

dukt 0.9 g, entspr. 30%, eines braunen, zähflüssigen Öles extrahiert. Die Prüfungen des Methanol-Extraktes mit $\text{Fe}(\text{SCN})_2$, mit Fuchsin-schwefliger Säure, mit Semicarbazid, mit Phenylisocyanat und mit Permanganat verliefen negativ.

$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_2$ (194.3) Ber. C 74.20 H 9.34

Gef. C 74.68 H 9.41 Mol.-Gew. 195 (in Bzl.)

Verhalten des Ringperoxydes gegen verd. Schwefelsäure: 6 g Peroxyd X wurden mit 50 ccm 15-proz. Schwefelsäure $2\frac{1}{2}$ Stdn. auf 90° erhitzt. Aus der organischen Schicht wurde 1 g, entspr. 17%, 1-Cyclohexyliden-cyclohexanon-(2) (XIV) vom Sdp._{0.1} $75-77^\circ$ gewonnen.

$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}$ (178.3) Ber. C 80.90 H 10.11 Gef. C 80.95 H 9.58

Das Keton entfärbte Permanganat in Aceton. In konz. Schwefelsäure löste es sich mit tiefdunkelroter Farbe, bei Wasserzugabe verschwand diese unter Keton-Ausscheidung, bei Zugabe einiger Tropfen konz. Salpetersäure zur dunkelroten Lösung trat Braunfärbung ein. Diese Farbreaktionen¹¹⁾ sind spezifisch für α,β -ungesättigte Ketone. Schmp. des Semicarbazons: $168-172^\circ$ ⁸⁾.

88. Richard Kuhn und Werner Kirschenlohr: Über ein Galaktosido-N-acetyl-glucosamin aus den Blutgruppensubstanzen des Mekoniums

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

(Eingegangen am 18. Februar 1954)

Durch Fällung von Begleitstoffen mit Invertseifen lassen sich aus 1 kg Mekonium 40 bis 50 g serologisch hochwirksamer Blutgruppensubstanz gewinnen. Unter den Produkten, die bei partieller Säurehydrolyse auftreten, findet sich ein schön kristallisierendes Disaccharid vom Schmp. $170-171^\circ$, und $[\alpha]_D^{20}: +51.5^\circ \rightarrow 28.5^\circ$ (Wasser), das aus *d*-Galaktose und *N*-Acetyl-glucosamin aufgebaut ist. Es liefert mit Phenylhydrazin Lactosazon, woraus folgt, daß es sich um eine 2-Desoxy-2-acetamino-lactose handelt.

d-Galaktose und *d*-Glucosamin-hydrochlorid hat erstmals K. Freudenberg¹⁾ als Spaltstücke der Blutgruppen-Substanzen erkannt und isoliert. Z. Yosizawa²⁾ erhielt aus dem Mucin des Schweinemagens durch partielle Säurehydrolyse ein *N*-haltiges Disaccharid mit $[\alpha]_D^{20}: +57.8^\circ$, das diese beiden Bausteine enthält. Auf Grund von Abbauersuchen mit Perjodat³⁾ und von synthetischen Versuchen⁴⁾, die zu keinen kristallisierten Produkten führten, kam er zu dem Schluß, daß es sich um ein Galaktosido-*N*-acetylglucosamin und zwar um 2-Desoxy-2-acetaminolactose (Acetylglucosamin-4 β -galaktosid) handelt.

Ausgangsmaterial für unsere Versuche war Mekonium, das nach D. J. Buchanan und S. Rapoport^{5), 6)} reich an Blutgruppensubstanzen ist. Zur Abtrennung von Begleitstoffen benützten diese Autoren das Sevag-Ver-

¹¹⁾ K. H. Bauer, Die organische Analyse, Akademie-Verl. Leipzig 1945, S. 205; G. Reddelien, Ber. dtsh. chem. Ges. **45**, 2904 [1912].

¹⁾ K. Freudenberg u. H. Eichel, Liebigs Ann. Chem. **510**, 240 [1934]; **518**, 97 [1935].

²⁾ Tohoku J. exp. Med. **51**, 51 [1949].

³⁾ Tohoku J. exp. Med. **52**, 111 [1950].

⁴⁾ Tohoku J. exp. Med. **52**, 145 [1950].

⁵⁾ Science [New York], **112**, 150 [1950].

⁶⁾ J. biol. Chemistry **192**, 251 [1951].

fahren⁷⁾. Sie schüttelten die Suspension von 1 Tl. Mekonium in 2 Tln. Wasser 7 mal mit 25 % eines Gemisches von Kohlenstofftetrachlorid: Amylalkohol = 10:1. Dabei bleiben die Blutgruppensubstanzen in der oberen wäßr. Schicht. Dieses Verfahren benützten auch wir, doch stellte sich heraus, daß so dargestellte Präparate, obwohl sie mit Trichloressigsäure, Bleiacetat, Kupfersalzen, Ammoniumsulfat u.a. keine Fällungen mehr gaben, noch immer über 50 % an Substanzen enthalten, die mit Invertseifen fällbar sind. Daraufhin haben wir 10-proz. Lösungen bzw. Suspensionen von Mekonium in Wasser direkt mit Invertseifen versetzt und gefunden, daß sich so durch eine einzige Fällung mehr Begleitstoffe abtrennen lassen als durch 12 mal aufeinanderfolgende Enteweißungen nach dem Sevag-Verfahren. Die Fällung gelingt am besten bei schwach alkalischer Reaktion (p_H 8.4)⁸⁾. Auf 1 kg Mekonium werden etwa 100 g bzw. 1 l 10-proz. Lösung von Zephirol⁹⁾ (Alkyl-dimethylbenzyl-ammoniumchloride) benötigt. Die Fällung sitzt gut ab. In Lösung geliebene Invertseife entfernen wir durch Kationenaustauscher, worauf man ohne Schäumen i. Vak. einengen und in bekannter Weise¹⁰⁾ mit Alkohol fraktionieren kann. Man erhält aus 1 kg Mekonium, das etwa 250 g Trockensubstanz enthält, 40 bis 50 g Blutgruppensubstanz, die bei Äthanol-Konzentrationen zwischen 50 und 68 Vol-% ausfällt.

Die Bestimmung der Blutgruppenaktivitäten wurde in Form von Hemmungsversuchen¹¹⁾ am Institut für Blutgruppenforschung (Leiter: Prof. Dr. med. P. Dahr) durchgeführt. Die 0.2-proz. Lösungen der Präparate in physiologischer Kochsalzlösung (in Verdünnungen 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000) wurden mit dem gleichen Volumen von Anti-A bzw. Anti-B-Test-Seren vermischt. Um optimale Bindung der Serum-Agglutinine durch die Blutgruppensubstanzen zu erzielen, wurde bei $\sim 4^\circ$, $\sim 20^\circ$ und bei 37° gehalten. Hierauf wurde die Senkung des Titers gegenüber A_1 , A_2 - und B-Blutkörperchen festgestellt.

Das nach dem Sevag-Verfahren gewonnene Präparat hemmte in den Verdünnungen 1:10 und 1:100 die Agglutination von A_1 -Blutkörperchen in allen 6 Stufen völlig. Bei einer Verdünnung 1:1000 wurde der Titer um 2 Stufen gesenkt. Die Agglutination von A_2 -Blutkörperchen wurde bei Verdünnungen von 1:10 und 1:100 vollständig gehemmt; bei 1:1000 erfolgte Hemmung um 4 Stufen. Beim Test mit Anti-B-Serum gegen B-Blutkörperchen hemmte das Sevag-Präparat in unverdünnter Lösung völlig; nach Verdünnung 1:10 um 3 Stufen.

Wurde das nach Sevag gewonnene Präparat mit Zephirol weiter gereinigt, so stieg die Wirksamkeit. Beim Verdünnen 1:1000 war gegen A_1 - und A_2 -Blutkörperchen die Aktivität um 1 Stufe erhöht und auch die Aktivität gegen B deutlich gestiegen. Für die direkt mit Invertseife gereinigten Präparate ergab sich dieselbe Wirksamkeit.

Zur partiellen¹⁾ Hydrolyse der gereinigten Blutgruppensubstanz erhitzen wir mit *n*-Schwefelsäure 30 Min. auf 90° , in Anlehnung an die für die Oligosaccharide der Frauenmilch genauer ermittelten Bedingungen¹²⁾. Neben Fucose, Galaktose, Acetylglucosamin und etwas Glucosamin traten Peptide, Amino-

⁷⁾ M. G. Sevag, Biochem. Z. 273, 419 [1934].

⁸⁾ Über die p_H -Abhängigkeit von Invertseifen-Fällungen vergl. R. Kuhn u. H.-J. Bielig, Ber. dtsch. chem. Ges. 73, 1080 [1940].

⁹⁾ Bayer-Leverkusen.

¹⁰⁾ D. Aminoff, W. T. J. Morgan, W. M. Watkins, Biochem. J. 46, 426 [1950].

¹¹⁾ P. Dahr, Die Technik der Blutgruppen- und Blutfaktorenbestimmung, 6. Auflage. G. Thieme, Stuttgart 1953.

säuren u. a. auf. Durch Chromatographie an Kohle-Celite-Säulen¹²⁾ wurde mit 2-proz. Äthanol eine Oligosaccharid-Fraktion gewonnen (1.7 g aus 40 g gereinigter Blutgruppensubstanz), die beim Verreiben mit Methanol kristallin erstarrte. Nach 2maligem Umkristallisieren wurden auf die Summenformel $C_{14}H_{25}O_{11}N + CH_3OH$ stimmende Analysen erhalten.

Das Disaccharid kristallisiert aus 50 Tln. siedendem Methanol in rechteckigen, glitzernden Täfelchen, die zwischen gekreuzten Nicols keine Auslöschung zeigen und 1 Mol Kristall-Methanol enthalten, das selbst bei 100° i. Vak. nicht abgegeben wird. In Wasser ist die Substanz leicht löslich, in Äthanol schwerer als in Methanol. Der Geschmack ist schwach süß. Der Schmelzpunkt liegt bei 170–171° (ohne Braunfärbung). Das kristallmethanolhaltige Disaccharid mutarotiert in wäßr. Lösung abwärts: $[\alpha]_D^{25} : +51.5^\circ$ (für $t=0$ extrapoliert) $\rightarrow +28.5^\circ$ (Enddrehung). Die Halbwertszeit betrug im folgenden Versuch ($c = 1.57$, 1-dm-Rohr) etwa 30 Minuten.

Mutarotation des Disaccharids

t (Min):	0	3	5	10	20	30	60	90	210	1000
$[\alpha]_D^{25}$:	(51.5°)	49.0°	47.6°	44.5°	42.6°	39.4°	34.3°	31.1°	28.5°	28.5°

Für methanol-freies Disaccharid berechnet sich $[\alpha]_D^{25} : +30.9^\circ$ (Enddrehung). Die Mutarotation spricht gegen das Vorliegen eines Methylglucosids. Dasselbe folgt aus dem Verhalten gegen Hypojodit, von dem unter den von MacL. eod. Robison¹³⁾ angegebenen Bedingungen genau 1 Mol. pro $C_{14}H_{25}O_{11}N + CH_3OH$ verbraucht wird. Durch Oxydation mit Chromsäure erhält man 1 Mol. flüchtige Säure (Essigsäure, die der Acetaminogruppe entstammt). Hydrolyse mit verd. Schwefelsäure liefert Galaktose und Glucosamin. Wird nach Oxydation mit Hypojodit die gebildete Acetamino-carbonsäure als Bariumsalz gefällt und dieses mit n H_2SO_4 bei 100° hydrolysiert¹⁴⁾, so findet man papierchromatographisch Galaktose, aber kein Glucosamin mehr. Hieraus folgt, daß das Acetylglucosamin der reduzierende Baustein des Disaccharids ist, und dieses ein Galaktosido-*N*-acetyl-glucosamin darstellt.

Es war somit zu erwarten, daß das Osazon mit demjenigen der Allo-Lactose (6- β -Galaktosido-glucose) oder der Lactose (4- β -Galaktosido-glucose) oder mit demjenigen der noch unbekanntem 3- β -Galaktosido-glucose identisch sein werde. Im Vergleich zu Glucosamin, das leicht Glucosazon liefert¹⁵⁾, reagiert *N*-Acetylglucosamin mit Phenylhydrazin viel schwieriger, doch gelingt es, wie kürzlich gezeigt wurde¹⁶⁾, auch bei acetylierter Aminogruppe in 2-Stellung reines Glucosazon (8–10% d. Th.) zu gewinnen. Das aus Mekonium gewonnene Disaccharid lieferte unter denselben Bedingungen Lactosazon (8–10% d. Th.) in gelben Nadeln, die sich aus wenig heißem Wasser umkristallisieren ließen und bei 206° schmolzen. Die Identifizierung mit einem aus Milchzucker dargestellten Präparat erfolgte durch Misch-Schmelzpunkt¹⁷⁾ und durch genauen Vergleich von Debye-Scherrer-Aufnahmen und Ultrarotspektren.

¹²⁾ R. L. Whistler u. D. F. Durso, J. Amer. chem. Soc. **72**, 677 [1950].

¹³⁾ Biochem. J. **23**, 517 [1929].

¹⁴⁾ Vergl. R. Kuhn u. I. Löw, Chem. Ber. **86**, 1027 [1953].

¹⁵⁾ F. Tiemann, Ber. dtsch. chem. Ges. **19**, 49 [1886].

¹⁶⁾ R. Kuhn, A. Gauhe u. H. H. Baer, Chem. Ber. **87**, 289 [1954].

¹⁷⁾ Bei Gemischen von Glucosazon mit Galaktosazon, von Glucosazon mit Lactosazon, von Lactosazon mit Allo-Lactosazon fanden wir Erniedrigungen von durchschnittlich 10°.

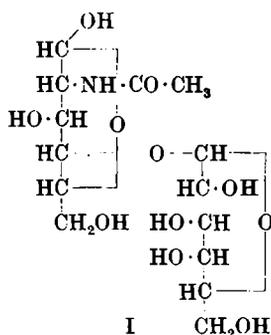
Die zuletzt genannten Methoden haben sich zur Identifizierung von Osazonen, die unter Zersetzung schmelzen, als sehr geeignet erwiesen. Jede von ihnen gestattet, Lactosazon, Allolactosazon¹⁸⁾, Glucosazon, Galaktosazon, Lacto-*N*-tetraosazon u. a. mit geringen Substanzmengen sofort voneinander zu unterscheiden. Aus dem Ultrarotspektrum des Osazons konnte man auch gleich erkennen, daß die Acetaminogruppe (Absorptionsbande bei 6.1 μ) bei der Umsetzung mit Phenylhydrazin eliminiert wurde wie es beim Acetylglucosamin der Fall ist. Dies steht mit dem gefundenen Stickstoffgehalt des Osazons in Übereinstimmung. Bei der Lacto-*N*-tetraose wird in guter Ausbeute ohne Eliminierung der Acetaminogruppe ein Osazon mit 5 Stickstoff-Atomen erhalten¹⁶⁾.

Die Bildung von Lactosazon zeigt, daß das aus Mekonium gewonnene Disaccharid eine 2-Desoxy-2-acetamino-lactose, d. h. ein 4- β -Galaktosido-*N*-acetylglucosamin ist. Über etwaige strukturelle Feinheiten an den Kohlenstoff-Atomen 1 und 2 der stickstoffhaltigen Hälfte vermag der vorliegende Konstitutionsbeweis naturgemäß nichts auszusagen, da solche bei der Osazonbildung verwischt werden. Die Mutarotation des Disaccharids und die Verknüpfung in 4-Stellung sprechen dafür, daß der Rest des Acetylglucosamins in der Pyranoseform vorliegt (I). Die von Herrn Dr. H. H. Baer bestimmte Kinetik des Perjodatverbrauchs steht mit I in guter Übereinstimmung: es werden nur 2 Moll. Perjodat schnell verbraucht, nämlich durch die beiden Glykolgruppierungen des Galaktoseresites.

Durch partielle Säurehydrolyse von Mucin aus Schweinemagen haben R. M. Tomarelli, E. Linden und F. W. Bernhart¹⁹⁾ ein kristallisiertes Disaccharid erhalten, das aus Galaktose und Acetylglucosamin aufgebaut ist. Herr F. W. Bernhart hatte die Freundlichkeit, uns eine Probe davon zu überlassen, wofür wir ihm

aufrichtig danken. Wir fanden, daß seine Substanz im Schmp. (166–168°) und im Misch-Schmp. (166–168°), im Drehungsvermögen $[\alpha]_D^{20} : +51^\circ \rightarrow +28^\circ$ (Wasser) sowie papierchromatographisch mit unserem Disaccharid übereinstimmt. In Essigester : Pyridin : Wasser = 50 : 35 : 15²⁰⁾ ist für beide Präparate $R_{\text{Glucose}} = 0.70$. Wir möchten daraus folgern, daß bereits aus dem Mucin des Schweinemagens 2-Desoxy-2-acetamino-lactose erhalten worden ist. Gegenüber den von Z. Yosizawa gemachten Angaben über das stickstoffhaltige Disaccharid aus dem Mucin des Schweinemagens bleiben allerdings erhebliche Diskrepanzen bestehen.

Für die Sammlung von Mekonium haben wir Herrn Prof. Dr. H. Runge, Direktor der Universitäts-Frauenklinik Heidelberg, aufrichtig zu danken; für die Bestimmung der



¹⁸⁾ Herrn Dr. H. H. Baer danken wir für diese Substanz, die synthetisch nach B. Helferich u. G. Sparmberg, Ber. dtsh. chem. Ges. **66**, 806 [1933], gewonnen wurde.

¹⁹⁾ Fed. Proc. **12**, 431 [1953]. ²⁰⁾ G. Malvoth u. H. Stein, Biochem. Z. **322**, 165 [1951].

Blutgruppenwirksamkeiten Herrn Prof. Dr. P. Dahr, Leiter des Instituts für Blutgruppenforschung, Göttingen, sowie Herrn Dr. Kindler, Bensberg bei Köln; für technische Hilfe bei der Aufarbeitung des Mekoniums Fräulein G. Seel; für die Ultrarot-aufnahmen Herrn Dr. W. Otting; für die Debye-Scherrer-Aufnahmen Herrn E. Röhm; für die Hypojodit-Titrationen und Hexosaminbestimmungen Fräulein D. Tschampel.

Beschreibung der Versuche

I. Gewinnung von Blutgruppen-Substanzen aus Mekonium

a) Sevag-Verfahren: Das Mekonium wurde in der Frauenklinik unter Toluol gesammelt. Je 500 g wurden mit 4 l Wasser 2 Stdn. geschüttelt, mit etwas 2 n Essigsäure und Natriumacetat auf p_H 4.5 gebracht und nach dem von D. J. Buchanan und S. Rapoport⁶⁾ modifizierten Sevag-Verfahren⁷⁾ enteiweißt. Zu diesem Zweck haben wir mit einem Gemisch von 800 ccm Tetrachlorkohlenstoff und 80 ccm Amylalkohol 5 Stdn. geschüttelt und diese Operation 6mal wiederholt. Jedesmal wurde abzentrifugiert (3000 U/Min.) und nur die überstehende Lösung weiter verarbeitet.

Zuletzt haben wir bei etwa 20 Torr auf 500 ccm eingeengt und mit 1260 ccm 95-proz. Alkohol gefällt (Endkonz. 68 Vol-% Alkohol). Nach 2 Stdn. wurde die klebrige graue Fällung abzentrifugiert und mit 95-proz. Alkohol verrieben, wobei sie fest wurde. Ausb. 41 g. Nach Trocknung bei 75° (16 Stdn. über Diphosphorpentoxyd unter 20 Torr) fanden wir 6.9% N, 17% Hexosamin²¹⁾ und $[\alpha]_D^{20}$: $-22^\circ \pm 3^\circ$ (Wasser, $c = 0.5$). Weitere 6–7 g fielen, als die Alkohol-Konzentration der Mutterlauge auf 85% erhöht wurde: 5.8% N, 16.6% Hexosamin und $[\alpha]_D^{20}$: $-21^\circ \pm 1^\circ$ (Wasser, $c = 0.8$).

Die mit 68-proz. Alkohol gefällte Substanz (5 g in 150 ccm Wasser mit 2 n NH₃ auf p_H 8.4 gebracht) ließ sich durch Zusatz von Invertseife (27 ccm 10-proz. Zephirol) weiter enteiweißen. Man erhielt eine starke Fällung, die abzentrifugiert, in 50 ccm Methanol gelöst und mit 5 ccm 2 n Salzsäure versetzt wurde. Dabei fielen 2.6 g weniger wirksame Substanzen aus, die 6.5% N und nur 12.6% Hexosamin enthielten; $[\alpha]_D^{20}$: $-17^\circ \pm 3^\circ$ (Wasser, $c = 0.4$).

Die durch Invertseife gereinigte Lösung gab auf Zusatz von Alkohol (Endkonz. = 68%) 1.5 g hochwirksame Fällung: 6.0% N, 22.0% Hexosamin, $[\alpha]_D^{20}$: -18.7° (Wasser, $c = 0.6$).

Mit mehr Alkohol (Endkonz. = 85%) fielen nur noch 0.2 g wenig wirksame Substanz: 5.8% N, 20% Hexosamin, $[\alpha]_D^{20}$: -25.8° ($c = 0.9$).

b) Invertseifen-Verfahren: Je 500 g Mekonium werden mit 5 l Wasser 2–3 Stdn. geschüttelt, mit 2 n NH₃ auf p_H 8.4 gebracht und mit 10-proz. Zephirol-Lösung bis zur maximal erreichbaren Fällung versetzt. Hierzu sind meist 500 ccm erforderlich. Überschüssige Invertseife bringt die Fällung wieder in Lösung! Man gebe solange Zephirol-Lösung zu bis sich rasch absitzende Flocken bilden und in einer abzentrifugierten Probe mit mehr Zephirol keine Trübung mehr auftritt. Man schleudert die Gesamtfällung bei 3000 U/Min. ab, wäscht das dunkelgrün gefärbte, zähe Sediment zweimal durch 2–3stdg. Schütteln mit je 1 l Wasser und vereinigt die Waschwässer mit der Hauptlösung.

Das Sediment haben wir in 3 l Methanol gelöst, mit 2 n HCl auf p_H 1–2 gebracht und gut geschüttelt. Dabei fielen 46 g Substanz aus: N = 7.4%. Zum Vergleich sei angeführt, daß das entsprechende Sediment aus 500 g Mekonium nach 7 Sevag-Trennungen nur 34 g wog und 8.8% N enthielt. Nach dem Invertseifen-Verfahren wird also mehr an wenig aktiven Substanzen abgetrennt.

Die 7-l-Lösung, in der sich die Hauptmenge der Blutgruppensubstanzen befindet, werden zur Entfernung der darin enthaltenen Invertseife durch eine 50 cm lange Säule (Durchm. 6 cm) filtriert, die mit dem Kationenaustauscher Amberlite IR 120 (H) beschickt ist²²⁾. Das etwas trübe Filtrat wird durch Eintropfenlassen in Natriumacetat-

²¹⁾ Bestimmung nach W. T. J. Morgan u. A. L. Elson, Biochem. J. 27, 1824 [1933].

²²⁾ Der Firma Rohm & Haas, Philadelphia/Pa., danken wir für die Überlassung aufrichtig.

lösung sofort auf p_H 4.5 abgestumpft, auf 500 ccm eingengt und mit 95-proz. Alkohol gefällt (Endkonz. 68% Alkohol). Man zentrifugiert und verreibt das klebrige, grau-stichige Sediment mit 95-proz. Alkohol, wobei es fest und pulvrig wird. Ausb. 20–25 g, N = 6.2%. Man löst in 300 ccm Wasser und zentrifugiert 30 Min. bei 30000 U/Min. (Spinco-Zentrifuge), wobei 3.5 g sedimentieren (N = 7.4%) und die Lösung ganz klar wird. Aus der klaren Lösung fallen wir die Blutgruppensubstanzen mit 95-proz. Alkohol bis zur Endkonzentration von 70 Vol.% Alkohol. Man erhält 17 g hochaktive Fällung; 5.6% N, 21% Hexosamin, $[\alpha]_D^{25}$: -20° (Wasser, $c = 0.8$).

Geht man mit der Alkoholkonzentration von 70 auf 90%, so fallen noch 3 g Substanz mit 5.4% N.

2. Partielle Hydrolyse der Blutgruppensubstanzen

Die nach dem Sevag- und nach dem Invertseifen-Verfahren gewonnenen Präparate können auf gleiche Weise der Säurehydrolyse unterworfen werden. Da die Invertseifen-Präparate serologisch wirksamer als die Sevag-Präparate waren und weniger Begleitstoffe bei der partiellen Hydrolyse lieferten, haben wir erstere bevorzugt verarbeitet.

40 g Blutgruppensubstanz (Invertseifen-Verfahren, Fällung mit 68-proz. Alkohol) werden mit langsam steigenden Mengen Wasser (5-ccm-Portionen) angeteigt und schließlich in 1 l Wasser gelöst. Man erhitzt im Wasserbad auf 90° , gibt 1 l 90° warme 2 n H_2SO_4 zu und beläßt $\frac{1}{2}$ Stde. bei dieser Temperatur. Dann wird mit Eis gekühlt und mit heiß gesätt. Barytwasser genau gefällt. Die abzentrifugierte, hellbraune Lösung (2500 ccm), deren p_H zwischen 5 und 5.5 liegt, wird zusammen mit den Waschwässern (1500 ccm) des Bariumsulfats bei ~ 20 Torr auf 200 ccm eingengt.

Zur Ausfällung höhermolekularer Stoffe versetzt man die 200 ccm mit 95-proz. Alkohol bis zur Endkonzentration von 68 Vol.%. Die getrocknete Fällung wiegt 6–8 g.

Die überstehende alkohol. Lösung, die das stickstoffhaltige Disaccharid enthält, verdampft man i. Vak. bis zur sirupösen Konsistenz und nimmt den braunen Rückstand in 50 ccm Wasser auf.

Die wäßr. Lösung läßt man durch eine 50 cm lange Säule (Durchm. 5 cm) laufen, die nach R. L. Whistler und D. F. Durso¹²⁾ mit einem Gemisch von 150 g Carboraffin und 150 g Celite beschickt ist. Mit 6000 ccm Wasser gingen Aminosäuren, Galaktose, Fucose u. a. ins Filtrat, mit 35 l 2-proz. Alkohol und 8 l 5-proz. Alkohol folgten Oligosaccharide, unter denen sich unsere Biöse befand. Mit 27.5 l 2-proz. und 2.5 l 5-proz. Alkohol konnte das Disaccharid völlig aus der Säule ausgewaschen werden.

Es wurden je 200 ccm der Filtrate getrennt aufgefangen und davon je 9 ccm verdampft und jeder Rückstand papierchromatographisch geprüft. Als Lösungsmittel diente Essigester: Pyridin: Wasser = 50:35:15²⁰⁾, als Papier Schleicher & Schüll 2043 b. Die Laufzeiten (absteigend) betragen 24–36 Stdn. Besprüht wurde mit saurem Anilinphtalal. Das stickstoffhaltige Disaccharid färbt sich dabei nicht rein braun wie Glucose, Galaktose, Lactose oder die beiden von uns synthetisierten stickstoffhaltigen Disaccharide²³⁾ sondern viel gelbstichiger.

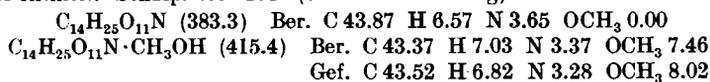
Die das Disaccharid enthaltenden Fraktionen wurden verdampft und über Silicagel getrocknet. Ausbeute an schwach braunstichigem Rohprodukt: 1.7 g (aus 40 g gereinigter Blutgruppensubstanz). Dieses enthält neben der 2-Desoxy-2-acetamino-lactose ($R_{Glucose} = 0.70$) noch ein etwas schneller wanderndes Saccharid ($R_{Glucose} = 0.78$), das sich mit saurem Anilin-phtalal ebenfalls gelb-braun färbt und ein etwas langsamer wanderndes ($R_{Glucose} = 0.59$), das die normale Braunfärbung gibt. Beide bleiben beim Umkristallisieren in der Mutterlauge.

3. 2-Desoxy-2-acetamino-lactose

Das aus Mekonium gewonnene stickstoffhaltige Disaccharid kristallisiert aus siedendem Methanol in glitzernden nahezu quadratischen Täfelchen. Zur Analyse wurde 20 Stdn.

²³⁾ R. Kuhn u. W. Kirschenlohr, Chem. Ber. 87, 384 [1954].

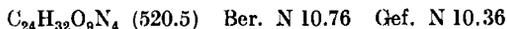
bei 110°/15 Torr getrocknet, wonach die Substanz noch immer etwa 1 Mol. Kristall-Methanol enthielt. Schmp. 169–171° (ohne Braunfärbung).



Die Mutarotation bei 23° verlief mit einer Halbwertszeit von 30 Min. $[\alpha]_D^{25}$: +51.5 → +28.5° (Wasser, $c = 1.57$). Fehlingsche Lösung wird beim Kochen reduziert, Hypojodit schon in der Kälte. Nach MacLeod-Robison fanden wir (30 Min. bei 20–24°) das Äquiv.-Gew. zu 412 und 429 (ber. 415). Die durch Hypojodit gebildete 2-Desoxy-2-acetaminolactobionsäure wurde in 2 Versuchen, zu denen 31 bzw. 34 mg des Disaccharids dienten, ins Bariumsalz verwandelt und dieses mit $n \text{ H}_2\text{SO}_4$ 3 Stdn. bei 105° hydrolysiert. Danach ließ sich mit Anilinphtalat nur Galaktose papierchromatographisch nachweisen, nicht aber Glucosamin.

Ein von Dr. H. H. Baer und Dr. A. Gauhe aus den höheren Oligosacchariden der Frauenmilch durch partielle Säurehydrolyse in geringer Menge gewonnenes, aus Methanol schön kristallisierendes Disaccharid hat sich nach Misch-Schmp., R_f -Wert u. a., als identisch mit dem Galaktosido-*N*-acetylglucosamin aus Mekonium erwiesen.

Lactosazon: 100 mg, in einem weiteren Versuch 95 mg des Disaccharids aus Mekonium wurden mit 1 g Phenylhydrazin-hydrochlorid und 0.5 g Natriumacetat ($3 \text{ H}_2\text{O}$) in 7 cm Wasser gelöst und $1\frac{1}{2}$ Stdn. im Dampfbad erhitzt. Beim Erkalten schied sich öliges Osazon ab, das abzentrifugiert und mit kaltem Wasser verrieben wurde, wobei es pulvrig wurde. Dieses Rohprodukt lösten wir in 2–3 cm heißem Wasser, aus dem sich das Osazon beim Erkalten in feinen, dunkelgelben Nadeln abschied. Ausb. 9 mg, im zweiten Versuch 10 mg. Zur Analyse wurde 3 mal aus wenig heißem Wasser umkristallisiert.



Das UR-Spektrum beider Präparate war im gesamten geprüften Bereich von 2–15 μ mit demjenigen von Lactosazon aus Milchzucker identisch, von demjenigen des Allosactosazons, vor allem in den Bereichen 8–9 μ und 11–12 μ , verschieden. Der Vergleich mit Glucosazon, Galaktosazon und Lacto-*N*-tetraosazon ergab stärkere Verschiedenheiten. Auch in den Debye-Scherrer-Aufnahmen stimmten beide Osazonproben mit Lactosazon aus Milchzucker überein.

89. Hermann Stetter und Ernst-Egon Roos: Eine Synthese makrocyclischer, stickstoffhaltiger Ringsysteme

[Aus dem Chemischen Institut der Universität Bonn]

(Eingegangen am 18. Februar 1954)

Ausgehend von Äthylendiamin und *p*-Phenylendiamin wurden zwei makrocyclische Ringsysteme mit 20 und 22 Ringgliedern erhalten. Als Ringschlußreaktion diente hierbei die Kondensation von Alkaliverbindungen der *p*-Toluolsulfonamide mit α,ω -Dibrom-Verbindungen in Dimethylformamid als Lösungsmittel.

Die unter geeigneten Bedingungen sehr glatt verlaufende Kondensation der Alkaliverbindungen von Sulfonamiden mit Halogenverbindungen erweist sich als hervorragend geeignet, um aus leicht zugänglichen Ausgangsmaterialien Ringschlüsse zu hochgliedrigen stickstoffhaltigen Ringsystemen durchzuführen.