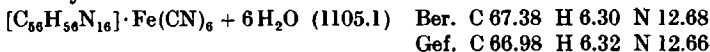


p- (13 aq.), Nitro-benzyl-chinolinium- und -isochinolinium (je 6 aq.) -hexacyano-ferrat(II) und das [4-Chlor-2-nitro-benzyl]-isochinolinium (8 aq.). – Das Cinnamyl-pyridinium-hexacyano-ferrat(II) (6 aq.)²¹⁾ gibt nunmehr, nach Umkristallisieren aus wenig Wasser, besser stimmende Analysenzahlen:



In Tafel I nicht aufgeführt sind die ebenfalls analysierten Salze 3-Chlor-benzyl- (rosa-violette, feine Nadeln vom Schmp. 169–170°), 4-Jod-benzyl- (rosa-violette Blättchen und Tafeln vom Schmp. >180°), 3,4-Dichlor-benzyl- (Drusen rotvioletter, schmaler Blättchen vom Schmp. 163–166°) und 4-Chlor-2-nitro-benzyl-pyridinium-hexacyano-ferrat (violette Tafeln vom Schmp. 152°); sie alle bilden Tetrahydrate.

Zum Studium der Pseudomorphosen sind besonders geeignet: 2,4-Dichlor-, 3,4-Dichlor-benzyl-pyridinium-, *p*-Nitro-benzyl- α -picolinium-, *p*-Nitro-benzyl-3-brom-pyridinium-, Phenacyl-2-chlor-pyridinium-hexacyano-ferrat(II), ferner *p*-Chlor-benzyl-chinolinium-, *p*-Cyan- und *p*-Nitro-benzyl-isochinolinium-hexacyano-ferrat(II). Alle Schmp. sind unkorrigiert.

182. Richard Kuhn, Adeline Gauhe und Hans Helmut Baer: Einfluß von Substituenten auf die Farbreaktion von *N*-Acetyl-glucosamin mit *p*-Dimethylamino-benzaldehyd

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

(Eingegangen am 6. Juni 1954)

In 4-Stellung substituierte *N*-Acetyl-glucosamine geben die
Morgan-Elson-Reaktion nicht.

Erwärmt man *N*-Acetyl-glucosamin, z. Beisp. 0.1 bis 1 mg, mit 1 ccm 0.05*n* Na₂CO₃ 5 Min. im siedenden Wasserbad, fügt nach dem Erkalten einige ccm Eisessig zu und versetzt mit 1 ccm einer 2-proz. Lösung von *p*-Dimethylamino-benzaldehyd in Eisessig, welcher 2.5 Vol% konz. Salzsäure enthält, so bildet sich ein rotvioletter Farbstoff¹⁾, den man bei geeigneter Verdünnung kolorimetrisch bestimmen kann²⁾. Das durch Alkalieinwirkung auf *N*-Acetyl-glucosamin entstehende Chromogen ist papierchromatographisch einheitlich und als AAG (Anhydro-acetyl-glucosamin, $R_{\text{Glucose}} = 1.70$)³⁾ bezeichnet worden.

Da die Farbreaktion von den α - und β -Methyl-*N*-acetyl-glucosaminiden nicht gegeben wird, hat man vielfach angenommen, daß sie bei stickstoffhaltigen Di-, Tri-, Oligo- und Poly-sacchariden unbekannter Konstitution eine Aussage darüber ermöglicht, ob reduzierende („kopfständige“) *N*-Acetyl-hexosamin-Reste vorhanden sind oder nicht. Wir haben jedoch gefunden, daß es einerseits reduzierende Derivate des *N*-Acetyl-glucosamins gibt, die keine Substituenten an der OH-Gruppe des C-Atoms 1 tragen und gleichwohl Morgan-

²¹⁾ F. Kröhnke, Chem. Ber. 83, 49 [1950].

¹⁾ F. Zuckermandl u. L. Messiner-Klebermaß, Biochem. Z. 263, 19 [1931].

²⁾ W. T. J. Morgan u. L. A. Elson, Biochem. J. 28, 988 [1934]; D. Aminoff, W. T. J. Morgan u. W. M. Watkins, Biochem. J. 51, 379 [1952].

³⁾ R. Kuhn, A. Gauhe u. H. H. Baer, Chem. Ber. 87, 289 [1954].

Elson-negativ sind; andererseits auch solche, bei denen das C-Atom 1 an einer glykosidischen Bindung beteiligt ist und die dennoch die Morgan-Elson-Reaktion geben:

A. Trotz reduzierendem *N*-Acetyl-glucosamin-Rest geben keinen Farbstoff:

4- β -Galaktosido-*N*-acetyl-glucosamin⁴⁾

4- β -*N*-Acetyl-glucosaminido-*N*-acetyl-glucosamin⁵⁾

3.4.6-Trimethyl-*N*-acetyl-glucosamin⁶⁾

R. W. Jeanloz⁷⁾ hat für das von ihm synthetisierte 3.4-Dimethyl-*N*-acetyl-glucosamin nichts hinsichtlich der Farbreaktion mitgeteilt. Auf Grund unserer im folgenden angestellten Betrachtungen möchten wir negativen Ausfall der Probe erwarten.

B. Trotz nicht-reduzierendem *N*-Acetyl-glucosamin-Rest geben Farbstoff:

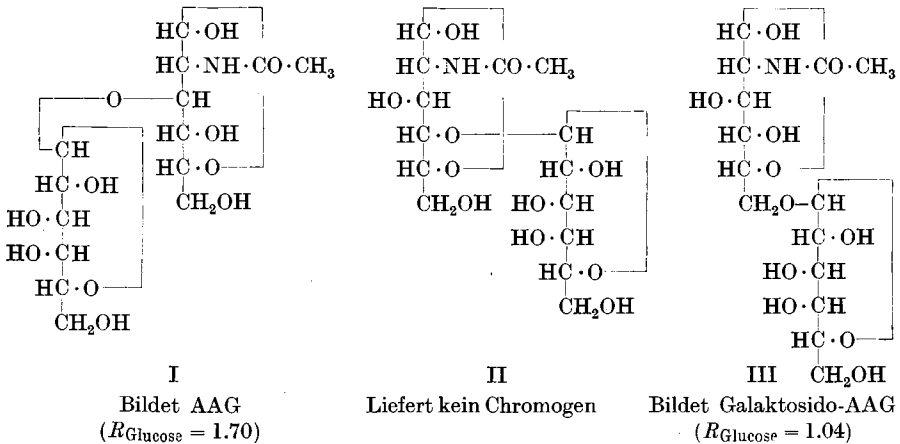
6- β -*N*-Acetyl-glucosaminido-glucose und -galaktose⁸⁾

Lacto-*N*-tetraose³⁾

Lacto-*N*-biose II³⁾

Lacto-*N*-triose I und II³⁾

Von besonderem Interesse ist der Vergleich der 3 isomeren Galaktosido-*N*-acetyl-glucosamine, die wir in Händen haben, nämlich der 3- β -(I)⁹⁾, der 4- β -(II)⁴⁾ und der 6- β -Verbindung (III)¹⁰⁾:



Lacto-*N*-biose I (I) zerfällt schon bei 20° mit 0.025*n* Na₂CO₃ in AAG + Galaktose. Der 3-Monomethyl-äther des *N*-Acetyl-glucosamins ist im Gegensatz zum 3.4.6-Trimethyl-äther Morgan-Elson-positiv. Gegen kaltes Alkali ist

⁴⁾ R. Kuhn u. W. Kirschenlohr, Chem. Ber. 87, 560 [1954].

⁵⁾ d.h. *N,N'*-Diacetyl-chitobiose, die wir nach M. Bergmann, L. Zervas u. E. Silberkweit, Ber. dtsh. chem. Ges. 64, 2436 [1931], aus Hummerschalen-Chitin herstellten. Das Präparat war papierchromatographisch einheitlich; $R_{\text{Glucose}} = 0.81$.

⁶⁾ Nach T. White, J. chem. Soc. [London] 1940, 428, soll dieser Trimethyläther die Farbreaktion geben, was wir jedoch nicht bestätigen können.

⁷⁾ J. Amer. chem. Soc. 74, 4597 [1952].

⁸⁾ R. Kuhn u. W. Kirschenlohr, Chem. Ber. 87, 384 [1954].

⁹⁾ Das von uns durch partielle Hydrolyse aus Lacto-*N*-tetraose erhaltene und als Lacto-*N*-biose I bezeichnete krist. Disaccharid³⁾ ist 3- β -Galaktosido-*N*-acetyl-glucosamin. Chem. Ber. 87, [1954], im Druck. ¹⁰⁾ R. Kuhn u. H. H. Baer, unveröffentlicht.

er zwar beständiger als (I), jedoch wird er durch heiße $0.025n \text{Na}_2\text{CO}_3$ leicht, und zwar unter Entmethylierung, in AAG übergeführt, also in dasselbe Chromogen, welches auch aus Lacto-*N*-biose I und aus freiem *N*-Acetyl-glucosamin entsteht ($R_{\text{Glucose}} = 1.70$)¹¹). Diese Befunde erweitern die Feststellung von J. Kenner und Mitarbeitern¹²), wonach in 3-Stellung substituierte Hexosen (3-Methyl-glucose, Laminaribiose, 3-Methyl-fructose) von Alkali (gesättigtem Kalkwasser, $0.05n \text{KOH}$) schon bei 25° gespalten werden.

Die Frage, warum die in 4-Stellung substituierten, unter A angeführten *N*-Acetyl-glucosamine keine Morgan-Elson-Reaktion geben, kann noch nicht endgültig beantwortet werden, da die chemische Natur des durch die Sodalösung gebildeten Chromogens (AAG) sowie diejenige des Farbstoffs noch nicht geklärt ist.

Hinsichtlich der von T. White⁶) vorgeschlagenen Konstitutionsformel des AAG, das noch nicht in kristallisierter Form beschrieben wurde, haben wir jedoch folgendes zu bemerken. Nimmt man die Bildung des Heteroringes zwischen den C-Atomen 1 und 2 in der von T. White vorgeschlagenen Form an, dann kann – wie eine Betrachtung an Stuart-Modellen lehrt – die O-Brücke nicht von C¹ nach C⁵ gehen, wie White annimmt, d. h. es kann das AAG nicht Pyranose-Struktur haben. Nimmt man dagegen eine O-Brücke von C¹ nach C⁴ an, d. h. Furanose-Struktur des AAG, dann läßt sich mit den zur Verfügung stehenden Modellen das Molekül leicht spannungsfrei aufbauen. Substituenten in 4-Stellung sollten demnach die Farbreaktion des *N*-Acetyl-glucosamins verhindern. Dies bezieht sich nicht auf esterartig gebundene Substituenten wie z. B. Acetyl, die beim Erwärmen mit der Sodalösung abgespalten werden. Bekanntlich ist Pentacetyl-glucosamin Morgan-Elson-positiv. Im übrigen stellen die Stuart-Modell-Betrachtungen keinen Beweis für das Vorliegen eines Oxazolin-Ringes dar.

Für ihre Hilfe bei der Herstellung der Präparate danken wir Frl. A. Seeliger.

Beschreibung der Versuche

1. Papierchromatographie: Wir verwendeten die gleiche Methodik wie in unserer früheren Arbeit³).

2. 3.4.6-Trimethyl-*N*-acetyl-glucosamin: 1.47 g 3.4.6-Trimethyl-*N*-acetyl- β -methylglucosaminid vom Schmp. $195\text{--}196^\circ$, welches wir nach der Vorschrift von T. White hergestellt hatten, wurden in 60 ccm 10-proz. Schwefelsäure 2 Stdn. auf dem Dampfbad erhitzt. Nach dem Erkalten wurde mit Wasser verdünnt und mit Ionenaustauscher IR-4B auf p_{H} 7.8 gebracht. Nun versetzten wir die wäßr. Lösung mit 3 ccm $2n \text{HCl}$ und dampften sie i. Vak. zur Trockne ein. Der Rückstand wurde in 10 ccm siedendem absol. Äthanol aufgenommen, die heiße Lösung filtriert und nach dem Erkalten mit 20 ccm trockenem Äther versetzt. Im Eisschrank kristallisierte das 3.4.6-Trimethylglucosamin-hydrochlorid (720 mg; weitere 210 mg erhielten wir nach Aufarbeiten der Mutterlaugen), welches wir aus Methanol-Äther umkristallisierten. Durch eine Lösung von 550 mg des Hydrochlorids und von 0.3 ccm Triäthylamin (1 Mol) in 25 ccm Methanol leiteten wir 15 Min. einen Keten-Strom. Der krist. Abdampfdruckstand lieferte aus Äthanol 234 mg feine Nadeln vom Schmp. 224° ; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: 79.0° ($t = 0$), 76.6° (4 Min.) $\rightarrow 48.5^\circ$ (konst., 5 Stdn.), $c = 0.98$ in Wasser.

$\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{O}_6\text{N}$ (263.3) Ber. C 50.18 H 8.04 OCH₃ 35.36 Gef. C 50.37 H 7.90 OCH₃ 35.23

¹¹) Der R_{Glucose} -Wert eines Methyl-AAG sollte größer sein; überdies haben wir die Entmethylierung durch Mikro-Zeisel-Bestimmung festgestellt.

¹²) W. M. Corbett, J. Kenner u. G. N. Richards, Chem. and Ind. 1953, 154; J. Kenner u. G. N. Richards, J. chem. Soc. [London] 1954, 278.

3. 3-Methyl-*N*-acetyl-glucosamin: 300 mg 3-Methyl-glucosamin-hydrochlorid¹³⁾ wurden unter Zusatz von 0.2 ccm Triäthylamin in 20 ccm Methanol mit Keten acetyliert (10 Min.). Der kristalline Abdampfrückstand wurde in 2–3 ccm absol. Methanol gelöst und tropfenweise mit soviel trockenem Aceton versetzt, bis Kristallisation einsetzte (7–10 ccm), die durch Stehenlassen bei 4° vervollständigt wurde. Nach Absaugen und Waschen mit Aceton, das wenig Methanol enthielt, wurden 82 mg 3-Methyl-*N*-acetyl-glucosamin vom Schmp. 183–185° erhalten. Es war papierchromatographisch einheitlich; $R_{\text{Glucose}} = 1.60$.

4. Alkalische Entmethylierung des 3-Methyl-*N*-acetyl-glucosamins. a) Nachweis durch Methoxybestimmung: 5.275 mg 3-Methyl-*N*-acetyl-glucosamin wurden im Zeisel-Kölbchen in 5 ccm 0.025*n* Na₂CO₃ 5 Min. in siedendem Wasserbad erhitzt. Die erhaltene Lösung wurde mit verd. Salzsäure vorsichtig neutralisiert und danach gefriergetrocknet. Die im Exsiccator über Diphosphorpentoxyd und Kaliumhydroxyd nochmals 24 Stdn. getrocknete Substanz wurde der Methoxybestimmung unterworfen. Gef. 0.19% OCH₃.

b) Nachweis durch Papierchromatographie: Hierzu wurde 3-Methyl-*N*-acetyl-glucosamin in der gleichen Weise alkalisch behandelt, wie wir dies für die AAG-Bildung aus *N*-Acetyl-glucosamin in unserer früheren Arbeit³⁾ beschrieben haben. Auf den Chromatogrammen sah man reichlich AAG ($R_{\text{Glucose}} = 1.70$) sowie eine Spur *N*-Acetyl-glucosamin ($R_{\text{Glucose}} = 1.24$), dagegen weder restliches 3-Methyl-*N*-acetyl-glucosamin ($R_{\text{Glucose}} = 1.60$) noch eine schneller als AAG wandernde Substanz, die man als Methyl-AAG hätte ansprechen können.

183. Richard Kuhn und Heinz Tiedemann: Enzymatische Spaltung von *N*-Acetyl-β-*D*-glucosaminiden

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

(Eingegangen am 6. Juni 1954)

In der Hypodermis des Hummers findet sich ein Ferment, das β-Glucoside des *N*-Acetyl-*D*-glucosamins unter Bildung von *N*-Acetyl-*D*-glucosamin spaltet. *N*-Acetyl-β-*D*-glucosaminidase aus *Aspergillus oryzae* wurde frei von Lactase erhalten. Sie hydrolysiert Methyl-, Äthyl-, *n*-Propyl-, Benzyl- und Phenyl-*N*-acetyl-β-*D*-glucosaminid sowie *N,N'*-Diacetyl-chitobiose und Lacto-*N*-biose II, nicht aber Lacto-*N*-tetraose und Lacto-*N*-biose I. Das p_{H} -Optimum liegt bei p_{H} 4, die Michaelis-Menten-Konstante für Äthyl-*N*-acetyl-β-*D*-glucosaminid als Substrat beträgt ~ 0.005 Mol/Liter. Aus *N*-Acetyl-glucosamin + Äthanol erhält man durch enzymatische Synthese β-Äthyl-*N*-acetyl-glucosaminid frei von der α-Verbindung.

Für die Konstitutionsaufklärung der aus Frauenmilch isolierten Oligosaccharide ist zunächst die partielle Hydrolyse mit verd. Mineralsäure¹⁾ herangezogen worden. Es war zu erwarten, daß mit Hilfe von Enzymen manche Spaltstücke in besserer Ausbeute zu gewinnen sein würden und daß ein genauerer Einblick in die Verknüpfungsweise mancher Bausteine (*N*-Acetyl-*D*-glucosamin, *D*-Glucose, *D*-Galaktose, *L*-Fucose) auf diese Weise möglich werden könnte.

¹³⁾ A. Neuberger, J. chem. Soc. [London] 1941, 50.

¹⁾ R. Kuhn, A. Gauhe u. H. H. Baer, Chem. Ber. 87, 289 [1954].