2.03
Glucose	1.00	1.96
Galaktose	0.87	1.70
Diacetylchitobiose	0.81	1.59
Lacto- <i>N</i> -biose I	0.76	1.49
<i>N</i> -Disaccharid aus Mekonium ²⁶)	0.71	1.39
Maltose	0.64	1.25
Cellobiose	0.63	1.23
6- β -Galaktosido- <i>N</i> -acetylglucosamin ...	0.59	1.15
Lacto- <i>N</i> -biose II	0.57	1.12
Lactose	0.51	1.00
6- β - <i>N</i> -Acetylglucosaminido-glucose ...	0.49	0.96
6- β - <i>N</i> -Acetylglucosaminido-galaktose ..	0.46	0.90
Allolactose (synthet.)	0.41	0.80
Komponente IV aus Frauenmilch	(0.37)	0.73
Lacto- <i>N</i> -triose II	(0.36)	0.70
Lacto- <i>N</i> -triose I	(0.26)	0.51
Lacto- <i>N</i> -tetraose (IIIc aus Frauenmilch)	(0.18)	0.36
Komponente IIIb aus Frauenmilch	(0.14)	0.27
Komponente IIIa aus Frauenmilch	(0.10)	0.19
Komponente IIc aus Frauenmilch	(0.06)	0.11

Die eingeklammerten Werte sind berechnet aus den R_{Lactose} -Werten.

²⁴) S. M. Partridge, Nature [London] 146, 443 [1949].

²⁵) S. M. Partridge, Biochem. J. 42, 238 [1948].

²⁶) R. Kuhn u. W. Kirschenlohr, Chem. Ber. 87, Nr. 4 [1954].

Für alle *N*-acetyl-hexosamin-haltigen Verbindungen wurden die Papiere zunächst mit einer Lösung von 5 ccm 50-proz. wäßr. Kalilauge + 20 ccm Äthanol + 500 ccm *n*-Butanol besprüht und 5 Min. bei 105° getrocknet. Dann besprühte man mit der angegebenen *p*-Dimethylamino-benzaldehyd-Lösung, wobei – ohne neuerliches Erhitzen – die Violettfärbung nach 1–2 Min. auftrat.

Zur Prüfung auf AAG-Bildung wurden 2–10 mg Substanz mit 1 ccm 0.05*n* Na₂CO₃ im siedenden Wasserbad 5 Min. erwärmt, rasch abgekühlt und mit etwas Amberlite geschüttelt, bis die Prüfung mit Lyphan-Papier ergab, daß die Lösung neutral war. Das Filtrat wurde im Exsiccator zur Trockne gebracht und der Rückstand chromatographiert.

46. Herbert Brintzinger und Hans Ellwanger: Synthesen mit α -Chlor-äthylschwefelchlorid (VII. Mitteil.*) über organische Schwefelchloride)

[Aus dem Forschungsinstitut für Pigmente und Lacke, Stuttgart.]

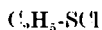
(Eingegangen am 11. August 1953)

Es wird über die Darstellung von α -Chlor-äthylschwefelchlorid sowie über die mannigfaltigen, mit dieser Verbindung durchführbaren Synthesen, die u. a. auch zur Bildung von Makromolekülen durch Polykondensation und Polymerisation führen, berichtet.

Die große und vielfältige Reaktionsfähigkeit der von uns¹⁾ dargestellten Verbindungen Methylschwefelchlorid und Chlormethylschwefelchlorid legte den Gedanken nahe, auch die Homologen dieser Grundverbindungen darzustellen und die Möglichkeiten ihres Einsatzes für weitere Synthesen schwefelhaltiger Verbindungen zu untersuchen. Die Reaktionen des Äthylschwefelchlorids haben wir bereits in der VI. Mitteil.*) beschrieben; im folgenden berichten wir über die Synthese des α -Chlor-äthylschwefelchlorids und seine außerordentlich große Verwendungsmöglichkeit für die verschiedenartigsten Synthesen.

Die Darstellung der Alkyl- und Chloralkylschwefelchloride erfolgt durch Chlorieren der entsprechenden Dialkyldisulfide, die nur gelingt, wenn das Chlor die S–S-Bindung leichter als den Alkylrest angreift. Wie H. Brintzinger und Mitarbb.¹⁾ beim Dimethyldisulfid zeigten, ist dies bei Temperaturen zwischen –15° und –20° der Fall. Durch weitergehende Chlorierung bei höherer Temperatur kann dann leicht am schwefelständigen C-Atom ein weiteres Chloratom eingeführt werden.

Wir haben nach diesem Verfahren das Äthylschwefelchlorid I, das α -Chlor-äthylschwefelchlorid II und das Trimethylen-bis-schwefelchlorid III hergestellt.



I



II



III

*) VI. Mitteil.: H. Brintzinger u. M. Langheck, Chem. Ber. **86**, 557 [1953].

¹⁾ H. Brintzinger, K. Pfannstiel, H. Koddebusch u. K. E. Kling, Chem. Ber. **83**, 87 [1950]; siehe auch K. E. Kling, Dissertat. Jena, 1945; H. Brintzinger, H. Schmahl u. H. Witte, Chem. Ber. **85**, 338 [1952]; H. Brintzinger, H. Koddebusch, K. E. Kling u. G. Jung, Chem. Ber. **85**, 455 [1952]; H. Brintzinger, H. Ellwanger u. H. Schmahl, Angew. Chem. **64**, 398 [1952]; H. Brintzinger, M. Langheck, H. Schmahl u. H. Ellwanger, Angew. Chem. **64**, 398 [1952]; H. Brintzinger u. M. Langheck, Chem. Ber. **86**, 557 [1953].