

5. Osazon-Bildung von Lactose, 1-Amino-lactose und 1-Acetamino-lactose

	Lactose	1-Amino-lactose	1-Acetamino-lactose
Substanzmenge	301 mg	297 mg	300 mg
Phenylhydrazin-HCl	370 mg	350 mg	350 mg
Natriumacetat	1 g	1 g	1 g
Wasser	5 ccm	5 ccm	5 ccm
Dauer des Erhitzens	3 Stdn.	3 Stdn.	3 Stdn.
Rohprodukt	176 mg	172.5 mg	—
Ausbeute	33%	34%	—
Umkristallisiert aus	30 ccm H ₂ O	30 ccm H ₂ O	—
Schmelzp.	203–205° (Zers.)	202–204° (Zers.)	—
Misch-Schmp.	203–205° (Zers.)		

244. **Richard Kuhn und Werner Kirschenlohr: Synthese der 2-Acetamino-lactose**

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

(Eingegangen am 2. August 1954)

Durch katalytische Hydrierung von Lactosazon erhält man nebeneinander Lactosamin (2-Desoxy-2-amino-lactose) und Isolactosamin (1-Desoxy-1-amino-lactulose). Nach Peracetylierung und anschließender Ammonolyse wurden *N*-Acetyl-lactosamin (2-Acetamino-lactose) und *N*-Acetyl-isolactosamin (1-Acetamino-lactulose) chromatographisch getrennt. Die so synthetisch gewonnene 2-Acetamino-lactose ist in allen Eigenschaften identisch mit dem durch partielle Hydrolyse von Blutgruppen-Substanzen erhaltenen Disaccharid.

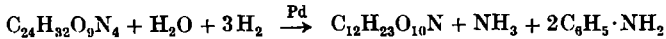
Im Jahre 1886 hat E. Fischer¹⁾ Glucosazon in alkohol.-wässriger Lösung mit Zinkstaub + Eisessig reduziert und dabei das linksdrehende Isoglucosamin (1-Desoxy-1-amino-fructose) erhalten, dessen Acetat und Oxalat schön kristallisierten. „Ich habe mich,“ so schrieb E. Fischer, „bereits überzeugt, daß das Phenyllactosazon bei der Behandlung mit Zinkstaub und Essigsäure neben Anilin und Ammoniak eine Verbindung liefert, welche ganz ähnliche Reaktionen wie die Glucosamine zeigt, und man darf also hoffen, auf diesem Wege eine größere Zahl von Ammoniakderivaten der Zuckerarten zu gewinnen. Für die Physiologen wird die Kenntnis solcher Verbindungen nicht ohne Interesse sein...“.

Seit 68 Jahren scheint die reduktive Spaltung des Phenyllactosazons nicht mehr studiert worden zu sein. Wir haben sie erneut in Angriff genommen und sind dabei – der Vermutung E. Fischers entsprechend – zu einer physiologisch hoch wirksamen Substanz gelangt.

Die Darstellung von Isoglucosamin konnten K. Maurer und B. Schiedt²⁾ dadurch wesentlich verbessern, daß sie *d*-Glucosazon mit Palladium katalytisch hydrierten. Die Ausbeute an krist. Acetat erreichte 60 % d.Theorie.

¹⁾ Ber. dtsh. chem. Ges. 19, 1920 [1886]. ²⁾ Ber. dtsh. chem. Ges. 68, 2187 [1935].

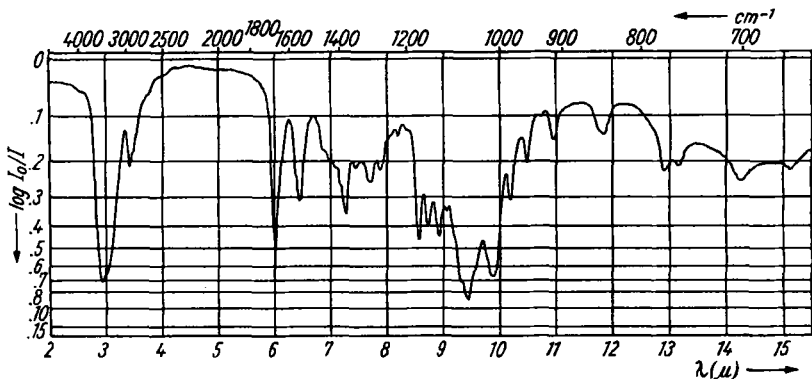
Es war jedoch notwendig mit Überdruck (3 atü. H_2) zu arbeiten. Wir selbst haben für die katalytische Hydrierung von *d*-Lactosazon(I) 10-proz. Palladium-Kohle verwandt und sind bei 45° in Alkohol-Essigsäure als Lösungsmittel ohne Überdruck ausgekommen. Die Wasserstoff-Aufnahme kommt nach 3 Moll., was der ber. Menge entspricht, nahezu zum Stillstand:



Das gebildete Aminodisaccharid $C_{12}H_{23}O_{10}N$ stellt ein Gemisch von wenig Lactosamin(II) mit viel Iso-lactosamin(III) dar³⁾. Zur Trennung wurde das Gemisch der Hydrochloride (Ausb. 50% d.Th.) mit Pyridin-Acetanhydrid-Triäthylamin peracetyliert, worauf die an Sauerstoff gebundenen Acetylyde durch methanol. Ammoniaklösung wieder abgespalten wurden. Das so gewonnene Gemisch von *N*-Acetyl-lactosamin und *N*-Acetyl-isolactosamin ließ sich an Kohle-Celite-Säulen trennen: mit 2-proz. Alkohol wandert die gesuchte Substanz rascher ins Filtrat als die Iso-Verbindung.

Das synthet. gewonnene *N*-Acetyl-lactosamin(V) kristallisiert aus Methanol, von dem in der Siedehitze 50 Tle. benötigt werden, in den charakteristischen⁴⁾ quadratischen Täfelchen, die 1 Mol. Kristallmethanol enthalten und zwischen gekreuzten Nicols keine Auslöschung zeigen. Anscheinend gehören diese Kristalle mit 1 Mol. Methanol dem kubischen Kristallsystem an. Beim Umkristallisieren aus Wasser wird das Methanol, das selbst i. Vak. bei 100° nicht entweicht, leicht abgegeben und das *N*-Acetyl-lactosamin in doppelbrechenden Nadeln erhalten, wie es auch beim Disaccharid aus dem Mucin des Schweinemagens⁴⁾ der Fall ist.

Im Schmp. ($168-170^\circ$, ohne Braunfärbung), im Misch-Schmp. ($167-170^\circ$), im UR-Spektrum (s. Abbild.) und in den Debye-Scherrer-Aufnahmen stimmt

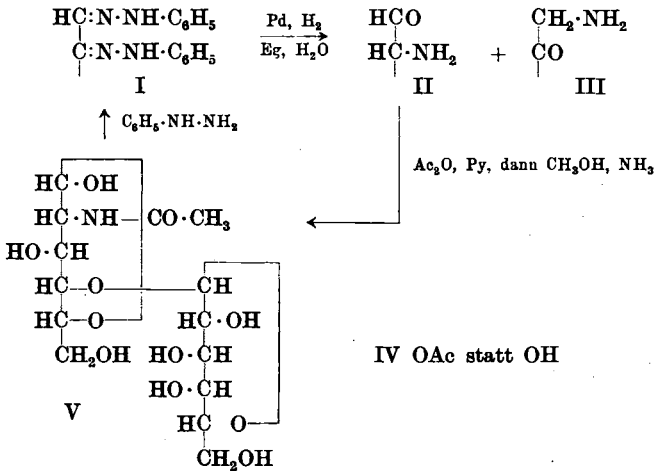


UR-Spektrum von *N*-Acetyl-lactosamin

³⁾ Nach Versuchen von Hrn. H. J. Haas wird auch bei der katalyt. Hydrierung von Glucosazon nicht nur Isoglucosamin, sondern auch Glucosamin gebildet. Schmp. und Misch-Schmp. der *N*-Carbobenzoxy-Verbindung 202° .

⁴⁾ R. M. Tomarelli, J. B. Hassinen, E. R. Eckhardt, R. H. Clark u. F. W. Bernhart, Arch. Biochem. Biophysics 48, 225 [1954].

das synthet. *N*-Acetyl-lactosamin + CH₃OH mit dem aus den Blutgruppen-Substanzen des Mekoniums isolierten Galaktosido-*N*-acetyl-glucosamin⁵⁾ überein. Der R_{Glucose} -Wert (0.70 in Essigester-Pyridin-Wasser) und das Drehungsvermögen ($[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: +51.5° → +28.5°) sind ebenfalls identisch.



Den Konstitutionsbeweis für das von uns aus den Blutgruppen-Substanzen des Mekoniums isolierte Galaktosido-*N*-acetyl-glucosamin hatten wir durch Überführung in Lactosazon erbracht (V → I)⁵⁾. Die vorliegenden Versuche zeigen, daß man vom Lactosazon(I) zu diesem Disaccharid(V) zurückgelangen kann. Da die Lactose bereits von C. S. Hudson⁶⁾ synthetisiert wurde, liegt eine vollständige chemische Synthese vor.

Synonym sind nunmehr die folgenden Bezeichnungen: Disaccharid von Yosizawa⁷⁾, Tomarelli-Biose⁴⁾, D_{II}⁸⁾, 2-Acetamino-lactose (2-Desoxy-2-acetamino-lactose), *N*-Acetyl-lactosamin, 4-β-*d*-Galaktosido-*N*-acetyl-*d*-glucosamin (4-*O*-[β-*d*-Galaktosido]-2-desoxy-2-acetamino-glucopyranose). — Der Name Acetyllactosamin (*N*-Acetyl-lactosamin) scheint uns die Analogie zum Acetylglucosamin (*N*-Acetyl-glucosamin) am einfachsten auszudrücken⁹⁾.

⁵⁾ R. Kuhn u. W. Kirschenlohr, Chem. Ber. 87, 560 [1954].

⁶⁾ W. T. Haskins, R. M. Hann u. C. S. Hudson, J. Amer. chem. Soc. 64, 1852 [1942].

⁷⁾ Z. Yosizawa, Tohoku J. exp. Med. 52, 145 [1950].

⁸⁾ F. Zilliken, Ph. N. Smith, C. S. Rose u. P. György, J. biol. Chemistry 208, 299 [1954].

⁹⁾ Hinsichtlich der Identität der auf verschiedenen Wegen gewonnenen Präparate bestehen allerdings, vor allem in bezug auf das Drehungsvermögen, noch 2 Unstimmigkeiten, die der Klärung bedürfen: Z. Yosizawa⁷⁾ fand $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: +57.8° u. F. Zilliken⁸⁾ $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: +40.0°. Nur der von R. M. Tomarelli⁴⁾ gefundene Wert $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: +26.7° stimmt mit unserem Wert⁵⁾ $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: +28.5° (aus Mekonium und synthetisch) hinlänglich überein. Von Z. Yosizawa abgesehen, dessen Präparat anscheinend nicht kristallisiert war, beziehen sich alle diese Angaben auf das mit 1 Mol. CH₃OH kristallisierte Disaccharid in wäbr. Lösung nach Ablauf der Mutarotation (Endwerte). Zusatz b. d. Korr. (14. 10. 54): Neuerdings findet F. Zilliken $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: +27.2° (private Mitteilung).

Sehr zu beachten beim Vergleich von Präparaten verschiedener Herkunft ist, daß 3- β -Galaktosido-*N*-acetyl-glucosamin (Lacto-*N*-biose I aus Frauenmilch) und 4- β -Galaktosido-*N*-acetyl-glucosamin (*N*-Acetyl-lactosamin) papierchromatographisch fast gleiche R_F -Werte zeigen. Diese beiden isomeren Disaccharide treten nämlich vielfach gleichzeitig nebeneinander auf: aus den Blutgruppen-Substanzen des Mekoniums haben wir neben viel 4- β -Biose in geringer Menge auch die 3- β -Biose schön kristallisiert erhalten; aus Frauenmilch (Kohle-Eluaten) ist durch partielle Säurehydrolyse umgekehrt neben viel 3- β -Biose in geringer Menge auch schön kristallisierte reine 4- β -Biose (*N*-Acetyl-lactosamin) von A. Gauhe und H. H. Baer erhalten worden. Beim Ansprühen des Papiers mit Anilin-hydrogenphthalat gibt die 4- β -Biose ein gelbstichigeres Braun als die 3- β -Biose, doch lassen sich aus der Nuance, wenn beide im selben Fleck vorliegen, keine sicheren Schlüsse ziehen. Das sicherste Mittel zur Unterscheidung ist die von R. Kuhn, A. Gauhe und H. H. Baer¹⁰⁾ angegebene AAG-Reaktion, die von der 3- β -Biose, nicht aber von der 4- β -Biose gegeben wird¹¹⁾.

Gegen den von uns erbrachten Konstitutionsbeweis⁵⁾ bestanden eine Reihe von anscheinend schwerwiegenden Bedenken. Diese sollen erst jetzt, nachdem die Konstitution des *N*-Acetyl-lactosamins synthetisch gesichert ist, im einzelnen erörtert werden. Die Klärung der folgenden Punkte erscheint uns im Hinblick auf die Konstitutionsaufklärung weiterer Oligo- und Polysaccharide, die *N*-Acetyl-hexosamin-Reste enthalten, wesentlich.

1. *N*-Acetyl-lactosamin gibt keine Farbreaktion mit *p*-Dimethylamino-benzaldehyd nach Morgan-Elson. Da diese Reaktion vom freien *N*-Acetyl-glucosamin gegeben wird, wurde von R. M. Tomarelli und Mitarbb.⁴⁾ vermutet, daß das von ihnen aus dem Mucin des Schweinemagens isolierte Disaccharid keinen reduzierenden *N*-Acetyl-glucosamin-Rest enthalten könne und eine *N*-Acetyl-glucosaminido-galaktose sein müsse. Trotz reduzierendem *N*-Acetyl-glucosamin-Rest gibt aber das *N*-Acetyl-lactosamin die Farbreaktion nach Morgan-Elson nicht, weil der Galaktose-Rest in 4-Stellung haftet. Wie gezeigt werden konnte¹¹⁾, geben auch andere in 4-Stellung substituierte *N*-Acetyl-glucosamine mit *p*-Dimethylamino-benzaldehyd keinen Farbstoff.

2. *N*-Acetyl-lactosamin wird weder von Emulsin noch von Lactase aus *E. coli*-Stämmen gespalten. Danach schien es unwahrscheinlich, daß die Galaktose in 4-Stellung β -glykosidisch verknüpft sei. Es hat sich jedoch herausgestellt, daß auch in anderen Fällen bei reduzierenden Disacchariden, wenn man die 2-ständige OH-Gruppe durch $\text{-NH}\cdot\text{CO}\cdot\text{CH}_3$ ersetzt, die enzymatische Spaltbarkeit völlig aufgehoben werden kann. So werden 3- β -Galaktosido-glucose und 3- β -Galaktosido-fructose von Emulsin leicht gespalten¹²⁾, während 3- β -Galaktosido-*N*-acetyl-glucosamin (Lacto-*N*-biose I) unangegriffen bleibt. Besondere Fermente greifen allerdings auch die 2-Desoxy-2-

¹⁰⁾ Chem. Ber. 87, 289 [1954].

¹¹⁾ R. Kuhn, A. Gauhe u. H. H. Baer, Chem. Ber. 87, 1138 [1954].

¹²⁾ R. Kuhn u. H. H. Baer, Chem. Ber. 87, 1560 [1954].

acetamino-Derivate reduzierender Disaccharide an, z. B. wird das von uns als *N*-Acetyl-lactosamin erkannte Disaccharid durch ein von P. György in Auszügen von *Lactobacillus bifidus* var. Penn. nachgewiesenes Enzym leicht in *N*-Acetyl-glucosamin + Galaktose gespalten⁸⁾. Mit solchen Ferment-Lösungen ließ sich auch eine enzymatische Synthese des *N*-haltigen Disaccharids durchführen⁸⁾. Hier erhebt sich die Frage, ob es gelingen wird, dieses Ferment frei von Lactase-Wirkung zu erhalten, oder ob es selbst in reinem Zustande befähigt sein wird, auch Lactose zu hydrolysieren.

3. *N*-Acetyl-lactosamin gehört zu den wirksamsten Wuchsstoffen für *Lactobacillus bifidus* var. Penn.¹³⁾. Da *N*-Acetyl-glucosamin nur sehr wenig¹⁴⁾, reines α -Methyl-*N*-acetyl-glucosaminid überhaupt nicht¹⁵⁾ und β -Methyl-*N*-acetyl-glucosaminid gut¹⁵⁾ wirkt, wäre es verständlich gewesen, wenn das hochwirksame Disaccharid eine β -*N*-Acetyl-glucosaminido-galaktose gewesen wäre. Nachdem dies mit Sicherheit nicht der Fall ist, muß man schließen, daß der Test (Wuchsstoffwirkung für *L. bifidus* var. Penn. in vitro)¹⁴⁾ nicht sehr konstitutionsspezifisch ist, d. h. daß er nicht nur auf β -glucosidische Derivate des *N*-Acetyl-glucosamins sondern auch auf manche Verbindungen mit reduzierendem *N*-Acetyl-glucosamin-Rest sehr gut anspricht.

Beschreibung der Versuche

Hydrierung von Lactosazon: 10.4 g *d*-Lactose-phenylosazon wurden in 100 ccm 95-proz. Äthanol + 50 ccm Eisessig suspendiert und mit 5 g Palladiumkohle¹⁶⁾ bei 45° hydriert. Die Wasserstoff-Aufnahme (80–90 ccm/Stde.) sank nach Aufnahme von 3 Mol. stark ab. Die schnell abfiltrierte und i. Vak. (50–60° Badtemp.) verdampfte Lösung hinterließ einen braunen Sirup. Diesen haben wir in 200–300 ccm Wasser aufgenommen, von gelben Flocken durch Filtration befreit und mehrmals mit je 50 ccm Chloroform ausgeschüttelt, das die Hauptmenge des gebildeten Anilins aufnahm.

Gewinnung des Zuckeramins Gemisches mit Amberlite: Die wäßr. Lösung ließen wir durch eine Säule (25 × 2.5 cm) laufen, die mit dem Kationenaustauscher Amberlite IR 120 (H) beschickt war (30–40 Tropfen/Min.). Beim Waschen mit Wasser gingen 800 mg Substanz ($[\alpha]_D$: etwa -20°) ins Filtrat, die frei von Aminozuckern war. Zu allen papierchromatographischen Versuchen diente Essigester: Pyridin: Wasser = 50:35:15¹⁷⁾ und Papier Schleicher & Schüll 2043b.

Eluiert haben wir die Zuckerramine mit 1.5 l 0.5 *n* HCl. Je 100 ccm Eluat wurden polarisiert und nach Entfernung der freien Salzsäure mit Amberlite IR 45 papierchromatographisch geprüft. Wir fanden 3 ninhydrin-positive Komponenten, deren $R_{Glucosamin}$ -Werte 0.22 (sehr schwach), 0.38 und 0.53 betragen.

Der sirupöse Eindampfrückstand der ersten 5 Eluate (500 ccm) wurde in 10 ccm Methanol gelöst, filtriert und mit viel Äther versetzt. Die abzentrifugierte, mit Äther ge-

¹³⁾ R. M. Tomarelli, J. B. Hassinen, E. R. Eckhardt, R. H. Clark u. F. W. Bernhart (Arch. Biochem. Biophysics 48, 225 [1954]) fanden 12 Einheiten/mg, was F. Zilliken, Ph. N. Smith, C. S. Rose u. P. György (J. biol. Chemistry 208, 299 [1954]) bestätigt haben. 1 Einheit = 80 γ .

¹⁴⁾ P. György, Pediatrics 11, 98 [1953]; R. Kuhn, Angew. Chem. 64, 493 [1952]; P. György, R. F. Norris u. C. S. Rose, Arch. Biochem. Biophysics 48, 193 [1954].

¹⁵⁾ C. S. Rose, R. Kuhn, F. Zilliken u. P. György, Arch. Biochem. Biophysics 49, 123 [1954].

¹⁶⁾ P. E. Verkade, W. D. Cohen u. A. K. Vroege, Recueil Trav. chim. Pays-Bas 59, 1134 [1940].

¹⁷⁾ G. Malyoth u. H. Stein, Biochem. Z. 322, 165 [1951].

waschene Fällung stellte ein fast weißes Pulver (2.9 g) dar, dessen Zusammensetzung auf Lactosamin- bzw. Isolactosamin-hydrochlorid stimmte. $[\alpha]_D^{20}$: -30° ($c = 1$, Wasser). Aschegehalt = 1.5%.

$C_{12}H_{23}O_{10}N$, HCl (377.8) Ber. C 38.15 H 6.40 N 3.70 Cl 9.38
Gef. C 38.13 H 6.75 N 3.58 Cl 8.75

Aus den folgenden Salzsäure-Eluaten, deren Eindampfdruckstände durch Digerieren mit absol. Methanol von Ammoniumchlorid befreit wurden, ließen sich weitere 0.9 g Hydrochlorid des Aminozucker-Gemisches gewinnen. Insgesamt wurden 3.8 g (50% d. Th.) erhalten.

Acetylierung: 5 g des amorphen Gemisches der Aminozucker-hydrochloride wurden mit 60 cc Acetanhydrid + 50 cc Pyridin + 2.1 cc Triäthylamin behandelt (24 Stdn. bei etwa 20° , dann 10 Min. im Dampfbad). Beim Kühlen auf 0° kristallisierte Triäthylammoniumchlorid aus. Das Filtrat haben wir in 500 cc Eis-Wasser eingerührt und die peracetylierten Verbindungen mit Chloroform ausgeschüttelt. Die mit 3×30 cc m/l HCl und mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschene, über Natriumsulfat getrocknete Chloroform-Lösung hinterließ einen hellbräunlichen Sirup, der i. Vak. über konz. Schwefelsäure fest wurde (4.9 g).

Ammonolyse: 4.9 g des peracetylierten Gemisches wurden in 100 cc absol. Methanol gelöst und mit 120 cc Methanol, das bei 0° mit Ammoniakgas gesättigt war, versetzt. Nach 7 Stdn. ($\sim 20^\circ$) haben wir i. Vak. verdampft, in 10 cc Methanol gelöst, mit wenig Carboraffin entfärbt und mit Äther gefällt (2.3 g); $[\alpha]_D^{20}$: -15° ($c = 0.3$).

Chromatographische Trennung der *N*-Acetyl-Verbindungen: 2.3 g durch Ammonolyse gewonnenes Rohprodukt wurden in 10 cc Wasser gelöst und auf eine Kohle-Celite-Säule (25×2.5 cm) gegeben. Mit 500 cc Wasser ließ sich eine Substanz ins Filtrat bringen, die sich papierchromatographisch wie Galaktose verhielt. Mit 2-proz. Äthanol erschien zunächst (in 3 Fraktionen zu je 60–70 cc) das rechts drehende *N*-Acetyl-lactosamin, auf das – in wesentlich größerer Menge – das links drehende *N*-Acetyl-isolactosamin folgte¹⁸).

N-Acetyl-lactosamin: Die 3 Fraktionen, die das Disaccharid vom $R_{Glucose} = 0.70$ enthielten, wurden verdampft und der Rückstand mit je 1 cc Methanol verrieben. Dabei erfolgte Kristallisation (75 mg). Nach dem Umkristallisieren aus 15 cc kochendem Methanol lagen 55 mg quadratische Blättchen vom Schmp. $168-170^\circ$ vor.

$C_{14}H_{25}O_{11}N \cdot CH_3OH$ (415.4) Ber. C 43.37 H 7.03 N 3.37 Gef. C 43.52 H 7.01 N 3.34
 $[\alpha]_D^{20}$: $+51.5^\circ$ ($t = 0$) $\rightarrow +28.5^\circ$ ($c = 0.98$, Wasser, Endwert). Die Halbwertszeit der Mutarotation betrug 32 Minuten.

¹⁸) Zur papierchromatographischen Trennung von *N*-Acetyl-lactosamin und *N*-Acetyl-isolactosamin verwende man lange Laufzeiten (30–40 Stdn.), da die R_F -Werte nicht sehr verschieden sind. Die Isoverbindung wandert in Essigester:Pyridin:Wasser etwas langsamer ($R_{Glucose} = 0.65$) als Acetyl-lactosamin ($R_{Glucose} = 0.70$). Zur Anfärbung benutzen wir die Chlor-Benzidin-Methode. Damit färben sich auf dem Papier beide Verbindungen blau an. Der blaue Fleck des *N*-Acetyl-isolactosamins bleibt tagelang blau, während die Färbung des *N*-Acetyl-lactosamins schon nach mehreren Stunden in Braun übergeht. Mit Anilin-hydrogenphthalat färbt sich die Isoverbindung nicht an. Naphthoresorcin-Trichloressigsäure (D. G. Walker u. F. L. Warren, Biochem. J. **49**, XXI [1951]) färbt *N*-Acetyl-lactosamin auf dem Papier blau, während das Isomere die rote Farbe der Ketosen zeigt (beides sehr schwach im Verhältnis zu Glucose und Fructose).