

$\alpha,\alpha$ -Dimethyl- $\beta$ -[6-oxo-1.2.3.4.5.6.7.8-oktahydro-naphthyl-(2)]-valeriansäure (V): Zu einer Lösung von 500 mg III (1.7 mMol) in 30 ccm Methanol gibt man eine Lösung von 650 mg Oxalsäure in 10 ccm Wasser, läßt 1 Stde. bei Zimmertemperatur stehen und engt i. Vak. auf die Hälfte ein. Die Aufarbeitung erfolgt dann analog IV. Die Ausbeute an VA beträgt 40% d. Th.; VB wurde nicht rein erhalten. Schmp. VA 120–121°.

$C_{17}H_{26}O_3$  (278.4) Ber. C 73.3 H 9.4 Gef. A C 73.5 H 9.5

Keine UV-Absorption, somit Doppelbindung in 9–10-Stellung erhalten geblieben.

Darstellung der 2.4-Dinitro-phenylhydrazone gelang nicht, da sofort Umlagerung zu IV und Bildung des oben beschriebenen 2.4-Dinitro-phenylhydrazons von IV erfolgte.

$\alpha,\alpha$ -Dimethyl- $\beta$ -[6-oxo-1.2.3.4.6.7.8.9-oktahydro-naphthyl-(2)]-pentanol (VII): 500 mg Lithiumaluminimumhydrid werden in 30 ccm Äther gelöst und unter Röhren bis zum Rückfluß erhitzt. In die siedende Lösung tropft man eine Lösung von 1 g III (3.5 mMol) in 30 ccm Äther. Nach beendeter Reaktion erhitzt man noch etwa 20 Min. zum Sieden, läßt abkühlen, fügt nun vorsichtig 18 ccm Wasser zu und zersetzt mit 34 ccm 10-proz. Schwefelsäure. Nach Phasentrennung wird die äther. Schicht gewaschen, getrocknet und eingeeengt. Das verbleibende Öl wird wie bei IV hydrolysiert und aufgearbeitet. Die Ausbeute an VIIA beträgt 20% d. Th., an VIIIB 25% d. Th.; VIIA: Öl; VIIIB: Schmp. 85–87°.

$C_{17}H_{28}O_2$  (284.4) Ber. C 77.2 H 10.7 Gef. B C 76.9 H 10.5

$\lambda_{\text{max}} = 238 \text{ m}\mu, \epsilon = 18130$ .

2.4-Dinitro-phenylhydrazone von VIIA: Schmp. 120, 134–135°.

$C_{28}H_{32}O_5N_4$  (444.5) Ber. N 12.6 Gef. N 12.3

## 245. Richard Kuhn, Hans Helmut Baer und Adeline Gauhe: Chemische und enzymatische Synthese des 6- $\beta$ -D-Galaktosido-N-acetyl-D-glucosamins; enzymatische Synthese der Allolactose

[Aus dem Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung,  
Institut für Chemie, Heidelberg]  
(Eingegangen am 8. August 1955)

1.3.4-Tri-O-acetyl-N-acetyl-D-glucosamin und Acetobromgalaktose lieferten nach Königa-Knorr ein Disaccharid  $C_{14}H_{25}O_{11}N$ , dessen Osazon der Erwartung gemäß mit Allolactosazon identisch ist. Die 2-Acetamino-allolactose (6- $\beta$ -D-Galaktopyranosyl-N-acetyl-D-glucosamin) konnte auch mit Hilfe eines Fermentes von *E. coli* aus N-Acetyl-D-glucosamin und  $\beta$ -Phenyl-D-galaktosid erhalten werden. Daselbe Ferment bildete, wenn man es auf D-Glucose +  $\beta$ -Phenyl-D-galaktosid einwirken ließ, Allolactose. In normaler Frauenmilch kommt Allolactose nicht vor.

In einer Untersuchung über den Einfluß von Substituenten auf die Farbreaktion von N-Acetyl-D-glucosamin mit  $p$ -Dimethylamino-benzaldehyd haben wir einen auffallenden Unterschied zwischen 3 isomeren Disacchariden, nämlich 3-, 4- und 6- $\beta$ -D-Galaktosido-N-acetyl-D-glucosamin festgestellt<sup>1)</sup>: die 3-Verbindung<sup>2,3)</sup> gab schon in der Kälte mit verd. Alkali das bekannte Chromogen plus D-Galaktose, die 4-Verbindung<sup>4)</sup> lieferte auch in der Hitze kein

<sup>1)</sup> R. Kuhn, A. Gauhe u. H. H. Baer, Chem. Ber. 87, 1138 [1954].

<sup>2)</sup> R. Kuhn, A. Gauhe u. H. H. Baer, Chem. Ber. 87, 289 [1954].

<sup>3)</sup> R. Kuhn, H. H. Baer u. A. Gauhe, Chem. Ber. 87, 1553 [1954].

<sup>4)</sup> R. Kuhn u. W. Kirschenlohr, Chem. Ber. 87, 560, 1547 [1954].

Chromogen, aus der 6-Verbindung bildete sich ein noch unbekanntes Chromogen, das offenbar noch den Rest der D-Galaktose enthielt<sup>1,2)</sup>. Der chemische und der enzymatische Weg, auf dem wir das zu diesen Versuchen verwendete 6- $\beta$ -D-Galaktosido-N-acetyl-D-glucosamin erhalten hatten, soll hier beschrieben werden.

Ein Galaktosyl-N-acetyl-glucosamin, dessen enzymatische Bildung papierchromatographisch nachgewiesen werden konnte, dessen Konstitution jedoch unbekannt blieb, beobachtete K. Wallenfels<sup>5)</sup> bei der Einwirkung eines Ferments aus *E. coli* auf Lactose plus N-Acetyl-D-glucosamin. Der nicht publizierte  $R_{\text{Glucose}}$ -Wert, den uns K. Wallenfels persönlich mitgeteilt hat, stimmt auf das von uns erhaltene Disaccharid, für das im folgenden die Formel IV bewiesen wird. Auch für das Disaccharid D<sub>1</sub> von F. Zilliken, Ph. N. Smith, C. S. Rose und P. György<sup>6)</sup>, das bei der Einwirkung von Fermentlösungen aus *Bact. bifidum* var. Penn. auf Gemische von N-Acetyl-D-glucosamin und Lactose gebildet und dessen  $R_{\text{Lactose}}$ -Wert zu 1.13 angegeben wird, ist Identität mit dem von K. Wallenfels beobachteten und von uns als 6- $\beta$ -D-Galaktosido-N-acetyl-D-glucosamin erkannten Disaccharid anzunehmen.

Aus N-Acetyl-D-glucosamin (I), Triphenylchlormethan und Acetanhydrid in Pyridin (100°) erhielten wir das 1.3.4-Tri-O-acetyl-N-acetyl-6-trityl-D-glucosamin (II) in 60–70-proz. Ausbeute. Die aus wasserhaltigem Alkohol in Prismen kristallisierende Verbindung erwies sich als  $\alpha$ , $\beta$ -Gemisch ( $[\alpha]_D^{20} : +75^\circ$  in Pyridin). Die schwerer lösliche  $\alpha$ -Verbindung ließ sich nur unter beträchtlichen Verlusten bis zum Schmp. 167–168° und  $[\alpha]_D^{20} : +123^\circ$  (Pyridin) bringen. Zur Abspaltung des Tritylrestes wurde das  $\alpha$ , $\beta$ -Gemisch in *n*-Butylacetat mit Pd-Kohle hydriert (80°). Die erhaltene 1.3.4-Tri-O-acetyl-N-acetyl-Verbindung (III) kristallisierte nicht, ließ sich jedoch durch Triphenylchlormethan + Pyridin in II (röntgenographisch identifiziert) zurückverwandeln und durch Acetanhydrid + Pyridin in krist.  $\alpha$ -Pentaacetyl-D-glucosamin überführen. Die Tetraacetylverbindung III ist recht gut in Wasser löslich, wovon wir bei ihrer Isolierung aus den Hydrierungsansätzen Gebrauch machen konnten. Dagegen erwies sich die Wasserlöslichkeit bei Detritylierungsversuchen mit Bromwasserstoff-Eisessig als nachteilig für die Aufarbeitung. Da überdies in saurem Medium die Gefahr einer Acetylwanderung besteht, gaben wir der katalytischen Detritylierung in einem neutralen Lösungsmittel<sup>7)</sup> den Vorzug.

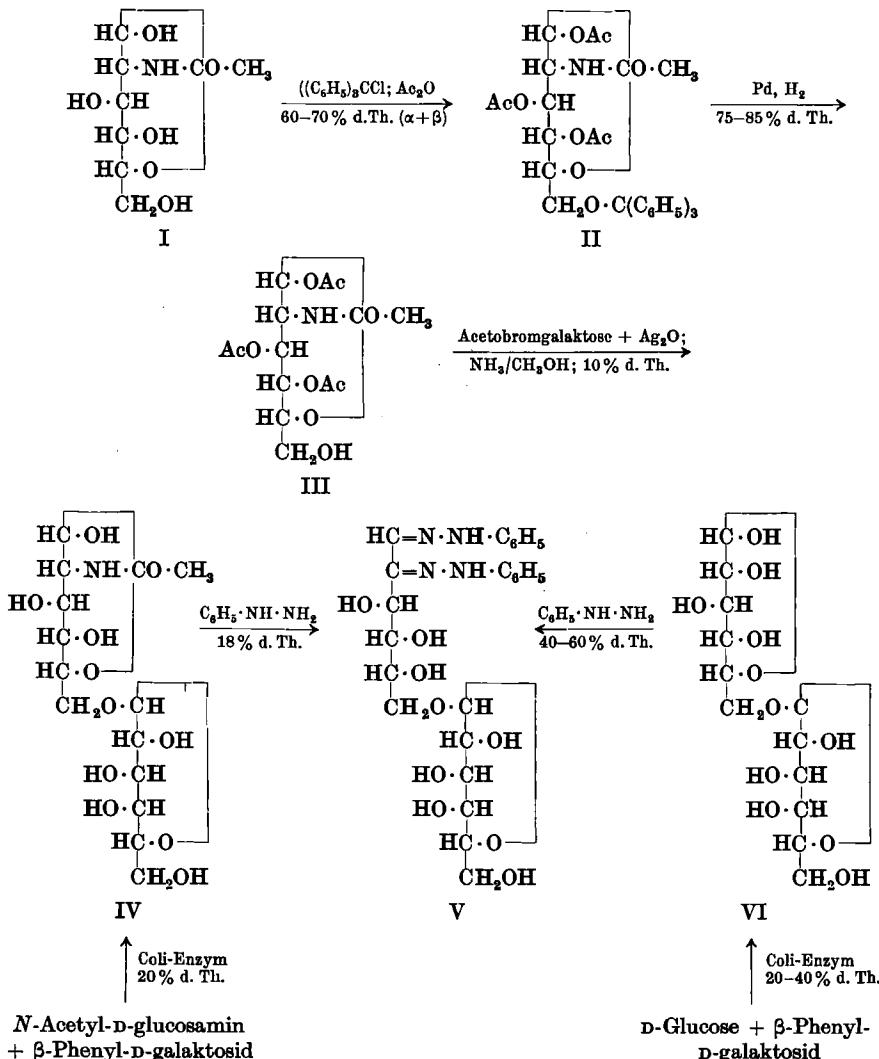
Die Umsetzung vom III mit Acetobromgalaktose erfolgte unter Zusatz von Ag<sub>2</sub>O, CaSO<sub>4</sub> und J<sub>2</sub> in Chloroform. Nach anschließender Ammonolyse zeigte das Papierchromatogramm neben Galaktose und Acetylglucosamin ein Morgan-Elson-positives, reduzierendes Disaccharid vom  $R_{\text{Lactose}}$ -Wert 1.15. Die Reinigung an Kohle-Celite lieferte das 6- $\beta$ -D-Galaktosido-N-acetyl-D-glucosamin (IV) in chromatographisch einheitlicher, jedoch amorpher Form mit der richtigen Zusammensetzung C<sub>14</sub>H<sub>25</sub>O<sub>11</sub>N. Als Drehungsvermögen für

<sup>5)</sup> Vortragsreferat Angew. Chem. 65, 137 [1953].

<sup>6)</sup> J. biol. Chemistry 208, 299 [1954].

<sup>7)</sup> P. E. Verkade u. Mitarbb., Recueil Trav. chim. Pays-Bas 59, 1123 [1940]; 61, 373 [1942].

Präparate verschiedener Darstellung fanden wir  $[\alpha]_D^{22} : +26^\circ$  bis  $+31^\circ$  (Wasser). Ein gut kristallisierendes Derivat des Disaccharids (*N*-Acetyl-allolactosamin, 2-Desoxy-2-acetamino-allolactose, IV) erhielten wir durch Kondensation mit 4-Amino-diphenyl in Alkohol unter Zusatz von etwas Ammoniumchlorid und anschließende Acetylierung des erhaltenen *N*-Glykosids. Das



4-[6- $\beta$ -(2,3,4,6-Tetraacetyl-D-galaktosyl)-3,4-diacyl-N-acetyl-D-glucosaminy]-4-phenyl-diphenyl kristallisiert aus Tetrachlorkohlenstoff in flachen Prismen vom Schmp. 192–194° und  $[\alpha]_D^{22} : -64.5^\circ$  (Chloroform). Dieses Derivat hat eine einwandfreie Identifizierung mit dem durch enzymatische Synthese gewonnenen Disaccharid ermöglicht.

Für die enzymatische Synthese dienten Fermentpräparate aus einem *E. coli*-Stamm, der an Lactose gewöhnt war<sup>8)</sup>. Die Darstellung der Präparate wird im Versuchsteil beschrieben. Als Substrat war Lactose + *N*-Acetyl-*D*-glucosamin wenig geeignet, da sich das gesuchte Disaccharid von unverbrauchter Lactose chromatographisch nur schwierig trennen läßt. Wir haben daher das Colifermen auf Mischungen von  $\beta$ -Phenyl-*D*-galaktosid und *N*-Acetyl-*D*-glucosamin einwirken lassen. Das gebildete reduzierende *N*-haltige Disaccharid ( $R_{\text{Lactose}} = 1.15$ ) haben wir an einer Säule aus Cellulosepulver von Monosacchariden und einem in geringer Menge entstandenen *N*-freien Disaccharid ( $R_{\text{Lactose}} 0.70$ ) getrennt und chromatographisch einheitlich erhalten. Es lieferte bei Umsetzung mit 4-Amino-diphenyl und anschließender Acetylierung ein aus Tetrachlorkohlenstoff kristallisierendes Derivat vom Schmp. 192–194°. Dieses war mit dem entsprechenden Derivat, das der chemischen Synthese entstammte, nach Mischprobe (192–194°), IR-Spektrum und Debye-Scherrer-Aufnahmen identisch.

Beweisend für die 1,6-Verknüpfung ist, abgesehen von der chemischen Synthese, die Umsetzung mit Phenylhydrazin. Dabei lieferte das 6- $\beta$ -*D*-Galaktosido-*N*-acetyl-*D*-glucosamin (IV) Allolactosazon (V) vom Schmp. und Misch-Schmp. 190–192°. Das Vergleichspräparat wurde nach B. Helferich und G. Sparnberg<sup>9)</sup> dargestellt. Die beiden Osazone waren auch nach IR-Spektrum<sup>3)</sup> und Debye-Scherrer-Aufnahmen identisch. Das Ferment aus *E. coli* überträgt also den Galaktoserest des  $\beta$ -Phenyl-*D*-galaktosids in  $\beta$ -glykosidischer Bindung auf die 6-Stellung des Acetylglucosamins.

Ersetzt man das Acetylglucosamin durch *D*-Glucose als Acceptor, so wird durch das Colifermen ebenfalls Galaktosidierung in 6-Stellung erzielt. Aus *D*-Glucose +  $\beta$ -Phenyl-*D*-galaktosid erhält man somit 6- $\beta$ -*D*-Galaktosido-*D*-glucose, d. h. Allolactose (VI). Durch Einwirkung von Phenylhydrazin auf die enzymatischen Ansätze ließ sich, ohne daß eine vorangehende chromatographische Trennung der Zucker erforderlich war, reines Allolactosazon vom Schmp. 192° gewinnen. Wir konnten es auf Grund seiner Löslichkeit in heißem Wasser leicht von den begleitenden schwerlöslichen Osazonen der Glucose und Galaktose trennen. Die Ausbeute an Osazon (V) entsprach einer Ausbeute an Allolactose von 20–40 % d. Theorie.

Als Galaktosespender kann auch Lactose Verwendung finden, doch nimmt dann die enzymatisch gebildete Allolactose mit zunehmender Einwirkungsdauer des Ferments rascher ab, als wenn man  $\beta$ -Phenyl-*D*-galaktosid verwendet, so daß nach einiger Zeit nur noch Monosaccharide papierchromatographisch zu sehen sind. Möglicherweise übt das in Freiheit gesetzte Phenol eine – vom präparativen Gesichtspunkt aus erwünschte – Hemmwirkung aus. Aus Lactose allein wird durch das Colifermen neben einem Disaccharid vom  $R_{\text{Lactose}}$ -Wert 0.70 auch Allolactose ( $R_{\text{Lactose}} = 0.80$ ) gebildet.

<sup>8)</sup> Vergl. J. Monod, A. M. Torriani u. J. Gribetz, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 227, 315 [1948]; J. Lederberg, J. Bacteriol. 60, 381 [1950].

<sup>9)</sup> Ber. dtsch. chem. Ges. 66, 806 [1933].

K. Wallenfels, E. Bernt und G. Limberg<sup>10)</sup> haben durch Einwirkung einer gereinigten  $\beta$ -Galaktosidase aus *E. coli* auf Lactose + Glucose ein Disaccharid erhalten, das sich chromatographisch genau so verhielt wie dasjenige, das die Autoren mit Fermentpräparaten aus Schimmelpilzen, aus *Helix pomatia* und aus Kälberdarm gewinnen konnten ( $R_{\text{Glucose}} = 0.47$  in Butanol:Pyridin:Wasser = 6:4:3). Dieses Disaccharid wurde als Isomeres der Lactose erkannt und Lactobiose (Lactobiose I) benannt. Ähnliche Versuche liegen von M. Aronson<sup>11)</sup> vor. Nach unseren Versuchen mit dem Coliferment besteht kein Zweifel, daß die „Lactobiose“ mit der seit langem bekannten Allolactose identisch ist. Auch hat J. H. Pazur<sup>12)</sup> unter den Produkten der Transgalaktosidierung mit Hefeenzymen ein Disaccharid gefunden, das er für 6-Galaktosido-glucose hält. Die Leichtigkeit, mit der dieses Disaccharid durch Fermente verschiedenen Ursprungs gebildet wird, ist hervorzuheben.

Wir vermuten, daß damit auch die Auffindung der Allolactose in der Frauenmilch durch M. Polonovski und A. Lespagnol<sup>13)</sup> zusammenhängt. Obwohl wir im Laufe der letzten Jahre sehr bedeutende Mengen an Frauenmilch auf Oligosaccharide verarbeitet haben und die Allolactose mit ihrem  $R_F$ -Wert gut kennen, gelang es uns nie, dieses Disaccharid in der Frauenmilch zu entdecken. Anderseits stimmen die Angaben, die M. Polonovski und A. Lespagnol für die kristallisierte Allolactose aus Frauenmilch gemacht haben, so gut mit den Befunden von B. Helferich und G. Sparnberg<sup>6)</sup> für die chemisch synthetisierte 6- $\beta$ -D-Galaktosido-D-glucose überein, daß man annehmen muß, daß die französischen Autoren die Allolactose in Händen hatten. Zur Klärung des Widerspruchs sind wir geneigt anzunehmen, daß eine bakterielle Infektion der Frauenmilch im Spiele war. In dieser Vermutung werden wir bestärkt durch folgende Angabe: „Mais recueillir 4 litres de lait de Femme peut demander parfois plusieurs semaines, et, malgré la présence de l'alcool, certaines fermentations s'établissent quelquefois, qui dégradent la caséine et l'albumine“<sup>14)</sup>. In der 21 Jahre später erschienenen Arbeit von M. Polonovski und J. Montreuil<sup>15)</sup> heißt es: „La purification de la fraction contenant l'allolactose n'a pas encore été poussée assez loin pour que nous puissions identifier ce diholoside chromatographiquement“.

Nach unseren Befunden kann die Allolactose nicht als normaler Bestandteil der Frauenmilch angesehen werden. Dies schließt aber nicht aus, daß ihr unter Umständen doch eine besondere physiologische Bedeutung zukommt, beim Kalb sowohl wie beim menschlichen Säugling. Denn sie wird fermentativ aus milchzuckerhaltigen Lösungen im Darm des Kalbes, vermutlich auch des Säuglings, gebildet. Eine „allolactose-freie Ernährung“ läßt sich aus diesem Grunde, auch wenn die Milch frei von Allolactose ist, nicht durch-

<sup>10)</sup> Liebigs Ann. Chem. 584, 63 [1953]; 579, 113 [1953].

<sup>11)</sup> Arch. Biochem. Biophysics 39, 370 [1952].

<sup>12)</sup> J. biol. Chemistry 208, 439 [1954]; Science [Washington] 117, 355 [1953].

<sup>13)</sup> Bull. Soc. Chim. biol. 15, 320 [1933].

<sup>14)</sup> M. Polonovski u. A. Lespagnol, l. c.<sup>13)</sup> S. 322.

<sup>15)</sup> C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 238, 2263 [1954].

führen. Man kann vorerst nur schließen, daß die Allolactose als solche nicht zu denjenigen Bestandteilen der Frauenmilch gehört, die sie gegenüber der Kuhmilch auszeichnen.

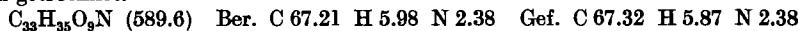
Hrn. Dr. E. F. Möller haben wir für wiederholte Züchtungen des Coli-Stammes, Frl. A. Seeliger und Frl. D. Tschampel für die experimentelle Unterstützung der Arbeit, sowie Hrn. E. Röhm für die Röntgendiagramme zu danken.

### Beschreibung der Versuche

Die angegebenen  $R_{\text{Lactose}}$ -Werte beziehen sich auf die absteigende Papierchromatographie mit Schleicher & Schüll-Papier 2043b in Essigester-Pyridin-Wasser 2:1:2 (obere Schicht).

#### Chemische Synthese des 6- $\beta$ -D-Galaktopyranosyl-N-acetyl-D-glucosamins

1.3.4-Tri-O-acetyl-N-acetyl-6-trityl-D-glucosamin (II): 25 g N-Acetyl-D-glucosamin und 32 g Triphenylchlormethan werden unter Feuchtigkeitsauschluß auf dem Dampfbad in 135 ccm absol. Pyridin gelöst und in der Hitze vorsichtig mit 56 ccm Acetanhydrid versetzt. Die Reaktionsmischung wird nach dem Erkalten über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen und danach langsam unter heftigem Rühren in 2 l Eiswasser eingetropft, welches 80 ccm Eisessig enthält. Der gründlich mit Eiswasser gewaschene Niederschlag wird zuerst an der Luft, dann im Exsiccator über Diphosphorpanoxyd und Kaliumhydroxyd getrocknet und wiegt 60–65 g. Nun digeriert man das trockene Pulver 3 mal mit je etwa 350 ccm Benzin (Sdp. 70–80°) unter gelindem Erwärmen und anschließend 2 mal mit je 90 ccm siedendem Äther. Der ungelöste Rückstand (40–45 g) stellt die rohe Tritylverbindung dar, die man in 200 ccm heißem 70-proz. Äthanol löst und durch schnelles Abkühlen unter fortwährendem Reiben mit dem Glasstab kristallisiert erhält. Die Substanz neigt zur Gelbildung; aceton-vergällter Alkohol hat sich zum Umkristallisieren besser bewährt als benzin-vergällter. Das so gewonnene Gemisch der anomeren  $\alpha$ - und  $\beta$ -Formen der Tritylverbindung (21–23 g) dreht spezif. etwa +75° (Pyridin) und besteht aus feinen Nadeln mit unscharfem Schmp. zwischen 120 und 130°. Zur Analyse wurde 3 Stdn. bei 78°/3 Torr über Diphosphorpanoxyd getrocknet.



Durch weiteres Umkristallisieren aus wäßrigem Alkohol sowie durch Elution mit Äther läßt sich die schwerer lösliche, stärker rechts drehende  $\alpha$ -Verbindung anreichern bzw. reinigen. Leider sind jedoch die Löslichkeitsunterschiede zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Form so gering, daß sich die Reindarstellung sehr verlustreich gestaltet. Zur Weiterverarbeitung verwendeten wir Präparate, deren spezif. Drehung bei +96° bis +104° und deren Schmp. bei 147–149° lagen. Ein Präparat, das wir ausgehend von einem ersten Kristallat (23.4 g;  $[\alpha]_D^{25}$ : +75° in Pyridin, Schmp. 120–130°) durch 7 malige Behandlung mit je 100 ccm absol. Äther und drei anschließende Umkristallisationen aus 70-proz. Äthanol erhalten hatten, wog nur noch 1.0 g, schmolz bei 167–168° und drehte spezif. +123°. Die Analyse war unverändert. Aus den ersten Ätherextrakten kristallisierten Fraktionen von der spezif. Drehung +40 bis +45°, in denen die  $\beta$ -Form angereichert war. Unsere Darstellungsweise lehnt sich weitgehend an die Vorschrift für das entsprechende Glucose-Derivat<sup>16)</sup> an. Es muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß dort, gerade umgekehrt zu unserem Fall, die  $\beta$ -Verbindung mit  $[\alpha]_D^{25}$ : +44.8° die schwerer lösliche Form ist.

1.3.4-Tri-O-acetyl-N-acetyl-D-glucosamin (III): 5 g 6-Trityl-D-glucosamin-tetraacetat wurden mit 5 g 10-proz. Palladium-Kohle-Katalysator<sup>7)</sup> in 90 ccm *n*-Butylacetat bei 80° hydriert. Nach 24 Stdn. war die Wasserstoffaufnahme praktisch beendet. Die verbrauchte Menge von etwa 250 ccm Wasserstoff gibt ein ungefähres Bild davon, daß 1 Mol. aufgenommen wurde. Die genaue Reduktion der berechneten Menge H<sub>2</sub> (190 ccm bei 760 Torr/0°) auf die gegebenen Verhältnisse über

<sup>16)</sup> Org. Syntheses, Vol. 22, S. 56.

der wäßrigen Sperrflüssigkeit der Apparatur ist undurchführbar, solange die Sättigungsdrücke von Wasser in Gegenwart von Butylacetat unbekannt sind. — Der Katalysator wurde abgesaugt und erst mit Essigester, dann mit 100 ccm heißem Äthanol gewaschen. Die mit den Waschflüssigkeiten vereinigte Butylacetatlösung engten wir i. Vak. auf etwa 20 ccm ein, setzten ein dreifaches Vol. Wasser zu und dampften unter anfänglich mehrfacher Ergänzung des Wassers schließlich trocken. Das Tetraacetat entzogen wir dem weißen Rückstand durch viermalige Elution mit je 75 ccm Wasser von 60–70°. Der wasserunlösliche Teil des Rückstandes wog exsiccatorgetrocknet 2.6 g und lieferte nach Umkristallisieren aus Äther und Petroläther 2.0 g Triphenylmethan vom Schmp. 91–92° (Lit. 93°). Die wäßrigen Extrakte dampften wir i. Vak. zum Sirup ein, den wir durch zweimaligen Zusatz von absol. Alkohol entwässerten. Nach Aufnehmen in Chloroform, Abfiltrieren einiger Flöckchen und Eindampfen i. Vak. erhielten wir das Tetraacetat als schaumig amorphe, farblose, hygroskopische Substanz (2.2 g i. Vak. über Diphosphorpentoxid und Paraffin getrocknet), deren Kristallisation uns bisher nicht gelang.

$C_{14}H_{21}O_9N$  (347.2) Ber. C 48.39 H 6.09 N 4.03  
Gef. C 48.01, 47.92 H 5.99, 6.22 N 3.83, 4.11

Auch in Äthylacetat- oder in Äthanollösung bei 50° konnten wir die Tritylgruppe abhydrieren, allerdings unter Verwendung etwas größerer – 2.5facher – Katalysatormenge. Die Ausbeuten lagen, ebenso wie bei mehreren Versuchen in Butylacetatlösung, zwischen 75 und 85% d. Theorie.

Eine 100-mg-Probe des Tetraacetyl-glucosamins wurde in 0.3 ccm Pyridin mit 0.2 ccm Acetanhydrid 15 Stdn. bei etwa 25° acetyliert. Nach Entfernung des überschüss. Anhydrids und des Pyridins durch mehrfaches Abdampfen mit Methanol i. Vak. erhielten wir einen Sirup, der beim Behandeln mit wenig Äther/Methanol 4:1 in langen Nadeln kristallisierte. Sie wurden mit Äther gewaschen und schmolzen dann bei 133–134°. Die Mischprobe mit  $\alpha$ -Pentaacetyl-D-glucosamin zeigte keine Erniedrigung. Die Drehung war  $[\alpha]_D^{23} : +90.4^\circ$  ( $c = 1.1$  in Chloroform); Lit.:  $[\alpha]_D^{23} : +93.3^\circ$  ( $c = 5$  in Chloroform)<sup>17)</sup>.

Eine andere 100-mg-Probe wurde mit 100 mg Triphenylchlormethan in 1 ccm absol. Pyridin retryliert (16 Stdn. bei 20° + 10 Min. bei 95°). Der durch Eingießen in Eiswasser gewonnene, gut ausgewaschene und getrocknete Niederschlag wurde 3 mal mit 3 ccm warmem Benzin extrahiert und dann aus 70-proz. Äthanol umkristallisiert und mit Äther gewaschen; 69 mg vom Schmp. 157–158°. Das Röntgenogramm war mit dem der ursprünglichen Tritylverbindung (II) identisch.

6- $\beta$ -D-Galaktopyranosyl-N-acetyl-D-glucosamin (IV): a) Kondensation: 4.5 g 1,3,4-Triacetyl-N-acetyl-D-glucosamin wurden zusammen mit 20 g wasserfreiem Calciumsulfat (Drierite<sup>18)</sup>) und 5 g frisch gefälltem Silberoxyd<sup>19)</sup> in 40 ccm absol., alkoholfreiem Chloroform 30 Min. unter Feuchtigkeitsausschluß gerührt. Sodann ließen wir unter fortwährendem Rühren eine Lösung von 5.4 g Acetobromgalaktose und 0.7 g Jod in 40 ccm absol. Chloroform im Verlauf 1 Stde. zutropfen; nach einer weiteren Stunde gaben wir langsam noch 5 g Silberoxyd sowie 0.3 g Jod in einigen ccm Chloroform zu. Insgesamt rührten wir 5 Stdn.; danach war eine Probe auf Acetobromgalaktose<sup>20)</sup> negativ. Die Lösung wurde von dem anorganischen Bodenkörper abgetrennt und dieser gründlich mit Chloroform gewaschen. Beim Eindampfen i. Vak. erhielten wir einen glasig amorphen Rückstand. Dieser wurde zusammen mit dem Reaktionsprodukt aus einem entsprechend durchgeführten 2.25-g-Ansatz weiterverarbeitet. Kristallisation konnte nicht erzielt werden.

<sup>17)</sup> C. S. Hudson u. J. K. Dale, J. Amer. chem. Soc. 38, 1431 [1916]; O. Westphal u. H. Holzmann, Ber. dtsch. chem. Ges. 75, 1274 [1942].

<sup>18)</sup> W. A. Hammond u. J. R. Withrow, Ind. Engng. Chem. 25, 653, 1112 [1933].

<sup>19)</sup> aus  $AgNO_3$  und  $NaOH$ ; das mit Wasser gründlich gewaschene Oxyd wurde abgesaugt, mit trockenem Aceton gewaschen und erst an der Luft, dann 2 Stdn. im Exsiccator getrocknet.

<sup>20)</sup> K. Freudenberg u. K. v. Oertzen, Liebigs Ann. Chem. 574, 44 [1951].

b) Ammonolyse: Wir lösten hierzu das rohe Reaktionsprodukt in 250 ccm bei 0° mit Ammoniak gesättigtem absolutem Methanol und ließen die Lösung 20 Stdn. bei 4° stehen. Nun engten wir i. Vak. bei niedriger Temperatur auf etwa 25 ccm ein, versetzten mit Essigester und dampften 3 mal mit frischem Essigester auf ein kleines Volumen ein. Danach haben wir die ausgefallene klebrige Masse zur Entfernung der Hauptmenge des entstandenen Acetamids 3 mal mit je 50 ccm Essigester ausgekocht und anschließend einige Zeit i. Vak. auf etwa 50° erhitzt. Papierchromatographisch ergab sich die Anwesenheit von *N*-Acetyl-glucosamin, Galaktose und von einem Morgan-Elson-positiven Disaccharid.

c) Chromatographische Isolierung: Wir brachten das in 50 ccm Wasser gelöste Zuckergemisch auf eine Carboraffin-Celite-Säule<sup>21)</sup> (je 150 g) von 33 cm Länge und 6 cm Durchmesser und eluierten nacheinander mit 6.5 l Wasser, 8 l 2-proz., 2 l 4-proz., 1.5 l 8-proz. und 4 l 12-proz. Äthanol. Die Eluate wurden in 100-cm-Fraktionen aufgefangen. Nachdem die Monosaccharide durch Wasser und 2-proz. Äthanol herausgewaschen worden waren, erschien das Disaccharid mit 12-proz. Äthanol, wie sich an Hand von Dreihung und Rundfilterchromatographie<sup>22b)</sup> feststellen ließ. Nach Eindampfen der entsprechend vereinigten Fraktionen und Abdampfen mit absolutem Alkohol stellte das Disaccharid ein weißes amorphes Pulver dar, das zur Analyse bei 65°/3 Torr über Diphosphorpentoxid getrocknet wurde und dann 769 mg wog (10.2% d. Th.). Es enthielt etwas Asche aus der Säule (2.4% seines Gewichts). Bei Berücksichtigung dessen war die Analyse:

$C_{14}H_{25}O_{11}N$  (383.4) Ber. C 43.86 H 6.57 N 3.65 Gef. C 43.91 H 7.00 N 3.46

$[\alpha]_D^{25}$ : +30.9° (c = 1.05 in Wasser). Bei einem anderen Präparat fanden wir nach nochmaliger Chromatographie auf einem großen Papierbogen  $[\alpha]_D^{25}$ : +25.7° (c = 1.1 in Wasser).

Der  $R_{Lactose}$ -Wert des Disaccharids ist 1.15, entsprechend  $R_{Glucose} = 0.59^2)$ . Die Morgan-Elson-Reaktion ist positiv. Das durch Einwirkung von Alkali (0.05 n  $Na_2CO_3$ , 5 Min. bei 98°) entstehende Chromogen hat einen  $R_{Lactose}$ -Wert von 2.03, entsprechend  $R_{Glucose} = 1.04^2)$ . Die Oxydation des Disaccharids mit Natriummetaperjodat, von dem 5.9 Mol. verbraucht wurden, haben wir ebenfalls bereits beschrieben<sup>2)</sup>.

#### Enzymatische Synthese des 6- $\beta$ -D-Galaktopyranosyl-*N*-acetyl-D-glucosamins (IV)

Enzympräparat aus *Escherichia coli*: *Escherichia coli* W (ATCC- Nr. 9637) wurde von Hrn. Dr. E. F. Möller auf einem Nährmedium, welches 2% Lactose als einzige Kohlenhydratkompone enthielt, gezüchtet. Die Kulturen wurden 1–1.5 Tage unter intensivem Schütteln bebrütet, bis maximales Wachstum erreicht war. Die mit 18000 U/Min. abzentrifugierten und ausgewaschenen Bakterien wurden mit Aluminiumoxyd (Woelm, neutral) und Wasser fein zerrieben. Nach Abzentrifugieren und mehrfachem Eluieren der zerkleinerten Bakterienmasse haben wir die wässrigen Extrakte gefriergetrocknet und so rohe Enzympräparate erhalten, welche  $\beta$ -Galaktoside zu spalten vermochten ( $\beta$ -Phenyl-D-galaktosid, Lactose, 3- $\beta$ -D-Galaktosido-D-glucose<sup>23a)</sup>). Die  $\beta$ -Glucoside Cellobiose und Gentiobiose wurden nicht angegriffen.

6- $\beta$ -D-Galaktopyranosyl-*N*-acetyl-D-glucosamin: 4.42 g *N*-Acetyl-D-glucosamin (0.02 Mol) und 5.12 g  $\beta$ -Phenyl-D-galaktosid<sup>23)</sup> (0.02 Mol) wurden in 30 ccm Wasser unter Erwärmung gelöst und nach Erkalten mit einer Lösung von etwa 1 g des Enzympräparates in 30 ccm Wasser versetzt. Nach Zusatz von 0.6 ccm Toluol hielten wir den Ansatz 18 Stdn. auf 37°. Darauf erhitzten wir die Reaktionsmischung zur Inaktivierung des Enzyms 15 Min. im siedenden Wasserbad. Das dabei ausgeschiedene Protein wurde abgetrennt und gründlich mit Wasser ausgewaschen. Die wässrige Lösung extrahierten wir über Nacht im Apparat mit Äther, um das freigesetzte Phenol

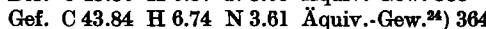
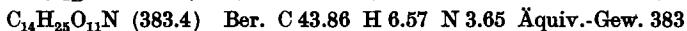
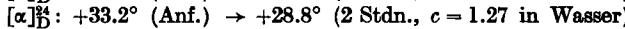
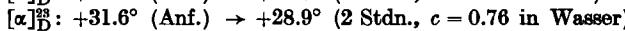
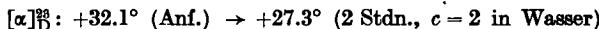
<sup>21)</sup> R. L. Whistler u. D. F. Durso, J. Amer. chem. Soc. 72, 677 [1950].

<sup>22a)</sup> R. Kuhn u. H. H. Baer, Chem. Ber. 87, 1560 [1954]; <sup>22b)</sup> ebenda 87, 1563 [1954].

<sup>23)</sup> E. Fischer u. E. F. Armstrong, Ber. dtsch. chem. Ges. 35, 833 [1902]; B. Helferich u. E. Schmitz-Hillebrecht, Ber. dtsch. chem. Ges. 66, 382 [1933].

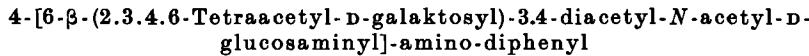
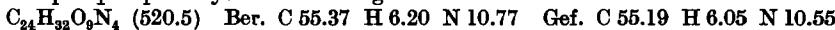
zu entfernen. Dann engten wir sie i. Vak. auf etwa 10 ccm ein und trennten die darin enthaltenen Zucker auf zwei gleichen Säulen aus Cellulosepulver. Dabei wandten wir die gleiche Methodik an, deren wir uns früher schon bedienten<sup>23b)</sup>. Zur Elution wurden etwa 12 l Lösungsmittelgemisch (Butanol:Pyridin:Wasser = 6:1:1) pro Säule benötigt. Die ersten 4–5 l eluierten *N*-Acetyl-glucosamin und Galaktose; nach etwa 8.5 l begannen die Fraktionen des Galaktosido-*N*-acetyl-glucosamin zu enthalten. Die folgenden 3.5 l beider Säulen wurden gemeinsam i. Vak. eingedampft und lieferten das Disaccharid, welches wir zur Entfernung geringer Verunreinigungen in Wasser aufnahmen, mit wenig Tierkohle behandelten und wieder eindampften. Wir erhielten so 1.53 g als weißes, papierchromatographisch einheitliches Pulver (20% d.Th.). Bei anderen Ansätzen waren die Ausbeuten 19 bzw. 21.4% d. Theorie.

Bei 3 verschiedenen Präparaten fanden wir folgende Drehungen:



Als Nebenprodukt der Synthese entstand ein langsamer wandernder reduzierender Zucker, der bei saurer Hydrolyse nur Galaktose ergab. Wir erhielten ihn in schwankenden Mengen (100–400 mg), indem wir nach der Elution des Hauptproduktes die trockengesaugten Säulen in mehrere Abschnitte zerlegten, die wir getrennt mit Wasser extrahierten. Der Zucker fand sich in den mittleren und unteren Säulenabschnitten. Sein *R*<sub>Lactose</sub>-Wert war 0.70. Das Äquivalentgewicht wurde zu 356 bestimmt (ber. für ein aus 2 Moll. Galaktose aufgebautes Disaccharid 342)<sup>24)</sup>. Es dürfte sich dabei um die „Galaktobiose“ von Wallenfels<sup>10)</sup> handeln, die auch von den amerikanischen Autoren<sup>11, 12)</sup> gefunden worden ist. In den oberen Säulenabschnitten war in sehr geringer Menge ein nicht weiter untersuchtes Morgan-Elson-positives Oligosaccharid vorhanden.

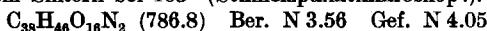
Allolactose-phenylosazon (V) aus 6- $\beta$ -D-Galaktopyranosyl-*N*-acetyl-D-glucosamin (IV): 500 mg Disaccharid, 3 g Phenylhydrazin-hydrochlorid und 1.8 g Natriumacetat·3H<sub>2</sub>O wurden in 10 ccm Wasser 1.5 Stdn. im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach Filtration der orangefarbenen heißen Lösung mit wenig Tierkohle wurde sie auf 25 ccm verdünnt, mit einigen Kriställchen Allolactosazon geimpft und bei 4° der Kristallisation überlassen. Das Osazon schied sich in mikroskopischen, zu rosettenförmigen oder kugeligen Aggregaten vereinigten Nadelchen ab, die wir abzentrifugierten und im Zentrifugenglas 3 mal mit Wasser und einmal mit alkoholhaltigem Wasser wuschen. Das trockene, orangefarbene, in feiner Verteilung gelbe Pulver (120 mg = 17.7% d. Th.) wurde 3 mal mit wenig trockenem Aceton und einmal mit trockenem Äther gewaschen, dann in 1 ccm reinem Pyridin gelöst und mit 7 ccm Wasser versetzt. Beim Anreiben kristallisierte das Osazon sofort in feinen gelben Nadeln, die einen dichten Niederschlag bildeten. Wir kühlten einige Zeit auf 0°, fügten noch 2 ccm Wasser hinzu, saugten ab und wuschen den Niederschlag zuerst mit wenig eiskaltem Pyridin-Wassergemisch 1:9, dann mit kaltem Wasser. Das exsiccatorgetrocknete Osazon wog 60 mg und schmolz bei 190° (Zers.) (Kupferblock auf 175° vorgeheizt). Helferich<sup>9</sup>) gibt 188–189° (Zers.) an. Der Misch-Schmp. mit authentischem Allolactose-phenylosazon lag bei 189–190°. Die Debye-Scherrer-Aufnahmen waren identisch. Zur Analyse wurde 48 Stdn. bei 80° über Diphosphorpentoxid i. Hochvak. getrocknet.



200 mg 6- $\beta$ -D-Galaktopyranosyl-*N*-acetyl-D-glucosamin (chemisch synthetisiert) wurden mit 264 mg 4-Amino-diphenyl (3fach molarer Überschuß) und 5 mg Ammoniumchlorid in 20 ccm absol. Methanol 4 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Da-

<sup>24)</sup> Jodometrisch nach M. Macleod u. R. Robison, Biochem. J. 23, 517 [1929].

nach ließen wir  $\frac{2}{3}$  des Methanols abdestillieren und ersetzten es durch absoluten Äthanol. Nach weiteren 4 Std. wurde auch der Rest des Methanols, zugleich mit dem bei der Reaktion gebildeten Wasser, auf folgende Weise durch absoluten Äthanol ersetzt. Wir fügten 2 ccm trockenes Benzol zur Lösung und destillierten bei abgestelltem Kühlwasser durch den als Kolonne wirkenden Rückflußkühler solange Lösungsmittel ab, bis die Temperatur des oben entweichenden Dampfes 78° betrug. Hierbei füllten wir gelegentlich absoluten Äthanol nach. Die Operation dauerte 1 Stunde. Nach einer weiteren  $\frac{1}{2}$  Stde. dampften wir die Lösung auf 5 ccm ein und füllten das *N*-Glykosid mit 4 Vol.-Tin. trockenem Äther. Das schwach bräunliche amorphe hygroskopische Pulver wog 193 mg (69% d.Th.). Es wurde nochmals aus Alkohol/Äther umgefällt, enthielt dann 5.63% N (ber. für  $C_{28}H_{46}O_{10}N_2$  5.24) und wurde in 2 ccm trockenem Pyridin mit 2 ccm Acetanhydrid 18 Std. bei 20° acetyliert. Wir verrieben das Acetylierungsprodukt gut mit Eiswasser und trockneten es im Exsiccator (Ausb. 80% d.Th.). Aus etwa 300 Teilen heißem Tetrachlorkohlenstoff erhielten wir das peracetylierte *N*-Glykosid beim Abkühlen in farblosen, schönen rosettenförmig zusammengelagerten Nadelchen oder in länglichen, stumpfwinklig zugespitzten Plättchen. Sie wurden noch zweimal umkristallisiert und schmolzen dann bei 192–194° nach vorhergehendem Sintern bei 183° (Schmelzpunkt mikroskop!).



Ein aus enzymatisch gewonnenem Disaccharid auf gleiche Weise hergestelltes Präparat war nach Schmp., Debye-Scherrer-Diagramm und IR-Spektrum hiermit identisch. Der Misch-Schmp. war – bei sehr vorsichtigem Erhitzen im Sinterbereich – nicht erniedrigt. Der Sinterpunkt, nicht der Schmp., ist stark von der Verteilung des Materials abhängig. Nur die größer kristalline Substanz sinterbar bei 182–183°, während wir nach feinem Zerreiben in der Achatschale Erniedrigung bis zu 10° beobachteten, bei der Mischprobe sowohl als auch bei den einzelnen Komponenten.

Das peracetylierte *N*-Glykosid ist sehr schwer löslich in kaltem, schwer in heißem Tetrachlorkohlenstoff, etwas leichter bei Zusatz von 5% Äthanol. Es löst sich erst in etwa 300 Teilen kaltem Methanol und nur mäßig in kaltem, leicht in heißem Benzol. Aceton, Äthylacetat, Pyridin und Chloroform lösen schon in der Kälte leicht.  $[\alpha]_D^{22} : -64.5^\circ$  ( $c = 0.5$  in Chloroform).

#### Enzymatische Synthese der Allolactose (VI); Identifizierung als Phenylsazon (V)

1.80 g  $\alpha$ -D-Glucose (0.01 Mol) und 2.56 g  $\beta$ -Phenyl- $\alpha$ -galaktosid wurden mit 500 mg unseres Enzympräparates in insgesamt 30 ccm Wasser unter Zusatz von etwas Toluol 4 Std. auf 35° erwärmt. Die Aufarbeitung erfolgte wie bei der oben beschriebenen enzymatischen Synthese des Galaktosido-*N*-acetyl-glucosamins. Im Reaktionsgemisch ließen sich alsdann papierchromatographisch nachweisen: etwas Galaktose sowie viel Glucose und in vergleichbarer Menge ein Zucker, der ebenso schnell wanderte wie authentische Allolactose ( $R_{Lactose}$  0.80). Nur in Spuren waren mehrere andere Produkte zu erkennen, darunter auch die Galaktobiose vom  $R_{Lactose}$ -Wert 0.70. Da wir hoffen durften, die Allolactose als Osazon von den anwesenden Monosacchariden abtrennen und identifizieren zu können, verzichteten wir auf eine säulenchromatographische Isolierung.

**Allolactose-phenylsazon:** Die auf 70 ccm gebrachte wäßrige Lösung wurde mit 10 g Phenylhydrazin-hydrochlorid und 10 g Natriumacetat erhitzt, nach einigen Min. mit etwas Tierkohle filtriert und insgesamt 1.5 Std. weitererhitzt. Schon nach den ersten 10 Min. begann sich reichlich gelbes krist. Monose-Osazon abzuscheiden, das nach Beendigung der Reaktion heiß abgesaugt und mit heißem Wasser gewaschen wurde. Beim Erkalten schieden sich nunmehr Kristalle ab, die größtenteils aus Birose-Osazon bestanden, jedoch auch noch Monose-Osazon enthalten haben. Sie wurden nach einigem Stehenlassen bei 0° abgesaugt und 2 mal aus je 100 ccm heißem Wasser umkristallisiert. Beim erstenmal blieb dabei ziemlich viel Osazon (Monose!) ungelöst und wurde verworfen; beim zweitenmal löste sich alles. Das so erhaltene Kristallisat wurde in 3 ccm reinem Pyridin aufgenommen. Beim Zufügen von 24 ccm Wasser kristallisierten daraus 260 mg (5% d. Th.) feiner gelber Nadeln, die wir zur Analyse nochmals aus Pyridin-

Wasser umkristallisierten. Schmp. und Misch-Schmp. mit authentischem Allolactose-phenylosazon waren  $192^\circ$  (Kupferblock auf  $175^\circ$  vorgeheizt). Die Debye-Scherrer-Aufnahmen waren identisch.

Zur Analyse trockneten wir das Osazon 24 Stdn. bei  $80^\circ/3$  Torr über Diphosphor-pentoxid.

$C_{24}H_{32}O_9N_4$  (520.5) Ber. C 55.37 H 6.20 N 10.77 Gef. C 55.25 H 6.52 N 11.16

Stdn.	0.2	0.25	2	6	8	18	30	
$[\alpha]_D^{25}$	$-71^\circ$		$-60^\circ$		$-52^\circ$	$-40^\circ$	$-32^\circ$	konst. $c = 1$ in Pyridin
$[\alpha]_D^{25}$		$-68^\circ$	$-58^\circ$	$-52^\circ$		$-40^\circ$	$-32^\circ$	konst. $c = 0.5$ in „

Man erhält bei der Darstellung von Phenylsazonen aus reinen Zuckern im allgemeinen Ausbeuten zwischen 40 und 60% d. Th., nur unter besonders günstigen Umständen auch mehr. Aus Gemischen jedoch darf man wohl höchstens die Hälfte oder ein Drittel davon erwarten. Die enzymatische Synthese der Allolactose muß daher mit einer Ausbeute von etwa 20 bis 40% d. Th. erfolgt sein.

#### 246. Reinhard Nast und Erhard Sirtl: Alkyloverbindungen von Übergangsmetallen, III. Mitteil.<sup>1)</sup>: Hexaalkylokomplexe von Chrom(III)

[Aus der II. Anorganischen Abteilung des Chemischen Instituts der Universität Heidelberg]

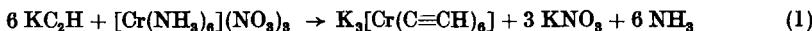
(Eingegangen am 8. August 1955)

Durch Umsetzung einer Lösung von  $[\text{Cr}(\text{NH}_3)_6](\text{NO}_3)_3$  in flüssigem Ammoniak mit  $\text{KC}\equiv\text{CH}$  unter völligem Feuchtigkeitsausschluß wird das orangefarbene paramagnetische Kalium-hexääthinylo-chromat(III),  $\text{K}_3[\text{Cr}(\text{C}\equiv\text{CH})_6]$ , rein dargestellt. Die Eigenschaften dieser explosiven, hygroskopischen Verbindung werden beschrieben.

Die Existenz eines analogen Propinylokomplexes,  $\text{K}_3[\text{Cr}(\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_3)_6]$ , wird wahrscheinlich gemacht.

Kürzlich wurde gezeigt, daß einwertige Anionen von Alkinen des Typs  $[\text{C}\equiv\text{C}-\text{R}]^\ominus$  ( $\text{R} = \text{H}, \text{CH}_3, \text{C}_6\text{H}_5$ ) als „weiche“, deformierbare Liganden mit Nickel Durchdringungskomplexe bilden, die nach Formeltyp und äußerem Habitus den Cyanokomplexen dieses Metalls gleichen<sup>1)</sup>. Die vorliegende Untersuchung hatte die Darstellung solcher Alkylokomplexe von Chrom(III) zum Ziel.

Eine Reihe orientierender Versuche ergab, daß eine Lösung von Äthinylkalium in flüssigem Ammoniak mit einer Lösung von Hexammin-chrom(III)-nitrat im gleichen Medium im Mol.-Verh. 6.5:1 gemäß Gl. (1)



bei  $-35^\circ$  unter Bildung einer tieforangefarbenen, kolloidalen Lösung reagiert, die beim Kühlen auf  $-75^\circ$  das orangefarbene Kalium-hexääthinylo-chromat(III) ausfallen läßt.

Der reine, stark hygroskopische Komplex, der lediglich noch geringfügige Mengen schwer entfernbarer Ammoniaks enthält, detoniert bei Berührung

<sup>1)</sup> II. Mitteil.: R. Nast u. K. Vester, Z. anorg. allg. Chem. 279, 146 [1955].