

Alkalisplaltung: Je 5 mg der in der Tafel 2 aufgeführten Disaccharide wurden in je 0.9 ccm Wasser gelöst und unter Zusatz von 0.1 ccm 0.5*n* Na₂CO₃ 5 Min. im siedenden Wasserbad bzw. 30 Min. bei 22° hydrolysiert. Die Hydrolysate wurden mit Austauschern Amberlite IR-4B und IR-120 von Ionen befreit und gefrier-getrocknet. Die Rückstände untersuchten wir papierchromatographisch auf die Spaltprodukte, wobei wir die schon früher von uns benutzte¹⁾ Methodik²⁾ anwandten. Besprüht wurde mit Anilinhydrogenphthalat, zur Unterscheidung der Ketosen und Aldosen mit Naphthoresorcin-Trichloressigsäure²²⁾.

246. Richard Kuhn und Hans Helmut Baer: Synthese der 3- β -*D*-Galaktosido-*D*-glucose und der 3- β -*D*-Galaktosido-*D*-fructose

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

(Eingegangen am 2. August 1954)

1,2,5,6-Diisopropyliden-*D*-glucofuranose bzw. 1,2,4,5-Diisopropyliden-*D*-fructopyranose geben mit Acetobromgalaktose nach Koenigs-Knorr in 3-Stellung verknüpfte Disaccharid-Derivate. Nach Abspaltung der Acetonreste und Acetylgruppen konnte chromatographisch krist. 3- β -*D*-Galaktosido-*D*-glucose sowie krist. 3- β -*D*-Galaktosido-*D*-fructose erhalten werden. Die beiden Disaccharide liefern dasselbe Phenylsazon.

Ein aus Frauenmilch sowie aus den Blutgruppensubstanzen des Mekoniums isoliertes Disaccharid, das aus *N*-Acetyl-*D*-glucosamin und *D*-Galaktose aufgebaut ist, hatte unter Abspaltung der Acetaminogruppe ein schön kristallisierendes Osazon ergeben, das von Lactosazon und von Allolactosazon verschieden war. Um zu prüfen, ob es sich um 3- β -*D*-Galaktosido-*D*-glucosazon handelt, haben wir die noch unbekanntenen 3- β -*D*-Galaktoside der *D*-Glucose und *D*-Fructose aufgebaut.

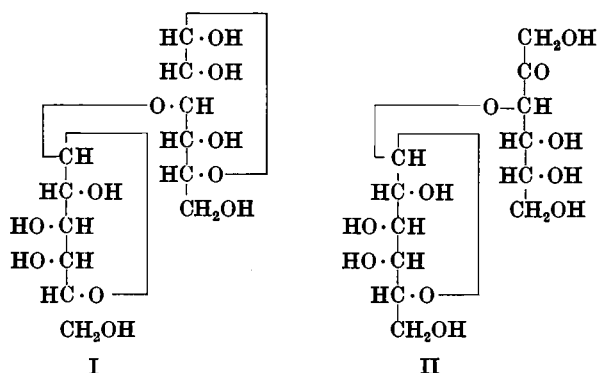
Als Vorbild diente die Synthese der 3- β -*D*-Glucosido-*D*-glucose (Laminariose) von P. Bächli und E. G. V. Percival¹⁾.

Die 3- β -Galaktosido-*D*-glucose (I) wurde in einer Ausbeute von 6% d.Th. (über alle Stufen) erhalten. Sie kristallisiert leicht aus feuchtem Methanol in farblosen Nadeln, die das Monohydrat der α -Form darstellen und bei 202–204° schmelzen (Braunfärbung). Bei 110° i. Vak. über Diphosphorpentoxyd erhält man das wasserfreie Disaccharid, das an feuchter Luft nur 1/2 Mol. Wasser wieder aufnimmt. Zum gleichen Semihydrat gelangt man auch, wenn man das lufttrockene Disaccharid (Monohydrat) bei etwa 20° über Diphosphorpentoxyd i. Vak. trocknet. Das wasserfreie Präparat, das Semihydrat und das Monohydrat unterscheiden sich in ihren Debye-Scherrer-Diagrammen, dagegen nicht im Schmelzpunkt. Die Drehung beträgt $[\alpha]_D^{25} : +76.7^\circ \rightarrow +41.2^\circ$ (wasserfreie Substanz in Wasser). Das Disaccharid schmeckt weniger süß als der isomere Milchzucker. Von Emulsin wird es

²²⁾ D. G. Walker u. F. L. Warren, Biochem. J. 49, XXX [1951].

¹⁾ J. chem. Soc. [London] 1952, 1243.

etwa ebenso schnell, von Lactase aus *E. coli* langsamer als Lactose in Glucose + Galaktose gespalten. Auch die Hydrolyse mit verd. Säure führt zu Glucose und Galaktose.



Mit besserer Ausbeute, nämlich 19% d.Th. (über alle Stufen) verlief die Synthese der 3-β-Galaktosido-fructose (II). Diese kristallisiert in derben Prismen ohne Kristallwasser; Schmp. 197–199°. Es handelt sich um die rasch abwärts mutarotierende α-Form; $[\alpha]_D^{25}$: -14.6° (4 Min.) $\rightarrow -27.1^\circ$ (Wasser). Die 3-β-Galaktosido-fructose schmeckt nur schwach süß und ist durch Coli-Lactase sowie durch Emulsin in Fructose + Galaktose spaltbar. Mit Hypojodit (Jod + Natriumcarbonatlösung) wurde ein Reduktionsvermögen gefunden, das 5–7% desjenigen der Lactose entspricht. Dieser Befund sagt nichts gegen die Reinheit der chromatographisch einheitlichen Verbindung. Er erklärt sich dadurch, daß die 3-β-Galaktosido-fructose ähnlich wie die 3-α-Glucosido-fructose (Turanose) von verd. Alkalilauge schon in der Kälte hydrolytisch gespalten wird: läßt man die Natriumcarbonatlösung ohne Jod einwirken, so findet man nach der üblichen Einwirkungszeit papierchromatographisch, daß schätzungsweise 5% in Galaktose + Fructose gespalten sind. Heiße 0.05*N* Na₂CO₃ spaltet in wenigen Minuten beide Disaccharide (I und II) vollständig²⁾.

Vergleich des spezif. Drehungsvermögens in Wasser (Gleichgewichtswerte)

3-β-Galaktosido-glucose	+41.2 ⁰	} Δ = 20.4 ⁰
3-β-Glucosido-glucose (Laminaribiose)	+20.8 ⁰	
4-β-Galaktosido-glucose (Lactose)	+54.9 ⁰	} Δ = 19.7 ⁰
4-β-Glucosido-glucose (Cellobiose)	+35.2 ⁰	
6-β-Galaktosido-glucose (Allolactose)	+30.7 ⁰	} Δ = 20.9 ⁰
6-β-Glucosido-glucose (Gentiobiose)	+9.6 ⁰	

Auffallend gut ist die Ausbeute an Osazon (80% d.Th.), die man sowohl aus 3-β-Galaktosido-glucose wie -fructose erhält. Die aus beiden Disacchariden gewonnenen Osazone, feine gelbe Nadeln vom Schmp. 184–185°, haben

²⁾ Vergl. Tafel 2 in der vorstehenden Mitteil., Chem. Ber. 87, 1553 [1954].

sich als identisch erwiesen. Über die Identität mit dem Osazon der aus Frauenmilch gewonnenen Lacto-N-biose I wurde bereits in der vorstehenden Arbeit berichtet.

Frl. A. Seeliger haben wir für ihre technische Hilfe bei der Herstellung der Präparate, Frl. D. Tschampel für die Hypojodititrationen und Hrn. E. Röhm für die Aufnahme der Röntgenogramme sehr zu danken.

Beschreibung der Versuche

Die Darstellung der Ausgangsprodukte 1,2,5,6-Diisopropyliden-glucose (Diaceton-glucose)³⁾, 1,2,4,5-Diisopropyliden-fructose (α -Diaceton-fructose)⁴⁾ und Acetobromgalaktose⁵⁾ erfolgte nach bekannten Vorschriften. Wasserfreies Calciumsulfat wurde durch 2stdg. Entwässern von gefälltem Gips bei 240⁰⁶⁾ gewonnen. Das Silbercarbonat wurde vor jedem Versuch frisch dargestellt durch Fällen einer Silbernitrat-Lösung mit einem kleinen Unterschuß an Natriumhydrogencarbonat-Lösung. Der Niederschlag wurde erst durch mehrfaches Dekantieren, dann auf der Nutsche solange mit dest. Wasser gewaschen, bis das Waschwasser keine Ag⁺-Ionen mehr enthielt. Zuletzt wurde kurz mit trockenem Aceton gewaschen und 2 Stdn. im Vakuum-Exsiccator über Schwefelsäure/Kaliumhydroxyd getrocknet.

3- β -Galaktosido-fructose

a) Kondensation: 10 g α -Diaceton-fructose, 15 g Silbercarbonat und 30 g wasserfreies Calciumsulfat wurden in einer braunen Flasche in 80 ccm trockenem Benzol gelöst bzw. aufgeschlämmt und unter Feuchtigkeitsausschluß 1 Stde. mechanisch gerührt. Danach fügten wir 3 g Jod hinzu und ließen unter fortwährendem Rühren eine Lösung von 15,7 g Acetobromgalaktose in 80 ccm trockenem Benzol im Laufe 1 Stde. zutropfen. Hierauf ersetzten wir den Rührer durch ein Calciumchlorid-Rohr und schüttelten den Ansatz bis zur Beendigung der Reaktion auf der Maschine. Das Ende der Reaktion, welches nach 40–48 Stdn. erreicht war, erkennt man am gänzlichen Verbrauch der Acetobromgalaktose, auf deren Anwesenheit in filtrierten Proben wir nach den Angaben von K. Freudenberg und K. v. Oertzen prüften⁷⁾. Nun wurden die anorganischen Produkte von der Benzollösung durch Absaugen über Talkum abgetrennt und mit 250 ccm heißem Benzol gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden mit Tierkohle entfärbt und i. Vak. zum Sirup eingedampft, aus dem wir restliches Benzol durch zweimaliges Niederdampfen mit Methanol vertrieben. Zur Entfernung des Hauptteils der nicht umgesetzten, wasserlöslichen Diaceton-fructose wurde der Sirup in 30 ccm warmem Methanol gelöst; nach Abfiltrieren einiger ungelöster Flocken ließen wir diese Lösung unter kräftigem Rühren zu der 20fachen Menge kalten Wassers tropfen. Der ausgefallene weiße Niederschlag wurde abzentrifugiert und mit Wasser gewaschen. Sollte er sich in zäh-klebriger Form abscheiden, so läßt er sich durch Verreiben mit etwas Eis leicht pulvrig und filtrierbar machen. Er besteht aus dem Disaccharid-Derivat und aus acetylierter Galaktose, welche offenbar der Acetobromgalaktose entstammt. Beträchtliche Anteile dieser beiden Reaktionsprodukte befinden sich jedoch auch noch in der wäbr.-methanol. Lösung und scheiden sich beim Einengen derselben i. Vak. auf etwa ein Drittel des Volumens ab.

Wir erhielten auf diese Weise insgesamt 9–10 g weiße, amorphe, pulvrige Substanz (exsiccator-trocken), die linksdrehend war.

b) Ammonolyse: Zur Entacetylierung wurden 9,2 g der exsiccator-trockenen Substanz in 100 ccm absol. Methanol gelöst und mit 100 ccm absol. Methanol, das bei 0⁰ mit Ammoniak gesättigt war, versetzt. Die Mischung blieb 7 Stdn. bei \sim 20⁰ stehen;

³⁾ O. Th. Schmidt u. A. Simon, J. prakt. Chem. 152, 190 [1939].

⁴⁾ H. O. L. Fischer u. C. Taube, Ber. dtsch. chem. Ges. 60, 488 [1927].

⁵⁾ M. Barczai-Martos u. F. Korösy, Nature [London] 165, 369 [1950].

⁶⁾ W. A. Hammond u. J. R. Withrow, Ind. Engng. Chem. 25, 653, 1112 [1953].

⁷⁾ Liebigs Ann. Chem. 574, 44 [1951].

danach wurde die methanolische Ammoniaklösung i. Vak. verjagt (Badtemp. 35°), desgleichen ein Teil des entstandenen Acetamids durch Sublimation (Badtemp. 60°; Wasserstrahl-Vak.).

Der hinterbleibende Sirup reduzierte Fehlingsche Lösung und enthielt neben dem Biose-Diaceton-Derivat Galaktose, wie sich papierchromatographisch zeigen ließ. Zur Entfernung derselben lösten wir den Sirup in 60 ccm absol. Methanol und ließen die Lösung unter Umschwenken in 900 ccm trockenen Äther eintropfen. Hierbei fiel die Galaktose in voluminösen, hygroskopischen Flocken aus. Der Niederschlag wurde einige Stunden bei 4° stehengelassen, danach rasch abgesaugt, mit trockenem Äther gewaschen und im Exsiccator getrocknet. Papierchromatographisch ergab sich, daß dieser Niederschlag (1.50 g) größtenteils aus Galaktose bestand, außerdem aber noch eine langsamer wandernde, möglicherweise disaccharidische Komponente enthielt, welche keine Seliwanoff-Reaktion gab, ferner eine schneller als Fructose wandernde Komponente, die sich mit Naphthoresorcin lila färbte; Fructose war nicht vorhanden. Der Niederschlag wurde verworfen.

Die äther.-methanol. Mutterlauge wurde zum Sirup eingengt und dieser in 60 ccm Wasser aufgenommen. Die wäßr. Lösung war gelblich und trübe; sie enthielt eine geringe Menge eines eigentümlich riechenden Öles emulgiert. Durch Erhitzen mit einer Spatelspitze Tierkohle und anschließende Filtration ließen sich diese Verunreinigungen leicht entfernen.

Das farblose und nur noch schwach riechende Filtrat wurde auf 125 ccm gebracht.

c) Abspaltung der Acetonreste: Zur Entacetonierung wurde diese Lösung mit dem gleichen Volumen 0.1 *m* Oxalsäure versetzt, so daß eine Lösung des Zucker-Derivates in 250 ccm 0.05 *m* Oxalsäure vorlag. Sie wurde unter den Bedingungen einer Wasserdampfdestillation 15–20 Min. hydrolysiert. Nach dieser Zeit war die Legalsche Acetonprobe im Destillat negativ, während sie in den ersten Destillatanteilen sehr stark positiv war.

Das mit fließendem Wasser abgekühlte Hydrolysat wurde mit gesätt. Calciumhydroxyd-Lösung sorgsam gegen Methylrot neutralisiert; letzte Spuren Oxalsäure entfernten wir mittels Ionenaustauscharzes IR-4B. Alkalische Reaktion wurde streng vermieden.

Die wäßr. Zucker-Lösung dampften wir i. Vak. auf ein kleines Volumen ein. Die Seliwanoffsche Probe auf Ketosen war positiv, ebenso die Fehlingsche Probe. Papierchromatographisch zeigte sich viel Ketobiose neben weniger Galaktose und Fructose. Die Gegenwart der Monosaccharide dürfte hauptsächlich auf teilweise Hydrolyse des Disaccharids während der Entacetonierung zurückzuführen sein.

d) Chromatographische Reinigung: Wir bereiteten uns eine Säule von 50 cm Länge und 5 cm Durchmesser, die etwa 350 g Cellulose-Pulver Schleicher & Schüll 123a enthielt, welches zuvor mit Wasser, Aceton, Pyridin, Butanol und nochmals mit Aceton gewaschen und an der Luft getrocknet worden war. Das zu chromatographierende Zuckergemisch vermischten wir, in möglichst wenig Wasser gelöst, in einem Schälchen mit Cellulose-Pulver zu einer krümeligen Masse, die wir im Exsiccator trockneten, in der Reibschale rasch zerkleinerten und auf die trockene Säule aufbrachten. Die Entwicklung und Elution erfolgte mit einem Gemisch aus 6 Voll. *n*-Butanol, 1 Vol. Pyridin und 1 Vol. Wasser¹⁾ (handelsübliche Lösungsmittel, redestilliert). Wir arbeiteten mit gelindem Unterdruck, so daß die Durchflußrate etwa 100 bis höchstens 150 ccm/Stde. betrug. Die Eluate fingen wir in Fraktionen von durchschnittlich 340 ccm ($\pm 10\%$) auf. Etwa 10 l Lösungsmittelgemisch reichten für eine Chromatographie aus.

Über jede einzelne Fraktion unterrichteten wir uns fortlaufend durch Rundfilterchromatographie. Hierzu ließen wir je etwa 1.5 ccm Eluat in kleinen Schälchen im gelinde evakuierten Exsiccator über Natriumhydroxyd/Schwefelsäure eintrocknen und nahmen den Rückstand in 0.05 ccm Wasser auf. Wir benützten Rundfilter vom Durchmesser 27 cm, auf denen man gleichzeitig 10 Fraktionen nebst Vergleichszuckern laufen lassen kann. Als Lösungsmittelgemisch hat sich *n*-Butanol-Aceton-Wasser 2:7:1 gut bewährt²⁾. Auch durch die optische Drehung der Fraktionen konnte der Verlauf der Chromatographie, wenn auch weniger empfindlich, verfolgt werden.

¹⁾ K. V. Giri u. V. N. Nigam, *Naturwissenschaften* 40, 343 [1953].

Die Fraktionen 4–9 eines Beispiels enthielten Fructose, 9–14 Galaktose, 15 Galaktose + Disaccharid, 16 und 17 Disaccharid + Spuren Galaktose, 18–28 reines Disaccharid, 29–31 waren zuckerfrei. Maximalen Disaccharid-Gehalt hatte Fraktion 19 mit α_D : -0.10° (2-dm-Rohr). Die Disaccharid-Fractionen wurden vereinigt und i. Vak. bei niedriger Temperatur trocken gedampft. Der Abdampfrückstand wurde in wenig Wasser aufgenommen, mit Tierkohle geklärt und erneut eingedampft, zuletzt unter Zusatz von absol. Methanol. Aus 10 g Diacetonfructose ergaben sich so 2.507 g (exsiccator-trocken) rein weißes, chromatographisch einheitliches Disaccharid (18.7% d. Th.). $R_{\text{Glucose}} = 0.72$; $R_{\text{Lactose}} = 1.36$ (Methodik: vergl. Fußnote 10).

e) Eigenschaften: Die 3- β -Galaktosido-fructose kristallisiert aus wenig Wasser auf Zusatz von Methanol, Äthanol, Methanol + Eisessig, Butanol + Eisessig – besonders schön in den beiden letztgenannten Fällen –, wenn man soviel von dem organischen Lösungsmittel zufügt, wie in der Hitze ohne Trübung aufgenommen wird. Bei einbis mehrtägigem Stehenlassen im Eisschrank scheiden sich derbe, kurze, schrägauslöschende Prismen bzw. Säulen ab. Größere Mengen kristallisiert man zweckmäßig in folgender Weise: Der Zucker wird in einer Schale in 4 bis 5 Teilen Wasser gelöst und mit absol. Äthanol (1–2 Vol.) versetzt bis zur beginnenden Trübung, die man durch einige Tropfen Wasser wieder zum Verschwinden bringt. Die Schale stellt man in einen Exsiccator, der viel absol. Äthanol sowie eine Schale mit wasserfreiem Calciumsulfat enthält und evakuiert vorsichtig. Die Kristallisation dauert mehrere Tage und verläuft mit sehr guter Ausbeute.

Die lufttrockenen Kristalle schmelzen bei 197–199° unter Gelbfärbung (Monoskop). Sie enthalten kein Kristallwasser und sind nicht hygroskopisch. Gewichtsverlust im Vakuum-Exsiccator über Diphosphorpentoxyd weniger als 0.1%.

$C_{12}H_{22}O_{11}$ (342.3) Ber. C 42.10 H 6.48 OC_2H_5 – Gef. C 42.11 H 6.43 OC_2H_5 –

Hypoiodit-Titrationen⁹⁾ ergaben 4.8 und 7.0% des Reduktionswertes von Lactose. Fehlingsche Lösung wird in der Hitze reduziert, mit Resorcin + Salzsäure tritt Rotfärbung ein (Seliwanoffs Ketosen-Reaktion).

Mutarotation (72.0 mg Sbst. in 3 ccm Wasser von 26°, 1-dm-Rohr)

Min.	4	4.3	5	5.5	7	9	11	14	25	60
α_D	-0.35	-0.40	-0.48	-0.52	-0.58	-0.62	-0.64	-0.645	-0.65	-0.65

$[\alpha]_D^{25}$: -14.6° (4 Min.) \rightarrow -27.1° (25 Min., konst.) ($c = 2.4$ in Wasser)

3- β -Galaktosido-glucose

Die Darstellung lehnt sich in allen wesentlichen Teilen derjenigen der Ketobiose an.

a) Kondensation: Ansatz: 20 g Diaceton-glucose, 30 g Silbercarbonat, 60 g wasserfreies Calciumsulfat, 6 g Jod und 31.4 g Acetobromgalaktose in insgesamt 320 ccm absol. Benzol.

Wir lösten den Abdampfrückstand in 50 ccm Methanol und ließen die Lösung in 1 l kaltes Wasser (4°) eintropfen. Das ausgefallene Material sowie die weitere (größere) Menge, die beim Einengen der Mutterlauge i. Vak. auf etwa 150 ccm anfiel, wurde isoliert und mit Wasser gewaschen. Sofern die Konsistenz teilweise sirupös war, wurde durch mehrfachen Abdampfen mit absol. Alkohol von anhaftendem Wasser befreit, sonst im Exsiccator getrocknet; Ausb. 16.3 g.

b) Ammonolyse: Die Entacetylierung wurde in der für das Fructose-Derivat beschriebenen Weise durchgeführt. Wir lösten den Ammonolyse-Rückstand in 100 ccm absol. Methanol, welches wir in 1.5 l trockenen Äther eingossen. Der hygroskopische, flockige Niederschlag wog exsiccator-trocken 5.6 g. Papierchromatographisch ergab er (wie bei der Synthese der Ketobiose) Galaktose und eine langsamer wandernde oligosaccharidische Komponente; er wurde verworfen.

⁹⁾ M. Macleod u. R. Robison, Biochem. J. 23, 517 [1929].

c) Die Entacetonierung des eingedampften äther. Filtrates wurde mit 500 ccm 0.05 n Oxalsäure (Wasserdampfdestillation) durchgeführt und dauerte 25 Min. Das aufgearbeitete Hydrolysat reduzierte stark Fehlingsche Lösung und zeigte papierchromatographisch die Gegenwart von Galaktosido-glucose sowie der monosaccharidischen Komponenten an.

d) Chromatographische Reinigung: Es wurde eine Cellulose-Säule gleicher Größe und die gleiche Technik wie für die Isolierung der Ketobiose angewandt.

Die Fraktionen 5–11 enthielten Monosaccharide, 12, 13 und 14 waren zuckerfrei, 15–27 enthielten das Disaccharid, 28–30 waren zuckerfrei. Maximalen Disaccharidgehalt zeigte Fraktion 20 mit $\alpha_D: +0.09^\circ$ (2-dm-Rohr).

Beim Eindampfen der vereinigten Disaccharid-Fraktionen i. Vak. kristallisierte der Zucker spontan. Ausb. 1.6 g (5.7% d.Th.). $R_{Glucose} = 0.70$, $R_{Lactose} = 1.31$, einheitlich (Methodik: vergl. FuBn. 10).

e) Eigenschaften: Die 3-β-Galaktosido-glucose wurde zur Analyse aus feuchtem Methanol umkristallisiert, nötigenfalls unter Zusatz von wenig Tierkohle. Die Mutterlaugen wurden vorteilhaft nach der „Exsiccatormethode“ aufgearbeitet. Der Zucker kristallisiert in feinen, oft rosettenförmig angeordneten Nadeln vom Schmp. 202–204° (Braunfärbung, Monoskop). Er enthält 1 Mol. Kristallwasser, von dem die Hälfte im Vakuum-Exsiccator bei gewöhnlicher Temperatur, der Rest erst bei erhöhter Temperatur abgegeben wird. Das Halbhydrat bildet sich auch, wenn man die wasserfreie Substanz feuchter Luft aussetzt. 633 mg „lufttrockene“ Sbst. verloren bei 23°/0.5 Torr über Diphosphorpentoxyd 20 mg an Gewicht = 3.16% (ber. Abnahme 1/2 H₂O: 15.8 mg = 2.50%). Bei 110° wurden weitere 3.37% (2.96%) abgegeben. Die Analyse stimmte dann auf wasserfreies Disaccharid.

C₁₂H₂₂O₁₁ (342.3) Ber. C 42.10 H 6.48 Gef. C 42.20, 42.45 H 6.82, 6.59

Gewichtszunahme der wasserfreien Sbst. an feuchter Luft 2.36%; ber. für 1/2 H₂O 2.63%.

C₁₂H₂₂O₁₁ · 1/2 H₂O (351.3) Ber. C 41.02 H 6.60 Gef. C 40.81 H 6.52

Hypojudit-Titration⁹⁾:

Lufttrockene Sbst.: Äquiv.-Gewicht für Monohydrat ber. 360, gef. 349

Lactose: Äquiv.-Gewicht für Monohydrat ber. 360, gef. 363.5

Fehlingsche Lösung wird in der Hitze reduziert, die Seliwanoff-Reaktion ist negativ.

Mutarotation (61.8 mg wasserfr. Sbst. in 3 ccm Wasser von 22°, 1-dm-Rohr)

Min.	0	3	4	5	9	13	21	23	25	27	30	45
α_D	(1.58)	1.48	1.45	1.42	1.37	1.32	1.26	1.24	1.23	1.21	1.19	1.12
		Min.	60	90	120	180	300	1 u. 3 Tage				
		α_D	1.07	0.96	0.92	0.87	0.85	0.85				

$[\alpha]_D^{25}: +76.7^\circ (t=0) \rightarrow +71.8^\circ (4 \text{ Min.}) \rightarrow +41.2^\circ (300 \text{ Min., konst.})$

Saure und enzymatische Spaltung der Disaccharide

a) Säurehydrolyse: Je 5 mg der Disaccharide wurden in verschlossenen Ampullen in 1 ccm 2nHCl 1.5 Stdn. bei 100° hydrolysiert. Die Hydrolysate wurden mit Austauschern Amberlite IR-4B und IR-120 von Ionen befreit und gefrier-getrocknet. Die Rückstände untersuchten wir papierchromatographisch auf die Spaltprodukte, wobei wir die schon früher von uns benutzte Methodik¹⁰⁾ verwendeten. Besprüht wurde mit saurem Aniliphthalat, zur Unterscheidung der Ketosen und Aldosen mit Naphthoresorcin/Trichloressigsäure¹¹⁾.

¹⁰⁾ M. A. Jermyn u. F. A. Isherwood, Biochem. J. 44, 402 [1949]; vergl. R. Kuhn, A. Gauhe u. H. H. Baer, Chem. Ber. 87, 298–299 [1954].

¹¹⁾ D. G. Walker u. F. L. Warren, Biochem. J. 49, XXXI [1951].

Die 3- β -Galaktosido-fructose lieferte Galaktose und Fructose, die 3- β -Galaktosido-glucose Galaktose und Glucose jeweils in etwa gleicher Stärke.

b) Enzymatische Hydrolyse: Enzymlösung: 20 mg Coli-Lactase in 1 ccm Wasser.

Je 5 mg der beiden 3- β -Biosen sowie 5 mg Lactose wurden in je 0.05 ccm Wasser gelöst, mit je 0.05 ccm Enzym-Lösung sowie einem Tröpfchen Toluol versetzt und im verschlossenen Gläschen auf 37° gehalten. Nach 12, 24 und 48 Stdn. wurden Proben zur Chromatographie entnommen.

Die Lactose war nach 12 Stdn. weitgehend, nach 24 Stdn. fast vollständig verschwunden unter Bildung von Galaktose und Glucose. Außerdem entstanden langsamer wandernde Resyntheseprodukte¹²⁾, deren Menge im weiteren Verlauf der Reaktion (48 Stdn.) wieder abnahm.

Die beiden 3- β -Biosen waren nach 12 Stdn. teilweise, nach 24 und 48 Stdn. stärker, aber unvollständig in ihre Monosaccharid-Komponenten gespalten. Auch hier traten Resyntheseprodukte auf, und zwar bei der Aldobiose schon nach 12 Stdn., bei der Ketobiose erst nach 48 Stunden.

Die Spaltungsversuche mit Emulsin (Enzym-Lösung: 40 mg Emulsin Merck in 1 ccm Wasser) wurden analog durchgeführt. Die 3- β -Galaktosido-glucose wurde hierbei etwa ebenso schnell gespalten wie Lactose, die 3- β -Galaktosido-fructose dagegen bedeutend langsamer.

3- β -Galaktosido-glucose-phenylosazon

a) Aus 3-Galaktosido-glucose: 100 mg Disaccharid, 300 mg Phenylhydrazinhydrochlorid und 300 mg Natriumacetat + 3H₂O wurden in 3 ccm Wasser gelöst und nach einigen Minuten Erhitzen auf dem Dampfbad mit wenig Tierkohle heiß filtriert. Danach setzten wir das Erhitzen 2 Stdn. fort. Aus der rötlichgelben klaren Lösung kristallisierte beim Abkühlen und Verdünnen auf 6 ccm das Osazon in feinen, zu Büscheln vereinigten Nadeln. Nach Stehenlassen über Nacht im Eisschrank wurde es abgesaugt und mit Eiswasser gewaschen. Das rein gelbe, exsiccator-trockene Produkt wog 123 mg (81% d.Th.). Der Schmelzpunkt ließ sich durch Umkristallisieren aus Wasser + etwas Äthanol von 180–181° auf 184–185° (Kupferblock auf 175° vorgeheizt; Zers.) erhöhen. Bräunliche Verunreinigungen, wie sie sich bei längerem Stehenlassen des reingelben Kristallisats unter der Mutterlauge bilden, lassen sich mit Äther-Methanol (4:1) leicht auf der Nutsche wegwaschen.

Zur Analyse wurde bei 105⁰/3 Torr über Diphosphorpentoxyd getrocknet.

C₂₄H₃₂O₉N₄ (520.5) Ber. C 55.37 H 6.20 N 10.77

Gef. C 55.06 H 6.45* N 10.56, 11.05

*) Die C,H-Bestimmung erfolgte unter Zusatz von V₂O₅.

Drehung: 11.2 mg Sbst. in 2 ccm absol. Pyridin, 1-dm-Rohr.

$[\alpha]_D^{25}$: +15.2° (5,10 u. 15 Min.) → ~ -4 bis -5° (21,26 u. 42 Stdn.).

b) Aus 3-Galaktosido-fructose: 500 mg Disaccharid, 1.5 g Phenylhydrazinhydrochlorid und 1.5 g Natriumacetat + 3H₂O wurden in 15 ccm Wasser 1.5 Stdn. ebenso behandelt wie unter a) beschrieben. Der Kolbeninhalt erstarrte beim Abkühlen zu einem dichten Brei gelber Nadeln, die abgesaugt und mit Wasser, danach mit wenig trockenem Aceton gewaschen wurden, bis dieses fast farblos abließ. Ausb. 623 mg (82% d.Th.); Schmp. 184–185° (Zers., Block auf 175° vorgeheizt).

Zur Analyse wurde bei 105⁰/3 Torr über Diphosphorpentoxyd getrocknet.

C₂₄H₃₂O₉N₄ (520.5) Ber. C 55.37 H 6.20 N 10.77

Gef. C 54.90 H 6.57*) N 10.43, 10.92

*) Die C,H-Bestimmung erfolgte unter Zusatz vom V₂O₅.

Drehung: 25.0 mg Sbst. in 5 ccm absol. Pyridin, 1-dm-Rohr.

$[\alpha]_D^{25}$: +13.0° (5 u. 10 Min.) → +10.0° (3 Stdn.) → -4° (21 Stdn.) →

→ -10.0° (26 Stdn.) → -13.0° (31 u. 47 Stdn.).

¹²⁾ K. Wallenfels, E. Bernt u. G. Limberg, Liebigs Ann. Chem. 584, 63 [1953]; 579, 113 [1952].

Die nach a) und b) hergestellten Osazon-Präparate lieferten identische Debye-Scherrer-Röntgenogramme und UR-Spektren. Der Misch-Schmelzpunkt war nicht erniedrigt.

Das reine 3- β -Galaktosido-glucose-phenylosazon ist leicht löslich in Eisessig und in Pyridin, schwer in Äther und Essigester. In absol. Äthanol löst es sich in der Kälte beträchtlich, in der Hitze leicht. Absol. Methanol löst auch in der Hitze schwer, feuchtes Methanol leichter. Ebenso wird das Osazon von wasserhaltigem Aceton schon in der Kälte ziemlich leicht gelöst, während es in trockenem Aceton auch in der Hitze fast unlöslich ist. Interessanterweise löst heißes Wasser das reine krist. Osazon recht schwer, während es sich bei der Darstellung (Anwesenheit von Verunreinigungen und Salzen) nicht aus der heißen wäbr. Lösung abscheidet.

247. Kurt Alder und Otto Ackermann: Über die Reaktion von Maleinsäure-anhydrid mit Allen

[Aus dem Chemischen Institut der Universität Köln a. Rh.]

(Eingegangen am 10. August 1954)

Allen reagiert bei höherer Temperatur mit Maleinsäure-anhydrid. Das kristalline Reaktionsprodukt stellt ein Addukt von 2 Moll. Kohlenwasserstoff mit 2 Moll. Maleinsäure-anhydrid dar und ist ein Δ^9 -¹⁰-Oktahydronaphthalin-tetracarbonsäure-(2.3.6.7)-dianhydrid. Der Addition des Maleinsäure-anhydrids geht eine Dimerisation des Allens zum 1.2-Bis-methylen-cyclobutan voraus.

Vor kurzem haben K. Alder und M. Schumacher¹⁾ über die Reaktionsformen berichtet, die bisher bei der Addition von Maleinsäure-anhydrid an ungesättigte Kohlenwasserstoffe verschiedener Art beobachtet worden sind. Wir liefern im folgenden einen neuen Beitrag zur Kenntnis der Einwirkung ungesättigter Systeme aufeinander und berichten über die Addition von Maleinsäure-anhydrid an Allen.

Erhitzt man die Komponenten in benzolischer Lösung, so erhält man eine wohldefinierte Verbindung. Ihre Veresterung mit Methanol/Schwefelsäure liefert einen Methylester, dessen Analyse und Molekulargewichtsbestimmung darauf schließen lassen, daß das Addukt Allen + Maleinsäure-anhydrid die Zusammensetzung $2C_3H_4 + 2C_4H_2O_3$ besitzt.

Die energische Dehydrierung des Dianhydrids mit Palladium-Tierkohle führt unter vollständiger Decarboxylierung in mäßiger Ausbeute zum Naphthalin. Eine partielle Dehydrierung erzielt man durch Erhitzen des Tetramethylesters mit Schwefel bzw. des Dianhydrids mit Selendioxyd in Acetanhydrid. In beiden Fällen werden nur 4 Atome Wasserstoff eliminiert und die Verbindungen nachgewiesenermaßen zum gleichen System dehydriert. Dabei entsteht, wie die Absorption des Esters im UV zeigt (λ_{\max} 279 m μ , $\log \epsilon$ 3.00; λ_{\max} 240 m μ , $\log \epsilon$ 3.97; in methanol. Lösung), eine Verbindung vom Typ der *o*-Phthalsäure. Ihre Oxydation mit Salpetersäure im Rohr nach M. Freund und K. Fleischer²⁾ ergibt eine Benzol-tetracarbonsäure.

Um sie exakt zu identifizieren, wurden die drei isomeren Benzol-tetracarbonsäuren dargestellt: die 1.2.3.4-Tetracarbonsäure (Mellophansäure) aus

¹⁾ Chem. Ber. 87, 447 [1954].

²⁾ Liebigs Ann. Chem. 411, 14 [1916].