

CHEMISCHE BERICHTE

Fortsetzung der

BERICHTE DER DEUTSCHEN CHEMISCHEN GESELLSCHAFT

89. Jahrg. Nr. 9

S. 2013 - 2214

289. Richard Kuhn und Reinhard Brossmer: Über *O*-Acetyl-lactaminsäure-lactose aus Kuh-Colostrum und ihre Spaltbarkeit durch Influenza-Virus

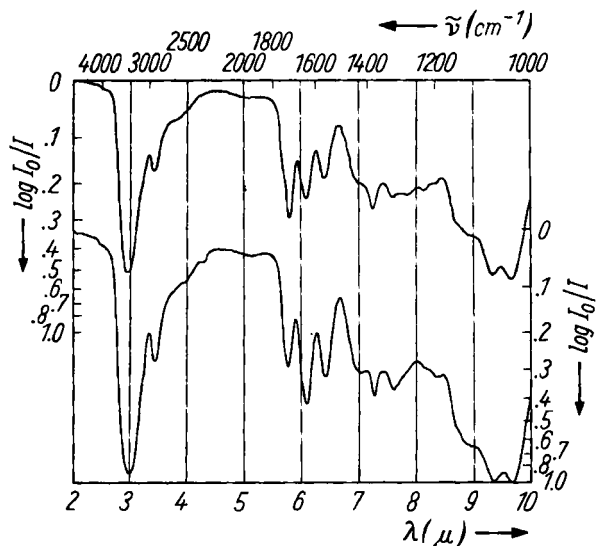
[Aus dem Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung,
Institut für Chemie, Heidelberg]
(Eingegangen am 8. März 1956)

In den niedrigmolekularen, dialysierbaren Anteilen von Kuhmilch und Frauenmilch sowie im Colostrum der Frau und verschiedener Tiere findet sich eine mit *p*-Dimethylamino-benzaldehyd (Ehrlich-Aldehyd) farbstoffliefernde Substanz vom R_{Lactose} -Wert 0.46. Die aus Kuh-Colostrum isolierte Substanz verliert durch verd. Alkali äußerst leicht 1 Acetylgruppe und wird durch sehr verdünnte Säuren schon in der Kälte in 1 Mol. Lactose + 1 Mol. Essigsäure + 1 Mol. Lactaminsäure gespalten. Durch Influenza-Virus sowie durch das receptor destroying enzyme (RDE) aus Cholera-Vibrionen werden Lösungen der *O*-Acetyl-lactaminsäure-lactose von p_{H} 6, die stabil sind, unter Freisetzung des Zuckers und der N-haltigen Spaltsäure hydrolysiert.

Die wesentlichen Schritte, die zur Isolierung der *O*-Acetyl-lactaminsäure-lactose¹⁾ geführt haben, sind Entrahmung, Dialyse, Adsorption an Kohle und Reinigung an MIH-Austauschersäulen. Bei der im Versuchsteil ausführlich mitgeteilten Vorschrift sollen die verhältnismäßig engen p_{H} -Grenzen, niedrigen Temperaturen und in manchen Stadien kurzen Arbeitszeiten möglichst eingehalten werden, damit die *O*-Acetylgruppe nicht teilweise oder ganz verloren geht. Der R_{Lactose} -Wert der Ehrlich-positiven Substanz von 0.46 (Pyridin: Essigester: Eisessig: Wasser = 5:5:1:3) ist wegleitend, aber er bietet keine Gewähr für die Unversehrtheit, da die unter Verlust des *O*-Acetyls entstehende Lactaminsäure-lactose nahezu denselben R_{Lactose} -Wert zeigt. Eine sichere Beurteilung des präparativen Ergebnisses wird erst ermöglicht durch Acetylbestimmung, *C*-Methylbestimmung, sowie durch das IR-Spektrum der schließlich isolierten Substanz. Bei gelungener Darstellung findet man auf 1 N-Atom 2 Acetylgruppen und im IR-Spektrum die Bande bei 5.8μ (Ester-carbonyl-Bande) viel stärker als die Bande bei 6.1μ (Säureamid-Bande). In dem Maße als *O*-Acetyl verloren geht, wird die Bande bei 5.8μ schwächer und schließlich viel schwächer (Absorption der Carboxylgruppe) als diejenige bei 6.1μ (Abbild. 1).

Aus 16 l Kuh-Colostrum sind 3.6 bis 4.6 g reine *O*-Acetyl-lactaminsäure-lactose erhältlich. Die durch rasche Gefriertrocknung gewonnene Substanz stellt ein rein weißes, lockeres Pulver dar, das sich in Wasser mit stark saurer Reaktion spielend löst. Eine 1-proz. Lösung zeigt $p_{\text{H}} \sim 2$ und $[\alpha]_{\text{D}}^{20} : +16^{\circ}$. Die 1-proz. wäßrige Lösung ist bei Raumtemperatur nicht beständig; nach

¹⁾ R. Kuhn u. R. Brossmer, Angew. Chem. 68, 211 [1956].



Abbild. 1. IR-Spektren. *O*-Acetyl-lactaminsäure-lactose (obere Kurve); Lactaminsäure-lactose (untere Kurve)

2 Tagen ist etwa die Hälfte der Substanz unter Abspaltung von Lactose zerfallen (Papierchromatographie). Im Laufe der „Eigenhydrolyse“ sinkt das Drehungsvermögen nur wenig ab, um bei $+12^\circ$ konstant zu werden. Der nach der Gleichung *O*-Acetyl-lactaminsäure-lactose + 2 H₂O → Lactose + Essigsäure + Lactaminsäure entstehende Milchzucker ($[\alpha]_D^{21} : +52^\circ$) dreht stärker rechts und die gebildete Lactaminsäure ($[\alpha]_D^{21} : -31^\circ$ bis -32°) stärker links als die Ausgangssubstanz, wodurch sich die geringe Drehungsänderung während der Hydrolyse erklärt. Die Substanz gibt starke Bial-Reaktion. Die direkte Farbstoffbildung mit *p*-Dimethylamino-benzaldehyd erfolgt bei der *O*-Acetyl-lactaminsäure-lactose, wenn man auf 95° erwärmt, innerhalb von ~ 3 Minuten. Bei längerem Erwärmen nimmt die Farbstärke zu. Beim Erhitzen mit $2n$ HCl tritt rasch Huminbildung ein.

Die durch „Eigenhydrolyse“ gebildete Lactose ließ sich in guten Ausbeuten kristallisiert gewinnen und weder im Schmelzpunkt und Misch-Schmelzpunkt (198 – 199°) noch im IR-Spektrum und den Debye-Scherrer-Linien von gewöhnlichem Milchzucker unterscheiden.

Für das Vorhandensein von 2 Acetylgruppen sprechen nicht nur die mit *p*-Toluolsulfonsäure ausgeführten Acetylbestimmungen. Wir haben *O*-Acetyl-lactaminsäure-lactose mit Chromsäure oxydiert und durch Neutralisation der dabei entstehenden flüchtigen Säure 2.0 Moll. krist. Natriumacetat vom Schmp. 318 – 319° erhalten, das nach Misch-Schmp. und IR-Spektrum mit gewöhnlichem Natriumacetat identisch war. Elementaranalysen und IR-Spektrum sprechen gegen das Vorhandensein auch nur geringer Mengen einer anderen flüchtigen Säure.

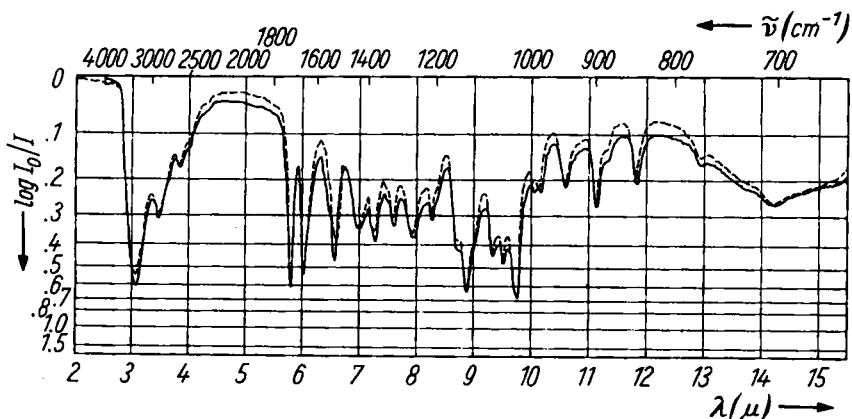
Unter der Einwirkung sehr verd. Natronlauge oder von Barytwasser wird schon in der Kälte die *O*-Acetylgruppe abgespalten, während die *N*-Acetylgruppe und die Verknüpfung mit der Lactose intakt bleiben. In Methanol wird durch Diazomethan die *O*-Acetylgruppe durch Methoxyl ersetzt und gleichzeitig die Carboxylgruppe verestert, so daß man eine neutral reagierende Dimethoxy-acetamino-Verbindung erhält. Die Hydrierung mit Palladiumoxyd-hydrat/Bariumsulfat ergab eine Substanz, die alkalische Kupfersulfatlösung nicht mehr reduzierte, mit Anilinhydrogenphthalat keine Reaktion gab, sich gegen salzsaure Dimethylaminobenzaldehyd-Lösung aber noch genau so verhielt wie die Ausgangssubstanz. Bei der alkalimetrischen Bestimmung des Äquivalentgewichts verhält sich die *O*-Acetyl-lactaminsäure-lactose, wie wenn auf 1 N-Atom 2 saure titrierbare Gruppen vorhanden wären. Es spricht jedoch alles dafür, daß es sich um eine einbasische Säure handelt und daß das 2. Mol. Alkali zur Neutralisation der Essigsäure dient, die durch Verseifung der labilen *O*-Acetylgruppe in Freiheit gesetzt wird. Diese Erklärung stützt sich unter anderem darauf, daß die nach Einwirkung von verd. Barytwasser isolierte Lactaminsäure-lactose eine einbasische Säure ist.

Das bei der „Eigenhydrolyse“ auftretende N-haltige Spaltstück kristallisiert aus 90-proz. Essigsäure in farblosen feinen Prismen vom Schmp. 178 bis 179° (Zers.), die linksdrehend sind: $[\alpha]_D^{21} : -31^\circ$ bis -32° (Wasser). Es handelt sich um eine einbasische Säure mit einer Acetaminogruppe, die Fehlingsche Lösung reduziert und nach Willstätter-Schudel 2 Moll. Hypojodit verbraucht. Direkte Ehrlich-Reaktion tritt beim Erwärmen ein. Erhitzt man die N-haltige Spaltsäure erst einige Minuten mit $n/_{10}$ NaOH auf 100° und gibt nach dem Erkalten das Ehrlich-Reagens zu, so erfolgt schon in der Kälte Farbstoffbildung.

Bevor unsere Untersuchung der niedrigmolekularen Ehrlich-positiven Substanzen der Milch bis zur N-haltigen Spaltsäure geführt hatte, hatten wir bereits erkannt, daß die aus den hochmolekularen, undialysierbaren Mucoproteinen des Kuh-Colostrums kristallisiert erhaltene Methoxyverbindung der Lactaminsäure²⁾ einen leicht verseifbaren Methylester darstellt. Wurde nämlich diese Methoxyverbindung im Zeisel-Kölbchen zunächst mit etwas $n/_{10}$ NaOH gelinde erwärmt und dann i. Vak. zur Trockne gebracht, so fiel die anschließende Methoxylbestimmung negativ aus. Durch präparative Verseifung mit Barytwasser bei $\sim 20^\circ$ ließ sich die freie Lactaminsäure gewinnen, die aus 90-proz. Essigsäure in feinen farblosen Prismen vom Schmp. 177 bis 179° kristallisierte. Der Misch-Schmelzpunkt mit der aus den niedrigmolekularen Anteilen des Colostrums isolierten Spaltsäure ergab keine Depression. Die Übereinstimmung der IR-Spektren ist aus Abbild. 2, diejenige der Röntgenogramme aus Abbild. 3 ersichtlich. Auf diese Identifizierung, auf die Isolierung von krist. Lactose und auf die Gewinnung von 2 Moll. krist. Natriumacetat stützt sich der von uns gebrauchte Name *O*-Acetyl-lactaminsäure-lactose.

Die sehr nahe Übereinstimmung der R_F -Werte von *O*-Acetyl-lactaminsäure-lactose und von Lactaminsäure-lactose erschwert eine Stellungnahme zu der

²⁾ R. Kuhn, R. Brossmer u. W. Schulz, Chem. Ber. 87, 123 [1954].



Abbild. 2. IR-Spektren. Lactaminsäure aus *O*-Acetyl-lactaminsäure-lactose ———; Lactaminsäure aus Methoxy-lactaminsäure - - - - -



Abbild. 3. Debye-Scherrer-Aufnahmen. a) Lactaminsäure aus *O*-Acetyl-lactaminsäure-lactose; b) Lactaminsäure aus Methoxy-lactaminsäure

Frage, ob die von R. E. Trucco und R. Caputto³⁾ in Brustdrüsen von Ratten aufgefundene Neuraminlactose (für die keine Acetylbestimmungen mitgeteilt wurden) die natürlich vorkommende *O*-Acetylverbindung war oder die entacetylierte Substanz, zumal 5-proz. Trichloressigsäure zur Enteiweißung angewandt wurde, die nach unseren Erfahrungen schon das *O*-Acetyl abspaltet. Neuraminsäure, die im Gegensatz zu Lactaminsäure eine NH_2 -Gruppe und nicht eine $\text{H}_3\text{C}\cdot\text{CO}\cdot\text{NH}$ -Gruppe enthält, kann nicht als solche Baustein der als Neuraminlactose bezeichneten Verbindung sein. In Frage kommt die Sialinsäure aus Submaxillarisdrüsen vom Schaf von G. Blix⁴⁾ bzw. die Acetyl-neuraminsäure von E. Klenk⁵⁾, für die ein abschließender Vergleich mit Lactaminsäure aussteht. Von geringen Abweichungen in den C, H- und N-Werten und einer noch bestehenden Unsicherheit der Bruttoformeln abgesehen, erscheint uns als auffallender Unterschied zwischen Acetyl-neuraminsäure und Lactaminsäure das Verhalten gegen $n_{10} \text{ NaOH}$ bei 100° (15 Min.). E. Klenk gibt an, daß dabei 0.91 bis 1.06 Moll. Pyrrol- α -carbonsäure aus 1 Mol. Acetyl-neuraminsäure erhalten werden, während wir unter genau gleichen Bedingungen nur geringe Mengen davon aus Lactaminsäure chromatographisch und im UV (Abbild. 4) nachweisen können. Diese und weitere Fragen, wozu auch diejenige der Gynaminsäure⁶⁾ gehört, bedürfen noch der Klärung. Mit großer Wahrscheinlichkeit

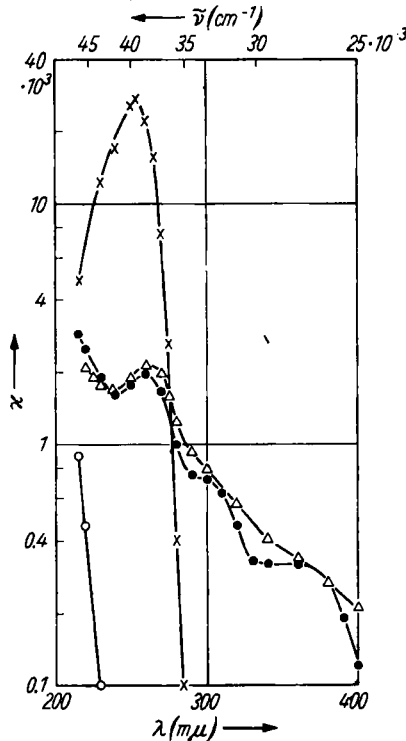
³⁾ J. biol. Chemistry 206, 901 [1954].

⁴⁾ G. Blix, E. Lindberg, L. Odin u. J. Werner, Nature [London] 175, 340 [1955].

⁵⁾ E. Klenk u. H. Faillard, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 298, 230 [1954].

⁶⁾ F. Zilliken, G. A. Braun u. P. György, Arch. Biochem. Biophysics 54, 564 [1955].

ist die labile Acetylgruppe der *O*-Acetyl-lactaminsäure-lactose gleichartig gebunden wie in der von G. Blix⁷⁾ aus den Submaxillaridrüsen von Rindern isolierten Rinder-Sialinsäure, die auch äußerst leicht abspaltbar ist. Das bedeutet, daß die *O*-Acetylgruppe voraussichtlich nicht an der Lactose, sondern an



Abbild. 4. UV-Absorption. $\circ\text{--}\circ\text{--}\circ$ *O*-Acetyl-lactaminsäure-lactose bzw. Lactaminsäure nach 15 Min. Stehenlassen in n_{10} NaOH bei 21° und anschließendem Neutralisieren mit n_{10} HCl; $\triangle\text{--}\triangle\text{--}\triangle$ *O*-Acetyl-lactaminsäure-lactose nach 15 Min. Erhitzen auf 100° in n_{10} NaOH und Neutralisieren; $\bullet\text{--}\bullet\text{--}\bullet$ Lactaminsäure nach 15 Min. Erhitzen auf 100° in n_{10} NaOH und Neutralisieren; $\times\text{--}\times\text{--}\times$ Pyrrhol- α -carbonsäure (synthetisch), gelöst in Äthanol.

x_{\max} *O*-Acetyl-lactaminsäure-lactose : x_{\max} Pyrrhol- α -carbonsäure $\sim 1:12$
 x_{\max} Lactaminsäure : x_{\max} Pyrrhol- α -carbonsäure $\sim 1:13$

$$x = \frac{2.30}{c \cdot d} \log_{10} \frac{I_0}{I} \quad (c \text{ in Mol/l, } d \text{ in cm})$$

Mol.-Gewichte, die zur Berechnung angenommen wurden: 706 für *O*-Acetyl-lactaminsäure-lactose, 339 für Lactaminsäure

der N-haltigen Komponente haftet, da ja die Rinder-Sialinsäure weder Glucose noch Galaktose noch sonst einen N-freien, hydrolytisch abspaltbaren Zucker enthält. Man beachte, daß Rinder-Sialinsäure und Kuh-Colostrum vom selben Tier stammen. Es wird daher von Interesse sein zu prüfen, ob bei denjenigen

⁷⁾ Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 240, 43 [1936].

Tieren, deren Speicheldrüsen wie diejenigen des Menschen oder des Schafes *O*-acetylfreie Sialinsäure geliefert haben, auch in der Milch *O*-acetylfreie Ehrlich-positive Lactose-Derivate vorkommen oder ob nur in manchen Fällen die *O*-Acetylgruppe besonders leicht verloren geht. Aus 6 l Frauen-Colostrum konnte ein Präparat gewonnen werden, in dessen IR-Spektrum die Banden bei 5.8μ und 6.1μ gleich stark waren, das also *O*-Acetyl enthielt. Die Untersuchung der Colostren verschiedener Tiere ist noch nicht abgeschlossen.

Unabhängig voneinander fanden 1941 G. K. Hirst⁸⁾ sowie L. McClelland und R. Hare⁹⁾, daß Influenza-Virus die Eigenschaft besitzt, Erythrocyten zu agglutinieren. Die genaue Beobachtung des Verlaufs dieser Reaktion führte zu der Vorstellung eines Enzym-Substrat-Geschehens. Bald darauf konnten F. M. Burnet¹⁰⁾ und seine Schule nachweisen, daß viele Mucine menschlichen und tierischen Ursprungs unter Verlust ihrer biologischen Wirksamkeit die Haemagglutination – hervorgerufen durch Virus – zu hemmen vermögen. In den folgenden Jahren entdeckte A. Gottschalk¹¹⁾ die Spaltbarkeit von Ehrlich-positiven, die Haemagglutination stark hemmenden Mucoproteinen durch Influenza-Virus. E. Klenk¹²⁾ ist es gelungen, die so aus Harnmucin, das eine hohe Hemmwirkung besitzt, abgespaltene niedrigmolekulare, Ehrlich-positive Substanz kristallisiert zu gewinnen und als *N*-Acetyl-neuraminsäure zu charakterisieren. Auch das receptor destroying enzyme (RDE), das F. M. Burnet¹³⁾ aus Kulturfiltraten von *vibrio cholerae* gewann, ist in der Lage, Mucine auf dieselbe Art zu spalten. Bisher waren alle Ehrlich-positiven Substrate, die Spaltungen mit Virus-Enzym bzw. RDE gestatteten, hochmolekular. Wir fanden jedoch, daß auch die niedrigmolekulare *O*-Acetyl-lactaminsäure-lactose durch Influenza-Virus B (Lee) bei $p_H \sim 6$ unter Freisetzung von Zucker und *O*-Acetyl-lactaminsäure bzw. Lactaminsäure leicht und quantitativ gespalten wird. RDE hatte dieselbe Wirkung. Die Art der chemischen Bindung zwischen Ehrlich-positiver prosthetischer Gruppe und Trägersubstanz in den Mucinen ist nicht bekannt. In unserem Fall ist das Substrat der Enzymreaktion eine definierte Verbindung mit niedrigem Molekulargewicht. Ihre Konstitutionsaufklärung verspricht daher einen Einblick in die chemische Natur der Bindungen, die vom Virus enzymatisch gelöst werden.

Hrn. W. Lochinger danken wir für eifrige Unterstützung der präparativen Arbeit, Hrn. K. Löscher für die Beschaffung von Kuh-, Schaf-, Ziegen- und Schweine-Colostrum und Hrn. R. Stephan für einen Teil der kolorimetrischen Bestimmungen. Besonderen Dank schulden wir Hrn. Regierungsrat Dr. G. A. Kausch für seine Unterstützung bei den Virus-Fermentversuchen.

⁸⁾ Science [New York] **94**, 22 [1941]. ⁹⁾ Canad. J. pub. Health **32**, 530 [1941].

¹⁰⁾ F. M. Burnet, J. F. McCrea u. S. G. Anderson, Nature [London] **160**, 404 [1947].

¹¹⁾ A. Gottschalk u. P. E. Lind, Nature [London] **164**, 232 [1949]; A. Gottschalk, ebenda **167**, 845 [1951].

¹²⁾ E. Klenk, H. Faillard u. H. Lempfrid, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **301**, 235 [1955].

¹³⁾ F. M. Burnet, J. F. McCrea u. J. D. Stone, Brit. J. exp. Pathol. **27**, 228 [1946]; F. M. Burnet u. J. D. Stone, Austral. J. exp. Biol. med. Sci. **25**, 227 [1943].

Beschreibung der Versuche

Der Gehalt an niedrigmolekularen, dialysierbaren, Ehrlich-positiven Substanzen in Milch und Colostrum verschiedener Herkunft wurde kolorimetrisch mit der direkten Ehrlich-Reaktion (ohne Alkali-Vorbehandlung) bestimmt. 0.1–0.8 ccm des Dialysats wurden mit einer 0.75-proz. Lösung von *p*-Dimethylamino-benzaldehyd in 2*n*HCl auf 4 ccm gebracht und 15 Min. auf 95° erhitzt. Nach Abkühlen in fließendem Wasser (3 Min.) wurde die Farbintensität im Pulfrich-Photometer (Filter S43) gegen eine gleichbehandelte Lösung von salzsaurem *p*-Dimethylamino-benzaldehyd gemessen.

Herkunft	Milch mg/100 ccm; bezogen auf <i>O</i> -Acetyl- lactaminsäure-lactose	Colostrum
Frau	50–60	55–70
Kuh	3–6	30–90
Schaf	28–35	60–85
Schwein	nicht bestimmt	65–85

Neben der Substanz mit dem $R_{Lactose}$ -Wert 0.46 lassen sich auf den Papierchromatogrammen noch mehrere andere, Ehrlich- und Anilinhydrogenphthalat-positive Substanzen mit geringeren $R_{Lactose}$ -Werten nachweisen. Das Mengenverhältnis dieser Stoffe ist in den einzelnen Milchen verschieden.

Isolierung: Je 16 l Kuh-Colostrum (vom 1. Tag nach der Geburt, frisch oder in gefroretem Zustand gesammelt) werden entrahmt (Stock-Zentrifuge, 3000 U/Min. etwa 30 Min.). Nach dem Zentrifugieren stellt man die Becher für mehrere Stunden in den Kälteraum (etwa +4°), wobei die obere fetthaltige Schicht (durchschnittlich 2 l) so fest wird, daß sie sich leicht abheben läßt. Das Mager-Colostrum wird von dem am Boden der Becher befindlichen Sediment abgegossen und bei +4° in Cellophanschläuchen (Durchmesser 20 mm) gegen 50 l dest. Wasser 24 Stdn. dialysiert. Außen- und Innenlösung sind dabei von einer Toluolschicht bedeckt. Mit frischem Außenwasser wird die Dialyse 2 mal je 24 Stdn. wiederholt. Dann sind nur noch etwa 5% der gesuchten Substanz in der Innenlösung.

Die etwa 150 l Außenlösung werden bei einer 30° niemals überschreitenden Temperatur i. Vak. auf etwa 5 l eingengt. Die überstehende, stark lactoflavin-haltige gelbe Lösung hat p_H etwa 6. Man versetzt sie mit dem gleichen Volumen Äthanol, läßt über Nacht bei +4° stehen und saugt den gebildeten Niederschlag in der Kälte ab (etwa 45 g). Die wäßrig-alkoholische Lösung wird nun i. Vak. bei einer Temperatur, die 30° nicht übersteigen darf, soweit eingengt und unter Zugabe von je 2 l dest. Wasser noch mehrmals eingengt, bis das Äthanol nahezu ganz verjagt ist. Endvolumen etwa 3 l.

Für die folgende Adsorption verwenden wir Carboraffin (Bayer, Leverkusen), von dem soviel angewandt wird, daß 90–95% der Ehrlich-positiven Substanzen adsorbiert werden. Die dazu erforderliche Kohlenmenge ist in Vorversuchen zu ermitteln, da verschiedene Chargen von Carboraffin recht unterschiedliches Adsorptionsvermögen zeigen. Von einer guten Charge genügen 900–1000 g pro Ansatz, doch kommt es vor, daß durch diese Menge nur 30 oder 50% der Ehrlich-positiven Substanzen adsorbiert werden. Eine Vorbehandlung des Carboraffins mit 20-proz. heißer Essigsäure ist bei guten Chargen nicht unbedingt nötig. Ist mehr als die angegebene Kohlenmenge erforderlich, so müssen die 3 l der gelben Lösung noch mit Wasser verdünnt werden, um einen dünnen rührbaren Brei zu erhalten. Die Adsorption verläuft langsamer als die der Lactose. Man rührt mit einem starken elektrischen Rührwerk 4–6 Stdn. bei 20°.

Das Kohleadsorbat, das sich gut abnutschen läßt, wäscht man auf der Nutsche solange mit 60–70° warmem dest. Wasser, bis die Hauptmenge der Lactose entfernt ist und das Waschwasser Fehlingsche Lösung nur noch schwach reduziert. Dazu sind etwa 30 l erforderlich. Ehrlich-positive Substanzen gehen in das Waschwasser nicht. Nach dem Erkalten wird der Kohlekuchen noch auf der Nutsche mit 25 l kaltem 8-proz. Äthanol,

das man ohne zu saugen langsam durchlaufen läßt, gewaschen. Dadurch läßt sich nochmals eine beträchtliche Menge Ehrlich-negativer, aber Fehling-positiver Substanz abtrennen. Die Elution, die auf der Nutsche durchgeführt wird, beginnt mit 5 l 20-proz. Äthanol bei Zimmertemperatur. Zur Hauptelution dienen 20 l ca. 50-proz. Äthanol (10 l dest. Wasser - 10 l 95-proz. Äthanol, mit 4 Vol.-% Aceton vergällt), das auf 55–60° erwärmt ist. Diese Operation erfordert nahezu 1 Tag. Man verwende nur geringen Unterdruck und Sorge dafür, daß die Oberfläche des Kohlekuchens nie trocken wird. Das Volumen des Kohlekuchens nimmt während des Fluierens beträchtlich zu. Das Eluat ist frei von Lactoflavin und nahezu farblos. Zur Nachelution verwenden wir 5 l des angegebenen ca. 50-proz. Äthanol, dem 10 Vol.-% Methyl-äthyl-keton zugesetzt werden. Auch dieses Gemisch wird warm (55–60°) verwendet. Die Elution gilt als beendet, wenn 3 ccm Eluat + 3 ccm Ehrlich-Reagens bei 15 Min. langsamem Erhitzen im siedenden Wasserbad nur noch eine eben wahrnehmbare Rosafärbung oder keine Färbung mehr geben.

Im Hinblick auf die spätere Reinigung am Kationenaustauscher werden Haupt-eluat + Nach-eluat (das Vor-eluat wird seines viel höheren Lactosegehaltes wegen getrennt von Haupt- und Nach-eluat, aber auf dieselbe Weise weiter verarbeitet), nachdem man diese vereinigt und i. Vak. bei einer 20° nicht übersteigenden Temperatur auf 200 bis 300 ccm eingengt hat, von Chlorionen, Sulfationen, Phosphationen u. a. befreit. Würden nämlich noch Chloride, Sulfate usw. über den Austauscher geschickt, so würde bei der anschließenden Gefriertrocknung durch die gebildete Salzsäure bzw. Schwefelsäure usw. die Substanz zerstört werden. Zur Fällung der Chloride, Sulfate usw. verwenden wir eine wärmegesätt. Lösung von Silberacetat und eine 15-proz. Lösung von Bariumacetat. Die erforderlichen Mengen sind je nach der Beschaffenheit der verarbeiteten Colostren recht verschieden (50–80 ccm Silberacetat, 30–50 ccm Bariumacetat). Man gibt beide Lösungen kurz hintereinander zu und läßt über Nacht bei +4° absitzen. Man prüft auf Vollständigkeit der Fällung und filtriert durch ein Faltenfilter.

Zur Entfernung der Calciumionen und anderer Kationen benützen wir den Kationenaustauscher Amberlite IR 120 in einer Säule von 50 cm (Länge der Füllung) und 1.5 cm Durchmesser. Er wird vor Gebrauch in der H⁺-Form mit dest. Wasser neutral gewaschen und hält keine Ehrlich-positive Substanz zurück. Man wäscht die Säule, bis keine Ehrlich-positive Substanz mehr kommt (500–600 ccm dest. Wasser), engt i. Vak. bei einer Temperatur, die unter 20° liegen soll, rasch auf etwa 50 ccm ein und unterwirft sofort der Gefriertrocknung. Der p_{H} -Wert der eingengten Lösung liegt bei p_{H} 2.0 bis 2.5. Aus diesem Grunde muß die Temperatur beim Einengen so niedrig wie möglich gehalten werden, und jedes unnötige Stehenlassen der Lösung bei Raumtemperatur ist zu vermeiden. Die Ausbeute an gefriergetrocknetem Produkt beträgt beim Vor-eluat 3–5 g, beim vereinigten Haupt- und Nach-eluat 8–12 g. Der Gehalt an O-Acetyl-lactaminsäure-lactose, kolorimetrisch bestimmt, liegt bei 0.3–0.5 g bzw. 6–8 g. Die Ausbeute ist am besten, wenn man Colostrum der ersten Melkung nach der Geburt, das vielfach noch bluthaltig und von honigartiger Konsistenz ist, verarbeitet. Am 2. und 3. Tag nach der Geburt sinkt der Gehalt bereits ab. Einflüsse der Rasse der Kühe, der Art des Futters und der Jahreszeit scheinen nicht groß zu sein. Wohl aber wurde mehrfach festgestellt, daß Kühe, die auf hohe Milchleistung gebracht waren und nach der Geburt besonders viel Colostrum lieferten, geringere Ausbeuten an O-Acetyl-lactaminsäure-lactose je l Colostrum gaben.

Zur Abtrennung der Lactose und geringer Mengen von weiteren Kohlenhydraten und Salzen schließt sich eine Chromatographie an Austauscherharz an. Wir verwenden den schwach basischen Anionenaustauscher Lewatit MIH (Bayer, Leverkusen). Das Harz wird zunächst in der Reibschale zerrieben und dann durch ein Sieb mit der Maschenweite 0.4 mm gegeben. Die durchgehenden Harzanteile läßt man mit dem doppelten Volumen dest. Wasser 12 Stdn. quellen. Es empfiehlt sich, den feinen Harzstaub mehrmals wegzuschlämmen; er würde bei der Chromatographie die Säule verstopfen. Vor Verwendung des Austauschers ist eine gründliche Reinigung notwendig. Das gequollene Harz wird je 4 mal mit dem dreifachen Volumen 2*n* HCl bzw. 2*n* NaOH bei Zimmertemperatur einige Stunden stehengelassen. Zwischen den einzelnen Wechseln soll mit

dest. Wasser bis p_H 5–5.5 (nur noch Trübung mit $AgNO_3$) bzw. bis p_H 7 gewaschen werden. Die Überführung des Austauschers von der Hydroxyl- in die Acetatform, die sich zur schonenden Chromatographie am besten bewährt, geschieht mit einer 2 *m* Natriumacetat-Lösung in der luftblasen-frei gefüllten Säule. Das Ende der Beladung ist an der Reaktion des abfließenden Wassers von $p_H \sim 6$ zu erkennen.

Chromatographie: Zur Adsorption von etwa 5 g Rohprodukt verwenden wir im Durchschnitt eine Austauschersäule von 2.8 × 67 cm (Länge der Füllung). Die Lösung der Substanz in 50 ccm Wasser tropft langsam (10 Tropfen/Min.) durch die Säule. Die Ehrlich-positiven Substanzen werden vollständig festgehalten. Anschließend wird mit dest. Wasser gewaschen, bis bei der Probe auf Zucker mit Dinitrobenzol keine Violettfärbung mehr auftritt. Dazu sind 1000–1500 ccm Wasser notwendig. Die Elution schließt man sofort an. Sie erfolgt mit etwa 1000 ccm 0.05 *m* Natriumacetat-Lösung (ca. 40 Tropfen/Min.). Danach ist die Ehrlich-Reaktion mit 0.5 ccm Eluat nur noch schwach positiv. Mit 500 ccm 0.1 *m* Natriumacetat-Lösung läßt sich noch eine geringe Menge Ehrlich-positiver Substanz gewinnen, ebenso mit 0.5 *m* Natriumacetat-Lösung. Die beiden letzten Eluate zeigen fast immer noch ein bis zwei weitere Ehrlich- und Anilinhydrogenphthalat-positive Substanzen mit dem $R_{Lactose}$ -Wert 0.22 und langsamer (Pyridin: Essigester: Eisessig: Wasser = 5:5:1:3), die wir noch nicht näher untersucht haben.

In den einzelnen Natriumacetat-Eluaten werden – wenn notwendig – mit warm gesättigter Silberacetat- und konz. Bariumacetat-Lösung Chlorid und Sulfat gefällt (manchmal Trübung bis geringer Niederschlag). Die abfiltrierten bzw. abgenutzten Lösungen werden durch eine IR-120-Säule (in H^+ -Form) von Kationen befreit und i. Vak. bei einer Temperatur der Lösung unter 20° eingengt. Die Gefriertrocknung des Konzentrats (15–20 ccm, p_H etwa 2) ergibt eine rein weiße, lockere, kaum hygroskopische Substanz. Manchmal zeigt es sich, daß eine Re-chromatographie an einer neuen MIH-Säule notwendig ist. Sie wird von der Adsorption bis zur Gefriertrocknung nach genau derselben Methode durchgeführt. Ausbeute: Stickstoff-freier, neutraler, nicht adsorbierter Anteil 2–2½ g (~98 % Lactose); Eluat mit 0.05 *m* Natriumacetat-Lösung 1.8–2.3 g, die anderen beiden Eluate zusammen 0.2–0.4 g.

Zur Analyse der chromatographisch reinen *O*-Acetyl-lactaminsäure-lactose wurde i. Hochvak. bei 80° über P_2O_5 und KOH 24 Stdn. getrocknet.

$C_{25}H_{41}O_{20}N$ (675.3) Ber. C 44.42 H 6.12 N 2.07 CH_3CO 12.74 C– CH_3 4.45
Äquiv.-Gew. 675.3

$C_{26}H_{43}O_{21}N$ (705.7) Ber. C 44.25 H 6.15 N 1.99 CH_3CO 12.19 C– CH_3 4.25
Äquiv.-Gew. 705.7

Gef. C 43.59 H 6.07 N 2.30 CH_3CO 12.55 C– CH_3 4.19

Äquiv.-Gew. 365 (n_{100} NaOH); 704.6 (Willstätter-Schudel)

Geruchlos. Leicht löslich in Wasser und Methanol, etwas schwerer löslich in Äthanol. $[\alpha]_D^{25}$: +16° ($c = 2$; 1 dm; H_2O). Eine 1-proz. Lösung in Wasser ($p_H \sim 2$) ist bei Zimmertemperatur nicht beständig. Nach 2 Tagen hat sich eine beträchtliche Menge Lactose gebildet (Chromatographie). Bei p_H 6 dagegen läßt sich nach 3 Tagen noch keine Spaltung nachweisen. Die Substanz gibt die Bial-Reaktion mit rotvioletter Farbe; bei weiterem Erhitzen tritt Verfärbung nach Braun ein (Lactose). Erwärmen mit salzsaurem Ehrlich-Aldehyd (ohne Vorbehandlung mit Alkali) liefert Farbstoff innerhalb von 3–5 Minuten. Die Intensität nimmt mit der Dauer des Erhitzens zu. Es treten folgende Absorptionsmaxima auf: 530, 560 $m\mu$ (Gittermeßspektroskop Loewe-Schumm).

Alkalische Kupfersulfatlösung wird in der Hitze reduziert. Die Ninhydrin-Reaktion ist, auch in neutraler Lösung, negativ. Bei aufsteigender Chromatographie wandert die Substanz auf dem Papier Schleicher & Schüll 2043 b in Pyridin (einmal destilliert): Essigester: Eisessig: Wasser = 5:5:1:3 einheitlich mit einem $R_{Lactose}$ -Wert 0.46. Sie kann mit Anilinhydrogenphthalat, mit Chlor-Benzidin nach H. N. Rydon und P. W. Smith¹⁴) sowie mit der Ehrlich-Reaktion nachgewiesen werden (Reagens modifiziert nach J. T. Edward und D. M. Waldron¹⁵)).

¹⁴) Nature [London] 169, 922 [1952].

¹⁵) J. chem. Soc. [London] 1952, 3631.

Oxydation mit Chromsäure: 300 mg *O*-Acetyl-lactaminsäure-lactose wurden mit 50 ccm 5*n* CrO₃/H₂SO₄ 1½ Stdn. unter Rückfluß gekocht. Die entstandene flüchtige Säure destillierte man ab. Vom Destillat (67 ccm) wurden 50 ccm mit 6.324 ccm *n*/₁₀ NaOH beinahe neutralisiert und verdampft. Trocknen des weißen, krist. Rückstandes i. Vak. ergab 52.5 mg. Ber. für 6.324 ccm *n*/₁₀ NaOH: 51.8 mg Natriumacetat bzw. 60.7 mg Natriumpropionat.

C₂H₃O₂Na (82.0) Ber. C 29.26 H 3.68 Na 28.04

C₃H₅O₂Na (96.0) Ber. C 37.49 H 5.25 Na 23.95

Gef. C 29.52 H 3.60 Na 27.53

Schmp. 318–319°, Schmp. von ebenso getrocknetem Natriumacetat 317°, Misch-Schmp. 317–318°. Die IR-Spektren sind identisch.

Hydrolyse zur Bestimmung der Zuckerbausteine: 10 mg *O*-Acetyl-lactaminsäure-lactose wurden in 0.5 ccm 0.5 *n* H₂SO₄ 15 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt (starke Huminbildung). Nach Neutralisation mit Barytwasser erhielt man durch Gefriertrocknung 8 mg eines hellbraunen leichten Pulvers. Papierchromatographisch konnten Glucose und Galaktose neben Lactose nachgewiesen werden. Das Verhältnis Glucose:Galaktose war meist nicht genau 1:1 (etwas mehr Galaktose). Wir halten es für möglich, daß in geringer Menge an Stelle von Lactose andere Zucker gebunden sind.

Spaltung von *O*-Acetyl-lactaminsäure-lactose durch die „Eigenacidität“: Der Verlauf wurde an Hand der Drehung, des Hypojodit-Verbrauchs (Willstätter-Schudel) und der Chromatographie an Papier verfolgt. 200 mg der Substanz wurden in 10 ccm dest. Wasser gelöst (2-proz. Lösung, *p*_H ~2) und auf 65° erwärmt.

Stdn. vom Beginn der Hydrolyse	α_D^{25} 1-dm-Rohr	Hypoiodit-Verbrauch in ccm $n/_{200}$ Na ₂ S ₂ O ₃	Chromatographie (Mengenverhältnisse geschätzt)
0	+0.32°	2.36	1 Substanz <i>R</i> _{Lactose} 0.46
3.5	+0.28°	3.97	Ausgangssubstanz und Lactose in gleichen Mengen 1 Subst. in geringer Menge <i>R</i> _L 1.46 1 Subst. <i>R</i> _L ~0.75 Ehrlich-positiv = Spaltsäure
10	+0.26°	4.05	nur noch wenig Ausgangssubstanz, sonst unverändert

Nach 3.5 Stdn. schwache Gelbfärbung, nach 10 Stdn. mäßige Braunfärbung, nach 15 Stdn. tiefe Braunfärbung, die eine Messung der Drehung nicht mehr gestattete. Die Hypojodit-Werte nach 10 Stdn. blieben innerhalb von weiteren 15 Stdn. Beobachtungsdauer konstant. Titriert wurden je 0.20 ccm.

Spaltung in präparativem Maßstab: 1 g *O*-Acetyl-lactaminsäure-lactose wurde in 6 ccm dest. Wasser gelöst (16-proz. Lösung) und 48 Stdn. lang bei 40° gehalten. Danach hatte sich die Lösung bräunlich verfärbt und enthielt noch wenig nicht hydrolysierte Substanz (Chromatographie). Zur Trennung wurde eine Säule mit Anionenaustauscher MIH (Füllung 2.7×35 cm) verwendet, der auf dieselbe Weise vorbereitet war wie bei der Isolierung der *O*-Acetyl-lactaminsäure-lactose. Das mit dest. Wasser auf 50 ccm verdünnte Hydrolysat ließ man langsam durch die Säule tropfen. Es wurde mit 300 ccm dest. Wasser nachgewaschen, bis dinitrobenzol-positive Substanzen nicht mehr nachzuweisen waren. Die nichtadsorbierte Lactose wog nach dem Verdampfen der Durchlauf- und Waschflüssigkeiten 388 mg; sie wurde in 3 ccm H₂O gelöst. Nach Versetzen mit Aktivkohle und Talkum nutschte man ab und konzentrierte die farblose Lösung an der Wasserstrahlpumpe auf etwa 1 ccm. Bei Zugabe von einigen Tropfen absol. Alkohols trat beim Reiben mit dem Glasstab Kristallisation ein. Wir erhielten so 349 mg Lactose. Trocknung erfolgte bei 20°/4 Torr über P₂O₅.

C₁₂H₂₂O₁₁·H₂O (360.3) Ber. C 39.97 H 6.71 Gef. C 40.05 H 6.75

Schmp. 198–199°; keine Depression mit ebenso getrockneter Vergleichslactose. IR-Spektren und Debye-Scherrer-Aufnahmen sind identisch. $[\alpha]_D^{25}$: +52° ($c = 1$, H_2O , Endwert).

Vorelution der MIH-Säule: 100 ccm 0.05 *m* Natriumacetat-Lösung, die noch etwas nicht hydrolysierte Ausgangssubstanz aufnahm. Hauptelution: 700 ccm 0.05 *m* Natriumacetat-Lösung (Ehrlich-stark-positiv). Nachelution: 300 ccm 0.5 *m* Natriumacetat-Lösung (Ehrlich-schwach-positiv). Weitere Aufarbeitung wie bei der Isolierung der *O*-Acetyl-lactaminsäure-lactose beschrieben. Das Haupteluat ergab 505 mg rein weiße, sehr lockere Substanz. Zur Kristallisation wurde mit 4 ccm Eisessig versetzt, kurz erwärmt und Wasser tropfenweise bis eben zur Lösung zugefügt. Von einer geringen Menge Ungelöstem saugte man ab. Nach 12stdg. Stehenlassen bei -10° hatte sich ein dicker Kristallbrei ausgeschieden, der abgesaugt und mit einem halben ccm 90-proz. Essigsäure gewaschen wurde. Ausb. 260 mg (55% d. Th.). Farblose, feine Prismen, gut löslich in Wasser und Methanol. Zur Analyse wurde i. Hochvak. bei 80° über P_2O_5 und KOH getrocknet. Schmp. 178–179° (Zers.).

$C_{12}H_{21}O_{10}N$ (339.3) Ber. C 42.48 H 6.24 N 4.13 CH_3CO 12.7

$C_{11}H_{19}O_9N$ (309.3) Ber. C 42.68 H 6.19 N 4.53 CH_3CO 13.9

Gef.*) C 42.23 H 6.18 N 4.25 CH_3CO 14.47

Gef.***) C 42.28 H 6.20 N 4.14 CH_3CO 12.48

*) Kein Rückstand bei der Verbrennung. **) 3mal aus 90-proz. Essigsäure umkristallisiert.

Eine 1-proz.-Lösung in Wasser hat ein p_H von ~ 2 . $[\alpha]_D^{25}$: -31 bis -32° (H_2O ; $c = 0.515$); keine Mutarotation. Fehling-Lösung wird in der Hitze reduziert. Die Ninhydrin-Reaktion ist, auch in neutraler Lösung, negativ. Bei der Bestimmung nach Willstätter-Schudel werden etwa 2 Moll. Hypojodit verbraucht. Beim Erhitzen mit salzsaurem Orcin tritt die typische rot-violette Farbe auf. Die kolorimetrische Bestimmung mit der Ehrlich-Reaktion ergab einen 1.97 mal höheren Farbwert als für *O*-Acetyl-lactaminsäure-lactose. Die Substanz wandert auf Papier Schleicher & Schüll 2043 b in Pyridin:Essigester:Eisessig:Wasser = 5:5:1:3 (aufsteigend) mit einem $R_{Lactose}$ -Wert 0.75 und kann mit Anilinderivat (gelb) bzw. mit Ehrlich-Aldehyd (rot-violett) nach Erhitzen des Papieres sichtbar gemacht werden.

Lactaminsäure-lactose: 200 mg *O*-Acetyl-lactaminsäure-lactose wurden in 10 ccm Wasser gelöst und mit 10 ccm Barytwasser (gesättigt) versetzt. Nach 3 Stdn. entfernte man die Bariumionen durch eine kleine Säule von IR 120 (H^+). Die Gefrier-trocknung ergab 173 mg (92% d. Th.); rein weiße, leichte Substanz, in Wasser und Methanol gut löslich. Eine 1-proz. Lösung in Wasser zeigt ein p_H von ~ 2 . Fehlingsche Lösung wird reduziert, die Bial- und Ehrlich-Reaktionen sind stark positiv, Ninhydrin reagiert in neutraler Lösung nicht. Bei der aufsteigenden Chromatographie (Schleicher & Schüll-Papier 2043 b) wandert die Substanz in Pyridin: Essigester:Eisessig:Wasser = 5:5:1:3 mit einem $R_{Lactose}$ -Wert ~ 0.46 . Zur Analyse wurde i. Hochvak. bei 80° über P_2O_5 und KOH getrocknet.

$C_{24}H_{41}O_{20}N$ (663.6) Ber. C 43.44 H 6.23 N 2.11 CH_3CO 6.48 $C-CH_3$ 2.26
Äquiv.-Gew. 664

$C_{23}H_{39}O_{19}N$ (633.6) Ber. C 43.56 H 6.20 N 2.21 CH_3CO 6.79 $C-CH_3$ 2.37
Äquiv.-Gew. 633.6

Gef. C 43.25 H 6.54 N 2.30 CH_3CO 7.32 $C-CH_3$ 3.04
Äquiv.-Gew. 576, 588 (Titration mit Alkali)

Dimethoxy-lactaminsäure-lactose: 100 mg *O*-Acetyl-lactaminsäure-lactose wurden in 20 ccm absol. Methanol gelöst und mit äther. Diazomethanolösung bis zur bleibenden Gelbfärbung versetzt. Nach Stehenlassen über Nacht destillierte man das Lösungsmittel i. Vak. ab und erhielt 95 mg einer weißen, flockigen Substanz. Eine 1-proz. Lösung besitzt ein p_H von ~ 5.5 . Alkalische Kupfersulfatlösung wird in der Hitze reduziert, die Bial- und Ehrlich-Reaktion ist in der Hitze stark positiv, Ninhydrin in

neutraler Lösung gibt keine Färbung. Zur Analyse wurde i. Hochvak. bei 80° über P_2O_5/KOH getrocknet.

$C_{25}H_{42}O_{19}N$ (661.4) Ber. C 45.36 H 6.57 N 2.12 $COCH_3$ 6.51 $C-CH_3$ 2.27 OCH_3 9.38
 $C_{26}H_{45}O_{20}N$ (691.6) Ber. C 45.15 H 6.57 N 2.03 $COCH_3$ 6.22 $C-CH_3$ 2.17 OCH_3 8.97
 Gef. C 44.84 H 6.54 N 2.71 $COCH_3$ 6.94 $C-CH_3$ 2.30 OCH_3 9.51

Lactaminsäure aus Lactaminsäure-methylester: 100 mg Lactaminsäure-methylester²⁾ wurden in 1 ccm Wasser gelöst; dazu tropfte man gesättigtes Barytwasser bis zur alkalischen Reaktion. Dies wurde im Abstand von mehreren Stunden so oft wiederholt, bis die alkalische Reaktion der Lösung erhalten blieb. Bei -5° bildete sich nach 12 Stdn. ein weißer, amorpher Niederschlag, der scharf abgesaugt und in 10 ccm Wasser gelöst wurde ($p_H \sim 6$). Von Bariumionen befreite man durch eine kleine Säule mit IR 120 (H^+). Die abfließende Lösung hatte ein $p_H \sim 3$. Durch Gefriertrocknung erhielten wir 65 mg eines leichten, weißen Pulvers. Es wurde aus 2 ccm Eisessig umkristallisiert, dem man in der Hitze tropfenweise Wasser bis eben zur Lösung der Substanz zusetzte. Die beim Stehenlassen (10°) abgeschiedenen feinen Prismen wurden abgesaugt und mit 90-proz. Eisessig gewaschen. Zur Analyse trocknete man 24 Stdn. i. Hochvak. bei 80° über P_2O_5 und KOH .

$C_{12}H_{21}O_{10}N$ (339.3) Ber. C 42.48 H 6.24 N 4.13 CH_3CO 12.7

$C_{11}H_{19}O_9N$ (309.3) Ber. C 42.68 H 6.19 N 4.53 CH_3CO 13.9

(Gef.*) C 42.85 H 6.10 N 4.09 CH_3CO 13.7

*: Kein Rückstand bei der Verbrennung.

Eine 1-proz. Lösung in Wasser hat ein $p_H \sim 2$. Alkalische Kupfersulfatlösung wird in der Hitze reduziert. Die Ninhydrin-Reaktion in neutraler Lösung ist negativ. Die Substanz gibt starke Bial- und Ehrlich-Reaktion (nur in der Hitze). $R_{Lactose}$ in Pyridin: Essigester: Eisessig: Wasser = 5:5:1:3 = 0.75 (Schleicher & Schüll-Papier 2043b); Anfärbung mit Anilinderivaten gelb, mit Ehrlich-Reagens rot-violett.

Versuche zur alkalischen Spaltung: 1.975 mg *O*-Acetyl-lactaminsäure-lactose wurden in 4 ccm $n/10$ NaOH gelöst. Davon erhitze man 2 ccm für 15 Min. im siedenden Wasserbad, der andere Teil blieb bei Zimmertemperatur 15 Min. stehen. Danach wurden beide Lösungen (die erhitze hatte sich gelb gefärbt) mit $n/10$ HCl neutralisiert und mit dest. Wasser auf 10 ccm aufgefüllt. Anschließend nahm man das UV-Spektrum auf (Abbild. 4). 1.146 mg kristallisierte Lactaminsäure (gewonnen durch Eigenhydrolyse von *O*-Acetyl-lactaminsäure-lactose) wurden mit 4 ccm $n/10$ NaOH versetzt. Die Lösung teilte man in 2 Hälften. Die eine wurde im siedenden Wasserbad 15 Min. lang erhitzt (danach gelb), die andere blieb dieselbe Zeit bei Zimmertemperatur stehen. Nach Neutralisieren und Auffüllen auf 10 ccm wurden die UV-Absorptionsspektren gemessen.

Zum Vergleich diente synthetische, kristallisierte Pyrrol- α -carbonsäure³⁾, von der man 1.094 mg in 10 ccm Äthanol löste, 1:20 verdünnte und davon ebenfalls das UV-Spektrum aufnahm (Abbild. 4). In den alkalisch erhitzten und neutralisierten Lösungen von *O*-Acetyl-lactaminsäure-lactose und von Lactaminsäure konnte chromatographisch auf der Höhe von Pyrrol- α -carbonsäure nur ein schwacher, mit Ehrlich-Reagens direkt (ohne Erwärmen) anfärbbarer Fleck nachgewiesen werden. Wie Abbild. 4 zeigt, entsteht zwar beim Erhitzen mit Alkali aus *O*-Acetyl-lactaminsäure-lactose bzw. Lactaminsäure das typische Absorptionsmaximum von Pyrrol- α -carbonsäure bei ~ 255 m μ . Der Vergleich der Intensitäten der molaren Extinktion im Maximum zeigt jedoch, daß sich bei der Reaktion nur ein sehr kleiner Teil von Pyrrol- α -carbonsäure bzw. eines ähnlichen Chromophors gebildet haben kann. 15 mg Lactaminsäure wurden mit 3 ccm $n/10$ NaOH 15 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach Ansäuern der tiefgelben Lösung mit verd. Schwefelsäure bis $p_H \sim 2$ schüttelte man mit Äther 2 mal aus. Der Ätherextrakt gab mit Ehrlich-Reagens in der Kälte nur eine schwache Rotfärbung, die sich beim Erwärmen etwas verstärkte. In der wäßrigen Phase befand sich noch der weitaus größte Teil an Ehrlich-positiver Substanz. Zum Vergleich wurde Pyrrol- α -carbonsäure nach derselben Vorbehandlung mit Alkali und Ansäuern mit Äther ausgeschüttelt. Sie ging vollständig in die ätherische Schicht.

Spaltung mit Virus-Enzym: Influenza-Virus B-Lee wurde im Allantoissack von Hühnerembryonen gezüchtet. Zur Reinigung und Konzentrierung adsorbierte man die virus-haltige Allantois-Flüssigkeit an Menschen-Erythrocyten, die mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen waren. Dauer etwa 50 Min. bei +2°. Das Virus wurde von den abzentrifugierten Erythrocyten mit physiol. NaCl-Lösung in 18 Stdn. bei 37° eluiert. Man erhielt so 10 ccm einer von Erythrocyten durch Zentrifugieren befreiten Virus-Suspension, deren Haemagglutinationstiter 1:2048 betrug. 10 mg *O*-Acetyl-lactaminsäure-lactose wurden in 0.5 ccm dest. Wasser gelöst und mit 0.14 ccm ~1-proz. Natriumcarbonatlösung auf p_H 6 gebracht. Dazu gab man 1.5 ccm Virus-Suspension und inkubierte bei 34°. Nach 24 Stdn. wurde 1 Min. auf 80° erhitzt, um die Viren abzutöten. Bei der Chromatographie (Schleicher & Schüll-Papier 2043 b, Pyridin:Essigester:Eisessig:Wasser = 5:5:1:3, aufsteigend) zeigte sich, daß an Stelle von *O*-Acetyl-lactaminsäure-lactose, die nur noch in sehr geringer Menge vorhanden war, Lactose und eine Substanz mit $R_{Lactose}$ -Wert ~0.7 entstanden waren (Anilinphthalat gelb, Ehrlich-positiv). Es wurden folgende Blindversuche gemacht: 1.5 ccm Allantois-Flüssigkeit, in der keine Viren gezüchtet waren, inkubierte man 24 Stdn. mit 10 mg *O*-Acetyl-lactaminsäure-lactose und 0.5 ccm Wasser (wie oben auf p_H 6 gebracht) bei 34°. Kurzes Erhitzen wie beim Virus-Ansatz. Chromatographisch war keine Andeutung einer Spaltung zu erkennen. 10 mg *O*-Acetyl-lactaminsäure-lactose, in 0.5 ccm Wasser gelöst und wie oben auf p_H 6 gebracht, wurden 24 Stdn. bei 34° stehengelassen. Nach Erhitzen auf 80° während 1 Min. sah man chromatographisch keine Andeutung einer Spaltung.

Spaltung mit RDE: 5 mg *O*-Acetyl-lactaminsäure-lactose wurden in 0.1 ccm Wasser gelöst und mit verd. Natriumcarbonatlösung auf p_H ~6 gebracht. Dazu gab man 0.25 ccm einer Lösung, die man durch Lösen einer Ampulle RDE (Behring-Werke) in 2.5 ccm Wasser erhielt. Das Ferment enthält Glucose, um eine bessere Gefriertrocknung bzw. bessere Löslichkeit in Wasser zu erreichen. Es wurde 1 bis 3 Tage bei 37° inkubiert. Danach zeigte die Chromatographie (Schleicher & Schüll-Papier 2043 b, Pyridin:Essigester:Eisessig:Wasser = 5:5:1:3, aufsteigend) neben Lactose noch etwa 20–30% *O*-Acetyl-lactaminsäure-lactose und eine Substanz mit dem $R_{Lactose}$ -Wert 0.7 (Ehrlich-positiv, mit Anilinphthalat Gelbfärbung am Papier). Der Blindversuch mit 5 mg *O*-Acetyl-lactaminsäure-lactose, in 0.1 ccm Wasser und wie oben auf p_H ~6 gebracht, zeigte nach 3 tägigem Stehenlassen bei 37° chromatographisch keinen Anhaltspunkt für eine Spaltung.

290. Herbert Oelschläger: Über die katalytische Hydrierung von *m*-Nitroacylbenzolen zu *m*-Alkylanilinen*)

[Aus dem Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Hamburg]

(Eingegangen am 20. März 1956)

Meinem verehrten akademischen Lehrer, Herrn Professor Dr. K. Kindler, zum 65. Geburtstag gewidmet

Die bisher nur schwer zugänglichen *m*-Alkylaniline lassen sich bequem und mit guter Ausbeute durch Hydrierung von *m*-Nitroacylbenzolen in Gegenwart von Palladiummohr in Eisessig unter Verwendung von Schwefelsäuremonohydrat als Aktivator gewinnen.

m-Alkylaniline haben in den letzten Jahren zunehmendes Interesse gefunden, weil sie als Zwischenprodukte für den Aufbau therapeutisch wichtiger, z. B. malaricid¹⁾ oder baktericid²⁾ wirkender Verbindungen erforderlich sind.

*) Vorgetragen auf der Hauptversammlung der Deutschen Pharmazeut. Gesellschaft in der DDR in Erfurt am 12. Mai 1956.

1) B. R. Baker, R. E. Schaub, J. P. Joseph, F. J. McEvoy u. J. H. Williams, J. org. Chemistry 17, 164 [1952].

2) R. R. Read u. D. B. Mullin, J. Amer. chem. Soc. 50, 1763 [1928].