

Beschreibung der Versuche

2,6-Dibrom-cyclohexanon: Ein Gemisch von 20 g Cyclohexanon und 80 ccm Eisessig wurde auf 0° abgekühlt und mit 22 ccm Brom versetzt. Zur Einleitung der Reaktion wurde eine Probe entnommen, bis zur beginnenden Reaktion erhitzt und dann schnell in die Mischung zurückgegossen. Nach beendeter Umsetzung wurde die gleiche Menge Wasser zugegeben, das ausgeschiedene Öl abgetrennt und stehengelassen. Die wäbr. Schicht wurde ausgeäthert, der nach dem Abdampfen des Äthers hinterbleibende Rückstand, ungeachtet einer eventuell schon eingetretenen Kristallisation, mit dem Öl vereinigt und das Ganze, mit der etwa fünffachen Menge Petroläther (30–50°) vermischt, kalt gestellt. Nach einiger Zeit wurde die erste Kristallfraktion abgesaugt. Aus Aceton-Äther oder viel Benzin (100–120°) umkristallisiert, bildete sie farblose Kristalle vom Schmp. 106–107°. Das Filtrat wurde wieder in den Kühlschrank gestellt und die erneut ausgeschiedenen Kristalle wieder abgesaugt. Das wurde so oft wiederholt, bis keine Kristallisation mehr eintrat. Die letzten Fraktionen bestanden aus fast reinem Dibrom-cyclohexanon vom Schmp. 37°. (Aus Petroläther (30–50°) umkristallisiert: große, farblose Kristalle.) Die mittleren Fraktionen wurden mit Äther gewaschen, in dem sich die niedriger schmelzende Substanz leichter löst, und nach dem Abdampfen des Äthers der Rückstand noch einmal fraktioniert kristallisiert. Es wurden 13.2 g (25% d. Th.) des höher schmelzenden und 15 g (28% d. Th.) des niedriger schmelzenden Dibrom-cyclohexanons erhalten. Letzteres wurde analysiert.

$C_6H_8OBr_2$ (256.0) Ber. C 28.15 H 3.15 Gef. C 28.22 H 3.24

Cyclohexandion-(1.2): 56 g Selendioxyd wurden in 150 ccm Methanol gelöst. Zu dieser oft etwas trüben Lösung wurden 212 ccm Benzol und 60 g Cyclohexanon hinzugefügt. Nach 2stdg. gelindem Sieden im Wasserbad wurde der größte Teil des Lösungsmittels unter vermindertem Druck abdestilliert, wobei die Wasserbadtemperatur 60° nicht übersteigen durfte. Der Rest wurde vom ausgeschiedenen Selen abdekantiert, dieses mehrmals mit Methanol gewaschen und die Waschflüssigkeit zusammen mit der Lösung i. Vak. fraktioniert destilliert (Flüssigkeitshheizbad!). Nach einem cyclohexandionhaltigen Vorlauf gingen bei 78–80°/12 Torr 20 g farblosen Cyclohexandions über, das nach einiger Zeit erstarrte. Schmp. 38–40°. Ausb. 36%.

357. Richard Kuhn und Reinhard Brossmer: Abbau der Lactaminsäure zu *N*-Acetyl-D-glucosamin

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

(Eingegangen am 30. Juli 1956)

Lactaminsäure hat die Bruttoformel $C_{11}H_{19}O_9N$. Unter Abspaltung von CO_2 und von 2 weiteren C-Atomen läßt sie sich zu *N*-Acetyl-D-glucosamin, $C_8H_{15}O_6N$, abbauen.

Durch alkalische Verseifung von Lactaminsäure-methylester (Methoxyverbindung der Lactaminsäure)¹⁾ sowie durch saure Hydrolyse der *O*-Acetyl-lactaminsäure-lactose²⁾ konnte dieselbe Carbonsäure gewonnen werden. Die jetzt vorliegenden Elementaranalysen sprechen dafür, daß ihr die Formel $C_{11}H_{19}O_9N$ zukommt. Nach Bruttoformel, Schmp. (183–185°, Zers.), Drehungsvermögen $[\alpha]_D^{25}$: -31° ($c = 1$, H_2O), IR-Spektrum, Debye-Scherrer-Linien, sowie in den Farbreaktionen mit *p*-Dimethylamino-benz-

¹⁾ R. Kuhn, R. Brossmer u. W. Schulz, Chem. Ber. 87, 123 [1954].

²⁾ R. Kuhn u. R. Brossmer, Angew. Chem. 68, 211 [1956]; Chem. Ber. 89, 2013 [1956].

aldehyd (rot) und mit Orcin in konz. HCl (violettrot) stimmt die Lactaminsäure überein mit der Schaf-Sialinsäure (*O*-sialic acid) von G. Blix³). Der direkte Vergleich wurde uns durch Überlassung einer Probe von Schaf-Sialinsäure ermöglicht, für die wir Hrn. Prof. Dr. Blix aufrichtig danken.

An Spaltstücken von bekannter chemischer Konstitution waren bisher nur 3 erhalten worden: CO₂ (durch Decarboxylierung), CH₂O (durch Abbau mit Perjodsäure) und CH₃·CO₂H (durch Verseifung bzw. durch Oxydation mit CrO₃). Jetzt ist es uns gelungen, aus Lactaminsäure durch Erhitzen (100°) mit Pyridin und Nickel(II)-acetat⁴) in einer Ausbeute von 23 % d. Th. *N*-Acetyl-*D*-glucosamin neben einem noch ungeklärten weiteren Umwandlungsprodukt zu erhalten. Die Identität des Abbauprodukts mit *N*-Acetyl-*D*-glucosamin stützt sich auf Elementaranalyse, [α]_D-Wert, IR-Spektrum, Debye-Scherrer-Linien, sowie auf Schmp. und Misch-Schmp.; Säurehydrolyse des Abbauprodukts ergab *D*-Glucosamin. Damit sind von den 11 C-Atomen 8 erfaßt und hinsichtlich der sterischen Anordnung der Substituenten die Verhältnisse an 4 C-Atomen aufgeklärt. Da ein weiteres C-Atom bei diesem Abbau als CO₂ abgespalten wird, verbleiben nur 2 C-Atome, die noch nicht erfaßt sind.

A. Gottschalk⁵) hat die Hypothese begründet, daß die Schaf-Sialinsäure aus einer 2-Acetamino-hexose (deren Natur er nicht angeben konnte) und aus

Brenztraubensäure aufgebaut sei. Das von ihm vorgeschlagene Strukturprinzip erklärt unsere Abbaugergebnisse. Wir nehmen an, daß die Gruppierung —CHOH—CH₂—CO—CO₂H unter Verlust von CO₂ in das Aldol —CHOH—CH₂—CHO übergeht, das anschließend — wie es vom Acetaldol bekannt ist⁶) — thermisch zerfällt. Nimmt man das von A. Gottschalk für die Sialinsäuren bzw. für die *N*-Acetyl-neuraminsäure vorgeschlagene Strukturprinzip als richtig an, dann läßt sich die Konstitutionsformel der Lactaminsäure bis auf die räumliche Lage des Hydroxyls am C-Atom 4 eindeutig angeben (I).

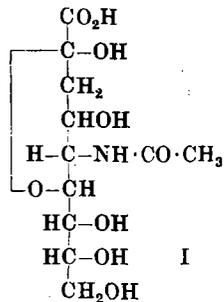
Der sauerstoffhaltige Ring ist nach links (nicht nach rechts) zu schreiben. Im Zusammenhang damit ergibt sich, wenn man die Lactaminsäure aus Stuart-Modellen aufbaut, auch eine Erkenntnis dafür, warum diese γ -Hydroxysäure keine Tendenz zur spontanen Bildung eines Lactons in wäßriger Lösung erkennen läßt. Sie entspricht sterisch den 3-Hydroxy-cyclohexancarbonsäuren, von denen nur die *cis*-Form und diese erst bei 170° das Lacton liefert. Nach Formel I sollte die Lactaminsäure in einer α - und in einer β -Form existieren und Mutarotation zeigen. Es kann sein, daß diese durch die hohe Acidität (H⁺) der wäßrigen Lösungen so stark katalysiert wird, daß sie sich der Beobachtung entzieht.

³) G. Blix, E. Lindberg, L. Odín u. I. Werner, Nature [London] 175, 340 [1955]; Acta Soc. med. Upsaliensis 61, 1 [1956].

⁴) G. Zweifel u. H. Deuel, Helv. chim. Acta 39, 662 [1956].

⁵) Nature [London] 176, 881 [1955].

⁶) R. Fricke, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 118, 241 [1922].



Ein Erythrit-äther, wie ihn E. Klenk, H. Faillard, F. Weygand und H. H. Schöne⁷⁾ für die *N*-Acetyl-neuraminsäure annehmen, kann nicht vorliegen. Erythrit gibt bei der Methoxylbestimmung nach Zeisel Isobutyljodid, entsprechend einem „OCH₃-Gehalt“ von 19.3%. Aus Lactaminsäure wird jedoch kein flüchtiges Alkyljodid erhalten. *N*-Acetyl-neuraminsäure, wie sie formuliert wurde⁷⁾, kann unter unseren Bedingungen auch kein *N*-Acetyl-*D*-glucosamin liefern.

Beschreibung der Versuche

Elementare Zusammensetzung der Lactaminsäure: Wird Lactaminsäure aus 80-proz. Essigsäure umkristallisiert²⁾, so findet man zwischen N-Gehalt und Äquiv.-Gew. eine Diskrepanz: die N-Werte stimmen besser auf die C₁₂-Formel, die Äquivalentgewichte dagegen auf die C₁₁-Formel, oder sie liegen sogar noch tiefer. Diese Unstimmigkeiten ließen sich durch verschiedene Arten des Trocknens nicht beheben. Der Schmp. solcher Präparate liegt bei 178–179° (Zers.).

C ₁₂ H ₂₁ O ₁₀ N (339.3)	Ber. C 42.48 H 6.24 N 4.13 CH ₃ CO 12.7
C ₁₁ H ₁₉ O ₉ N (309.3)	Ber. C 42.68 H 6.19 N 4.53 CH ₃ CO 13.9
	Gef. C 42.63 H 6.15 N 3.90 CH ₃ CO 12.8 Äquiv.-Gew. 309
	Gef. C 42.27 H 6.07 N 4.34
	Gef. C 42.27 H 6.07 N 4.25 CH ₃ CO 14.47 Äquiv.-Gew. 282
	Gef. C 42.23 H 6.18 N 4.25 CH ₃ CO 14.47 Äquiv.-Gew. 308
	Gef. C 42.27 H 6.19 N 3.97 CH ₃ CO 13.21 Äquiv.-Gew. 283
	Äquiv.-Gew. 297 (potent. titr.)

Lactaminsäure, die 3mal aus 90-proz. Essigsäure umkristallisiert war, zeigte dieselbe Diskrepanz und unveränderten Schmp. (178–179°, Zers.).

C ₁₂ H ₂₁ O ₁₀ N (339.3)	Ber. C 42.48 H 6.24 N 4.13 CH ₃ CO 12.7
C ₁₁ H ₁₉ O ₉ N (309.3)	Ber. C 42.68 H 6.19 N 4.53 CH ₃ CO 13.9
	Gef. C 42.28 H 6.20 N 4.14 CH ₃ CO 12.48
	Äquiv.-Gew. 295 (potent. titr.)

Umkristallisation von Lactaminsäure aus Wasser/Methanol/Äther/Petroläther³⁾ beseitigte die Unstimmigkeit zwischen N-Gehalt und Äquivalentgewicht. 300 mg Lactaminsäure (Präparat, das 3mal aus 90-proz. Essigsäure umkristallisiert war) wurden in 3.5 ccm Wasser gelöst. Dazu gab man 40 ccm Methanol, 90 ccm absol. Äther, wobei eine schwache Trübung auftrat. Dann fügte man langsam Petroläther (Sdp. 30–40°) zu, bis die Trübung sich verstärkte und die Flüssigkeit undurchsichtig wurde. Man ließ 3 Stdn. bei 20° stehen.

Nach kurzer Zeit hatten sich am Boden und an den Wänden des Gefäßes viele feine Prismen, teilweise zu Drusen vereinigt, abgeschieden. Man ließ noch 24 Stdn. bei +4° stehen und vervollständigte so die Kristallisation. Es wurde abgesaugt und über CaCl₂/20 Torr vorgetrocknet. Zur Analyse trocknete man weitere 5 Stdn. i. Hochvak. über P₂O₅ und CaCl₂ bei 50°. Wir erhielten 260 mg rein weiße Kristalle. Sie verfärbten sich bei 173 bis 175° gelb, begannen bei 180° zu sintern und schmolzen bei 183–185° unter Zersetzung. Der OCH₃-Gehalt war sehr gering (gef. 0.32%).

C ₁₂ H ₂₁ O ₁₀ N (339.3)	Ber. C 42.48 H 6.24 N 4.13 CH ₃ CO 12.7 Äquiv.-Gew. 339.3
C ₁₁ H ₁₉ O ₉ N (309.3)	Ber. C 42.68 H 6.19 N 4.53 CH ₃ CO 13.9 Äquiv.-Gew. 309.3
	Gef. C 42.46 H 6.30 N 4.61*) CH ₃ CO 13.92 Äquiv.-Gew. 309.4**)

*) Mittelwert aus 4 Bestimmungen: 4.49 und 4.58 (Mikrolabor MPI Heidelberg), 4.64 und 4.74 (Mikrolabor BASF Ludwigshafen).

**) Mittelwert aus 4 Titrationen mit Phenolphthalein nach F. Pregl und 1 potentiometrischen Titration: 306, 307, 311, 309 und 314 (potent.).

Nachweis der Decarboxylierungsprodukte: In einem von Stickstoff durchspülten Reagenzglas (19×110 mm) mit seitlichem Ansatz wurden 20 mg Lactaminsäure mit 2 ccm Pyridin und 15 mg Ni(II)-acetat·4 H₂O im Ölbad 30 Min. auf 100° erhitzt.

⁷⁾ Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **804**, 35 [1956]; E. Klenk, Angew. Chem. **68**, 349 [1956].

Durch die Lösung perlte langsam Stickstoff, der in einem zweiten Reagenzglas (19×110 mm) – ebenfalls mit seitlichem Ansatz – durch 3 ccm Barytwasser geleitet wurde. Die ganze Apparatur spülte man bereits vor Versuchsbeginn mit Stickstoff. Schon nach wenigen Minuten trübte sich das Barytwasser durch Abscheidung von BaCO₃.

Die olivbraune Pyridinlösung wurde papierchromatographisch untersucht. Man ließ auf Schleicher & Schüll-Papier 2043 b aufsteigend in dem Lösungsmittel⁸⁾ Pyridin: Essigester: Eisessig: Wasser (5:5:1:3) wandern. Zur Anfärbung dienten Anilinderivat, Natriumcarbonatlösung + *p*-Dimethylamino-benzaldehyd nach Morgan-Elson und *p*-Dimethylamino-benzaldehyd in salzsaurer Lösung (direktes Ehrlich-Reagens, modifiziert nach J. T. Edward und D. M. Waldron⁹⁾). Bei der Auswertung der auf dem Papier sichtbaren Substanzen bezog man auf krist. Lactaminsäure ($R_{\text{Lactaminsäure}} = 1$).

Subst.	$R_{\text{Lactaminsäure}}$	Anilinderivat	Anfärbung	
			Morgan-Elson	Ehrlich (direkt)
1	0.4	(-) hellbraun	+ nach ca. 1 Stde.	+ in der Hitze
2	1.3	(+) gelblich	+ nach ca. 1 Stde.	++ bei Zimmertemp. nach ca. 1/2 Stde.
3	2.3	++ braun	++ sofort	—
4	2.6	—	(+) nach ca. 1/2 Stde.	(+) bei Zimmertemp. nach 10 Min.
5	2.8	—	(+) nach ca. 1/2 Stde.	(+) bei Zimmertemp. nach 10 Min.

Lactaminsäure war auf dem Papier nicht mehr zu erkennen. Substanz 3 zeigte dieselbe Wanderung und Anfärbung wie ein Vergleichspräparat von *N*-Acetyl-D-glucosamin. Substanz 2 und 3 stellten die Hauptabbauprodukte dar, die Substanzen 1, 4 und 5 waren vergleichsweise nur in geringen Mengen vorhanden.

Präparativer Abbau: 1.5 g krist. Lactaminsäure wurden mit 1.2 g Ni(II)-acetat und 20 ccm dest. Pyridin 1 1/2 Stdn. im Ölbad auf 100° erhitzt. Nach etwa 10 Min. war alles gelöst. Die anfangs blaugrüne Farbe der Lösung veränderte sich schnell in Dunkelgrün und nach etwa 20 Min. in Olivbraun. Durch ein Papierchromatogramm überzeugte man sich vom Erfolg des Abbaus (Schleicher & Schüll, 2043 b, aufsteigend in Pyridin: Essigester: Eisessig: Wasser = 5:5:1:3). Es waren dieselben Substanzen nachzuweisen wie bei den kleinen Vorversuchen. Die Reaktionslösung engte man vorsichtig i. Vak. bis fast zur Trockne ein. Zur möglichst vollständigen Entfernung des Pyridins wurde 3 mal mit je 10 ccm Wasser abgedampft. Danach war nur noch schwacher Geruch nach Pyridin wahrnehmbar. Den Sirup nahm man in 20 ccm Wasser auf und entfernte die Nickel-Ionen an einer Säule mit Amberlite IR 120 (H⁺; Füllung 20×300 mm). Die abfließende Lösung war gelb gefärbt und hatte ein p_{H} von etwa 2. Der Austauscher wurde mit Wasser gewaschen, bis keine Ehrlich-positiven Substanzen nachzuweisen waren (300 ccm). Lösung und Waschwasser konzentrierte man i. Vak. auf etwa 20 ccm. Da man mit Hilfe des Indikators Bromphenolblau am Papierchromatogramm gesehen hatte, daß Substanz 2 sauer, Substanz 3 dagegen neutral reagierte, schien es aussichtsreich, die Trennung der beiden Haupt-Abbauprodukte voneinander bzw. die Isolierung der besonders interessierenden Substanz 3 an einem Austauscher vorzunehmen. Dies wurde durch Anwendung des schwach basischen Anionenaustauschers Lewatit MIH (Bayer, Leverkusen) in der Acetatform erreicht. Bezüglich Reinigung und Beladen sei auf die frühere eingehende Beschreibung verwiesen⁸⁾. Zur Chromatographie wurde eine Säule mit einer Füllung von 23×350 mm benutzt. Die zu trennende Lösung ließ man langsam durchtropfen und wusch mit 500 ccm Wasser nach. Alle Ehrlich-positiven, sauren Substanzen waren adsorbiert. Aus der MIH-Austauscher-Säule stammende N-Ionen entfernte man, nachdem Lösung und Waschwasser i. Vak. auf etwa 30 ccm ein-

⁸⁾ F. G. Fischer u. H. Dörfel, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **301**, 224 [1955].

⁹⁾ J. chem. Soc. [London] 1952, 3631.

geengt waren, durch eine kleine Säule mit IR-120 (Füllung 20×200 mm). Nach gründlichem Waschen des Austauschers (400 ccm) brachte man die gelbliche, schwach saure Lösung ($p_H \approx 4$) und das Waschwasser vorsichtig i. Vak. zur Trockne. Man erhielt 250 mg (23% d. Th.) amorphe, schwach gelblich gefärbte Substanz, die sich im Papierchromatogramm als Substanz 3 (Anilin-phthalat-positiv, Morgan-Elson-positiv, keine direkte Ehrlich-Reaktion) mit nur geringen Beimengungen von Substanz 4 und 5 erwies.

Man löste in 5 ccm Wasser, versetzte zur Entfärbung mit einer Spatelspitze Carboraffin und filtrierte. Die Lösung, deren gelbliche Färbung nicht vollständig zu beseitigen war, wurde in einem kleinen Schälchen im Exsiccator an der Wasserstrahlpumpe konzentriert. Den entstehenden Sirup impfte man mit sehr wenig *N*-Acetyl-*D*-glucosamin und erhielt nach kurzer Zeit einen dicken Kristallbrei; er wurde abgesaugt und mit 2 ccm 80-proz. reinem Alkohol gewaschen. Man trocknete 3 Stdn. bei 3 Torr und 60° über P_2O_5/KOH und erhielt 112 mg rein weiße Kristalle vom Schmp. 195–197° (Zers.). Ein ebenso umkristallisiertes und getrocknetes Vergleichspräparat von *N*-Acetyl-*D*-glucosamin hatte den Schmp. 195–197°. Die Mischung beider Substanzen zeigte keine Schmelzpunktsdepression.

$C_8H_{15}O_6N$ (221.2) Ber. C 43.43 H 6.84 N 6.33 Gef. C 43.50 H 6.73 N 6.42
[α] $_D^{25}$: +41.1° ($c = 2.55$, Wasser; Endwert).

10 mg des durch Abbau von Lactaminsäure gewonnenen *N*-Acetyl-*D*-glucosamins wurden mit 3 ccm 6*n* HCl 4 Stdn. auf 95° erhitzt. Papierchromatographische Analysen des Hydrolysats zeigten (Anfärbung mit Ninhydrin und mit Anilin-hydrogenphthalat) genaue Übereinstimmung des gebildeten Aminozuckers mit *D*-Glucosamin.

Substanz 2: Man eluierte die MIH-Säule mit 600 ccm 0.1 *m* Na-Acetalösung. Nachdem man geringe Mengen Chlor- und Sulfat-Ionen durch Silberacetat und Bariumacetat gefällt hatte, wurden die überschüssigen Kationen durch eine IR-120-Säule entfernt. Die gelbe, saure Lösung (p_H 2) engte man i. Vak. vorsichtig (Temp. unter 20°) auf etwa 15 ccm ein. Durch Gefriertrocknung erhielt man 952 mg einer hellbraunen, hygroskopischen, spröden Substanz. Sie gab eine violette Bial-Reaktion (Farbe mit Amylalkohol ausschüttelbar) und färbte sich mit salzsaurem *p*-Dimethylamino-benzaldehyd (Ehrlich) bei Zimmertemperatur schon nach 1/2 Stunde. Die Zeit, die dafür bei Lactaminsäure notwendig ist, beträgt mindestens 12 Stunden. Die Substanz 2 ist in Pyridin – auch in der Wärme – nur noch schwer löslich (Lactaminsäure gut löslich), in Eisessig gut löslich (Lactaminsäure schwer löslich). $R_{Lactaminsäure} = 1.3$ (Schleicher & Schüll, 2043 b, aufsteigend in Pyridin: Essigester: Eisessig: Wasser = 5:5:1:3).

Versuche zum Nachweis von Acetaldehyd: 100 mg Lactaminsäure wurden in der zur Carboxylierung benutzten Apparatur mit 80 mg Ni(II)-acetat und 3 ccm dest. Pyridin im schwachen Stickstoffstrom 1 1/2 Stdn. auf 100° erhitzt. Die Vorlage war mit 3 ccm einer schwefelsauren Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin beschickt. Auch nach 1 1/2 Stdn. war keine Trübung in der Vorlage festzustellen.

In derselben Apparatur wurden 100 mg dest. Brenztraubensäure mit 250 mg Ni(II)-acetat und 3 ccm dest. Pyridin unter Stickstoff 30 Min. auf 100° erhitzt. Schon nach wenigen Min. trübte sich das vorgelegte Barytwasser intensiv. – Denselben Ansatz führte man mit einer schwefelsauren Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin in der Vorlage durch. Nach 1 1/2 Stdn. war noch keine Trübung in der Vorlage zu erkennen.

Aus diesen Versuchen darf man schließen, daß Brenztraubensäure unter den angewandten Bedingungen leicht decarboxyliert wird, daß dabei aber kein flüchtiger Aldehyd entsteht.