

KURT WALLENFELS und JOCHEN LEHMANN
 DIE OLIGOSACCHARIDE DES JOHANNISBROTES
 (*CERATONIA SILIQUA* L.)
 ISOLIERUNG VON PRIMVEROSE UND CERATOSE

Aus dem Chemischen Laboratorium der Universität Freiburg i. Br.
 (Eingegangen am 31. Januar 1957)

Herrn Prof. Dr. B. Helferich zum 70. Geburtstag gewidmet

Im Extrakt aus den reifen Schoten des Johannisbrottes wurden neben Xylose, Fructose, Glucose und Saccharose mehrere weitere Oligosaccharide nachgewiesen. Von diesen wurden zwei reduzierende Disaccharide auch präparativ isoliert und als Xylosido-glucose und Fructosido-glucose gekennzeichnet. Das xylosehaltige Disaccharid erwies sich nach den Eigenschaften des Heptaacetats als identisch mit Primverose; das fructosehaltige Disaccharid, das bisher noch nicht beschrieben war und Ceratose genannt wird, konnte durch Kristallisation eines Azobenzolsulfonylhydrazons sowie eines Oktaazobenzolcarbonsäureesters charakterisiert werden. — Im Laufe der Reifung der Johannisbrotfrucht nimmt die Zahl der nachweisbaren Zucker ständig zu.

Die reifen Früchte des Johannisbrotbaumes (*Ceratoniasiliqua* L.) werden in nördlichen Breiten als süße Früchte des Südens vor allem von Kindern geschätzt, sie stellen in den Mittelmeerländern, wo sie geerntet werden, eine wichtige Kohlenhydratquelle vor allem für die Tierernährung dar. Die harten Samen, die in dem klebrigen gelben Fruchtfleisch eingebettet sind, werden in Italien und Spanien auf das darin enthaltene Galaktomannan industriell verarbeitet, das dabei anfallende Fruchtfleisch wird meist vermaischt und vergoren. In Notzeiten hat es nicht an Versuchen gefehlt, den Zucker zu gewinnen und an Stelle von Rohrzucker zu verwenden, doch steht der große Anteil an Invertzucker der Kristallisation entgegen.

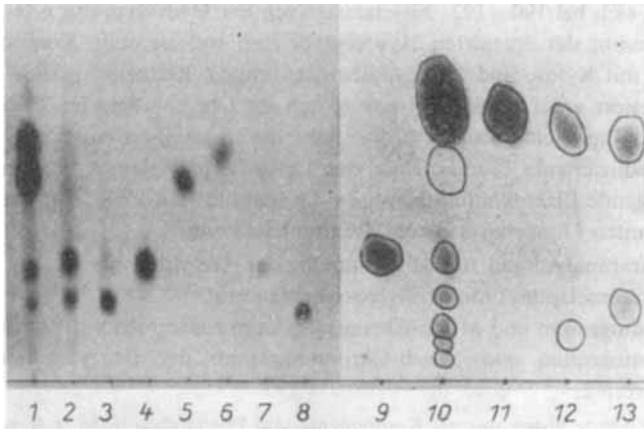
Als im Johannisbrot enthaltene einzelne Saccharide sind Glucose und Fructose sowie Saccharose beschrieben, die Mengenangaben differieren stark¹⁾. Von O. M. ANGELIDIS²⁾ wurde in jüngerer Zeit außer den genannten noch Maltose und Dextrine in Johannisbrot gefunden.

Das Papierchromatogramm (Abbild.) eines wäßrigen Extraktes zeigt, wenn man auf reduzierende und nicht reduzierende Zucker entwickelt, 9 sich gut voneinander trennende Flecke, die, nach sinkenden R_F -Werten aufgezählt, der Xylose, Fructose, Glucose, Maltose, Saccharose, Lactose und drei höheren Oligosacchariden, welche z. T. ketosehaltig sind, entsprechen. Da die höheren Oligosaccharide in sehr geringer Menge enthalten sind, das Vorkommen von Fructose, Glucose und Saccharose bekannt

¹⁾ M. BERTHELOT, Jber. Chemie 1858, 486; G. ODDO, C. A. 30, 6974 [1936]; J. F. HANAUSEK, Die Nahrungs- und Genußmittel aus dem Pflanzenreich, Kassel 1884.

²⁾ C. A. 48, 8568 [1954].

ist, wurde die präparative Isolierung der reduzierenden Zucker in Angriff genommen, die sich chromatographisch ähnlich wie Lactose und Maltose verhalten. Sie wurden zunächst mit X und Y bezeichnet.



Papierchromatographische Verfolgung der Reinigung von X und Y und Bausteinanalyse von X.

1: Extrakt aus Johannisbrot, 2: X und Y durch Kohle-Kieselgur-Chromatographie angereichert, 3: X präparativ-papierchromatographisch gereinigt, 4: Y präparativ-papierchromatographisch gereinigt, 5: Glucose, 6: Fructose, 7: Maltose, 8: Lactose, 9: Saccharose, 10: Extrakt aus Johannisbrot, 11: Fructose, 12: Säurehydrolysat von X (sichtbar neben Fructose noch nicht-hydrolysierter Zucker X), 13: Säurehydrolysat von X-Alkohol (sichtbar neben Fructose noch nicht-hydrolysierter X-Alkohol).

1–8: Lösungsmittel I, mit ammoniakalischer Silbernitratlösung entwickelt.

9–13: Lösungsmittel II, mit Naphthoresorcin entwickelt. Laufzeit jeweils 48 Stdn.

ISOLIERUNG VON X UND Y

Durch Eindampfen des wäßrigen Fruchtfleisch-Extraktes im Vakuum wurde ein Sirup erhalten, aus dem sich die Monosaccharide größtenteils durch Chromatographie an der Kohle-Kieselgur-Säule nach R. L. WHISTLER und D. F. DURSO³⁾ abtrennen ließen. Die Di- und höheren Saccharide wurden ohne zu fraktionieren mit 30-proz. Alkohol eluiert. Aus 20 g Sirup wurde ca. 1 g Oligosaccharidfraktion erhalten. Diese enthielt neben noch immer vorhandenen Monosacchariden die Oligosaccharide X und Y in solcher Menge, daß ihre Isolierung mit Hilfe der präparativen Chromatographie in großen Papierbogen möglich war. Aus 200 mg der Oligosaccharidfraktion, die auf einen Bogen der Größe 60 × 60 als Streifen aufgetragen werden konnte, erhielten wir durch Ausschneiden der X und Y enthaltenden Bänder und Elution mit 5-proz. Alkohol die einzelnen Zucker in chromatographisch nahezu reiner Form. Vom Zucker Y erhält man etwa doppelt soviel wie vom Zucker X (20 bzw. 10 mg aus 200 mg Oligosaccharidfraktion).

³⁾ J. Amer. chem. Soc. **72**, 677 [1950].

DIE CHEMISCHE NATUR VON Y

Die Lösungen mehrerer solcher Chromatogrammelutionen der Fraktion Y wurden vereinigt und konzentriert. Die Lösung des lackartigen Rückstands in 80-proz. Alkohol schied nach 2–3 Monaten strahlenförmig angeordnete Nadeln ab, die, umkristallisiert, sich bei 190–192° zersetzen. Nach der Hydrolyse mit n HCl zeigte das Chromatogramm des entsalzten Hydrolysats zwei reduzierende Komponenten, die im R_F -Wert mit Xylose und Glucose übereinstimmen. Reduziert man Y mit NaBH_4 und hydrolysiert anschließend, so lassen sich im Chromatogramm Substanzen mit R_F -Wert und Eigenschaften von Xylose und Sorbit nachweisen. Die Glucose stellt somit die reduzierende Komponente des Disaccharides dar. Y ist eine *Xylosido-glucose*. Folgende Eigenschaften beweisen die Identität mit *Primverose*, dem einzigen bisher bekannten Disaccharid dieser Zusammensetzung:

1. Elementaranalyse und Acetylbestimmung des Acetylderivats
2. Misch-Schmelzpunkt mit Primverose-heptaacetat *)
3. Chromatogramm und Misch-Chromatogramm zusammen mit Primverose **)
4. Chromatogramm und Misch-Chromatogramm der Benzylaminderivate von Y und Primverose.

Primverose wurde bisher nur als Komponente von Phenolglykosiden, z. B. von Primverin aus *Primula officinalis*, nie als freier Zucker aufgefunden. Sie wurde durch B. HELFERICH und H. RAUCH⁴⁾ aus 1.2.3.4-Tetraacetyl-glucose und Acetobrom-xylose synthetisiert.

DIE CHEMISCHE NATUR VON X

Das Verhalten bei der Chromatographie als freier Zucker und als Benzylamin-derivat spricht auch bei X für ein Disaccharid. Die Entwicklung mit Naphthoresorcin spricht für eine Ketosekomponente. X ließ sich bisher nicht kristallin gewinnen, auch das Acetylierungsprodukt zeigte bei verschiedenen Darstellungsmethoden keine Neigung zur Kristallisation. Der Zucker zerfällt bei der Hydrolyse mit $2n$ HCl in etwa gleiche Teile Glucose und Fructose. Das Reduktionsprodukt von X mit NaBH_4 setzt sich auf Grund der chromatographischen Eigenschaften des Hydrolysates und der spezifischen Nachweisreaktionen im Papierchromatogramm aus Sorbit und Fructose zusammen. X ist demnach eine *Fructosido-glucose*. Spezifische Drehung in Wasser: $[\alpha]_D^{23}$: + 21° ($c = 2.8$). Da ein Zucker mit diesen Eigenschaften u. W. noch nicht in der Natur aufgefunden wurde^{***)}5), möchten wir auf Grund des Vorkommens in den Früchten von *Ceratonia siliqua* L. für das Disaccharid X den Namen *Ceratose* vorschlagen.

Ceratose bildet ein Azobenzolsulfonylhydrazon und einen Oktaazobenzolcarbon-säureester.

*) Für die Überlassung einiger mg dieser Substanz danken wir Herrn Prof. Dr. T. REICHSTEIN, Basel.

**) Herrn Prof. Dr. B. HELFERICH danken wir sehr für die Überlassung einer Probe von synthet. Primverose.

4) Liebigs Ann. Chem. 455, 168 [1927].

***) Ein Disaccharid von der Zusammensetzung der Ceratose aber anderer spezif. Drehung wurde bei der enzymatischen Spaltung von Saccharose mit Hefeinvertase erhalten. Es entsteht durch Übertragung des Fructoserestes auf Glucose⁵⁾.

5) J. EDELMAN, Biochem. J. 57, 22 [1954]; J. S. D. BACON, ebenda 57, 320 [1954].

BILDUNG DER OLIGOSACCHARIDE DES JOHANNISBROTENS IM LAUFE DER REIFUNG

(Mit M. KESER)

Ausgehend von der Annahme, daß ein Großteil der in freier Form vorkommenden Oligosaccharide durch Transglykosidierung mittels Hydrolasen⁶⁾ aus relativ wenigen Disacchariden gebildet werden können, haben wir die Bildung der Zucker in den Früchten des Johannisbrotbaumes im Verlaufe der Reifung untersucht. Herr Dr. José SERRALLACH hatte die große Freundlichkeit, uns aus seinem Garten in Barcelona in jedem Monat der Reifungsperiode Früchte des gleichen Baumes vom gleichen Ast per Luftpost zu senden, die in Freiburg unverzüglich zerkleinert und extrahiert wurden. Die Extrakte wurden mit Ionenaustauscher entsalzt und chromatographiert. Es zeigt sich, wie aus Tabelle 1 ersichtlich, daß die Zahl der Zucker im Laufe des Wachstums der Früchte zunimmt. Während bei den etwa 15 mm langen und 3 mm breiten Früchten, die im Monat April geerntet wurden, als einziger Zucker Glucose erkennbar ist, zeigt sich einen Monat später auch freie Fructose. Erst dann tritt Saccharose auf. Primverose zeigt sich im vorletzten Monat der Reifungsperiode, während Ceratose erst in den ausgereiften Früchten auftritt. Wir konnten bisher keine Invertase in den Früchten nachweisen. Doch soll die Frage weiter geprüft werden, ob Ceratose evtl. durch Gruppenübertragung aus Saccharose auf Glucose gebildet wird. Für das Vorkommen eines Primverosids, aus welchem Primverose durch enzymatische Spaltung in den Früchten entstehen könnte, liegen keine Anzeichen vor. Doch wollen wir auch diese Möglichkeit noch eingehender prüfen.

Tab. 1. Papierchromatographischer Nachweis von Zuckern in den Früchten von *Cerutonia siliqua* L. im Verlaufe der Reifung. Relative Mengen geschätzt.

Zucker	April	Mai	Juni	Juli	August	September	Reif
Xylose			(+)	(+)	(+)	+	+
Fructose		+	++	+++	+++	+++	++++
Glucose	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
Primverose					+	++	++
Ceratose							++
Saccharose			+	++	++	+++	+++
Weitere Oligosaccharide							+

Der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT sind wir für Sachbeihilfen zu großem Dank verpflichtet.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

1. Extraktion von Johannisbrotfrüchten

5 kg reife spanische Johannisbrotfrüchte werden nach Entfernung der Samen grob zerkleinert und mit 1 l Wasser in einer Bauknecht-Küchenmaschine zu einem Brei vermahlen. Die Masse wird mit 10 l Wasser aufgenommen und in drei 5-l-Flaschen 2 Tage bei 0° geschüttelt. Die holzigen Bestandteile zentrifugiert man ab. Die überstehende Lösung wird zu einem dicken Sirup von malzextraktähnlichem Aussehen und Geruch eingedampft (Ausb. etwa 1000 g) und vor der papierchromatographischen Analyse nach Verdünnen mit dest. Wasser im Verhältnis 1:2 mit den Ionenaustauschern Amberlite IR-120 und IR-4b entsalzt (pro 10 g Sirup je 20 ccm Amberlite IR-120 und IR-4b).

⁶⁾ K. WALLENFELS, Colloquium Ges. physiol. Chem., Springer-Verlag, Berlin 1953, S. 160.

2. Papierchromatographische Analyse

Die papierchromatographischen Analysen werden in rechteckigen Glaskästen, Höhe 50 cm, Breite 25 cm, Tiefe 35 cm, absteigend durchgeführt. Wir benützen Schleicher & Schüll-Papier 2043 b im Format 27 × 48 cm. Von der an Gesamtzuckern etwa 20-proz. wäßrigen Lösung werden pro Fleck 5 mm aufgetragen.

Als Lösungsmittel werden benützt:

I n-Butanol-Pyridin-Wasser 60:40:30 oder

II n-Butanol-Eisessig-Wasser 40:10:50 oder

III n-Butanol-Äthanol-Wasser 50:10:40

Nach einer Laufzeit von 48 Stdn. für Lösungsmittelgemisch I und 72 Stdn. für die Gemische II und III sind die Zucker soweit aufgetrennt, daß die Chromatogramme entwickelt werden können.

3. Entwicklungsreagenzien

a) *Ammoniakalische Silbernitratlösung*⁷⁾: Reduzierende Zucker werden mit einer Mischung aus gleichen Teilen 0.2 *n* Silbernitratlösung und 5 *n* Ammoniaklösung sichtbar gemacht. Die Chromatogramme werden mit dieser Lösung gleichmäßig besprüht, bei 80° 6 Min. trocken erhitzt und schließlich in Wasserdampf von 100° ½ Min. entwickelt. Nach ½ stdg. Fixierung in 10-proz. Natriumthiosulfatlösung und 3 stdg. Wässern sind die Chromatogramme weitgehend haltbar.

b) *Naphthoresorcin*: Die ketosehaltigen Zucker werden mit Hilfe einer 0.2-proz. Lösung von Naphthoresorcin, die mit dem gleichen Volumen 0.25 *n* HCl und 1/10 Vol. Phosphorsäure (*d* 1.85) gemischt wird, sichtbar gemacht. Die besprühten Chromatogramme werden 5 Min. bei 105° in trockener Luft erhitzt. Dabei treten auch nicht-reduzierende Zucker, die Ketosen enthalten, als braunrote Flecke hervor⁸⁾. Entwicklung in 70° heißem Wasserdampf zeigt die Aldopentosen als blaue, die Aldo-hexosen als schwachblau gefärbte Flecke. Die Chromatogramme sind nur beschränkte Zeit haltbar. Lösungsmittel I ist wegen des in dem Papier zurückbleibenden Pyridingehaltes nicht anwendbar.

c) *Chromatographie der Benzylaminverbindungen*: Die auf der Startlinie aufgetragenen Zuckerflecke werden mit einer 10-proz. alkoholischen Benzylaminlösung getüpfelt⁹⁾. Während 5 Min. bei 85° reagieren die Zucker mit Benzylamin unter Bildung von Schiffschen Basen, die gegenüber den freien Zuckern erhöhte *R_F*-Werte besitzen. Die Chromatogramme dürfen höchstens 2 Tage laufen. Nach dem Trocknen werden sie mit einer 0.25-proz. Lösung von Ninhydrin in Äthanol besprüht. Es zeigen sich gelbe Flecke. Di-, Tri- und Tetrasaccharide lassen sich so gut unterscheiden, da sie als Benzylaminverbindungen große Unterschiede in den *R_F*-Werten aufweisen.

Tab. 2. *R_G*-Werte von X, Y und X-Alkohol

Lösungsmittelgemisch	X	<i>R_G</i> -Werte von Y	X-Alkohol
I	0.48	0.60	—
II	0.21	0.31	0.39
III	0.30	0.40	—

⁷⁾ S. M. PARTRIDGE, *Nature* [London] **158**, 270 [1946]; K. WALLENFELS, E. BERNT und G. LIMBERG, *Angew. Chem.* **65**, 581 [1953].

⁸⁾ J. L. BRYSON und T. J. MITCHELL, *Nature* [London] **167**, 864 [1951].

⁹⁾ R. J. BAYLY und E. J. BOURNE, *Nature* [London] **171**, 385 [1953].

4. Chromatographie an Kohle-Kieselgur-Säulen

Zur Chromatographie an Kohle-Kieselgur nach WHISTLER und DURSO³⁾ verwenden wir starkwandige Glasröhren (Höhe 40cm, Durchmesser 80cm, Wandstärke 0.5cm), an die unten ein Trichter mit einer porösen Tonplatte druckdicht angeschraubt werden kann. Die Säule wird mit einer Mischung von 400g Kieselgur und 400g Aktivkohle in Pulverform, die vorher mehrmals mit Wasser und anschließend mit 50-proz. Alkohol ausgekocht wird, gefüllt. Die obere Öffnung des Zylinders ist mit einem zweifach durchbohrten Gummistopfen versehen, der mit einer Metallplatte und drei Schraubzügen druckdicht in die Öffnung gepreßt wird. Durch eine Bohrung des Stopfens wird Lösungsmittel nachgefüllt, die andere dient als Luftdruckzuleitung. Eine kleine Pumpe erzeugt die notwendige Druckluft, deren Regelung durch ein Quecksilberventil von 1m Hg-Höhe erfolgt.

40ccm einer 50-proz. Siruplösung, die etwa 13g Zuckergemisch enthalten, werden auf die Kohle-Kieselgur-Säule aufgetragen, die Monosen mit 5/ Wasser und die Oligosaccharide mit 9/ 30-proz. Äthanol ausgewaschen. Die Durchlaufgeschwindigkeit beträgt ungefähr 25ccm/Min. Die Eluate werden i. Vak. bei 25–30° bis zur Sirupkonsistenz eingedampft. Ausb. 1g Oligosaccharidgemisch.

5. Präparative Trennung von Zuckern auf papierchromatographischem Wege¹⁰⁾

Auf die Startlinie von 60cm werden 0.75ccm einer 20-proz. wäßrigen Lösung von Oligosaccharidsirup, die etwa 100–150mg Oligosaccharide enthalten (durch Vortrennung an Kohle-Kieselgur erhalten), aufgetragen. Man läßt die Chromatogramme mit einem Lösungsmittelgemisch aus n-Butanol-Pyridin-Wasser 60:40:30 laufen. Aus den getrockneten Bogen schneidet man aus der Mitte und am Rand 1cm breite Suchstreifen aus. Diese werden mit ammoniakalischer Silbernitratlösung, wie unter 2. beschrieben, entwickelt. Die entwickelten Suchstreifen werden an den Bogen angelegt und die zuckerhaltigen Zonen mit Bleistift markiert. Die Zonen werden ausgeschnitten und mit jeweils 20ccm 5-proz. Äthanol eluiert. Die Eluate enthalten die Zucker in reiner Form. Durch Wiederholung dieses Verfahrens werden von jeder Fraktion etwa 1/ 5-proz. Äthanollösung erhalten, die man i. Vak. bei 30° bis auf 5–10ccm eindampft. Das restliche Lösungsmittel wird durch Lyophilisieren entfernt.

Aus 1g Oligosaccharidsirup erhält man in papierchromatographisch reiner Form 40 bis 50mg X und 100–110mg Y. Diese Ausbeute entspricht einem Gehalt von etwa 0.05% bzw. 0.1% im Johannisbrot.

Zur Kristallisation von Y wurden 20mg des Lyophilisats in 20ccm 80-proz. Äthanol in der Wärme gelöst und bei –15° stengelassen. Nach zwei Monaten beginnen sich Nadeln abzuscheiden, Schmp. 190–192° (Zers.). $[\alpha]_D^{23}$: –1.5° ($c = 3.5$, in Wasser).

6. Hydrolyse

Zur Hydrolyse werden je 5mg X bzw. Y in 2ccm 1*n* HCl gelöst und in eine Ampulle eingeschmolzen. Diese wird 45 Min. in einen 85° heißen Heizkasten gehängt. Anschließend wird an einer kleinen Ionenaustauschersäule mit 5ccm Amberlite IR-4b neutralisiert. Die chromatographische Analyse des Hydrolysats ergibt für X Glucose und Fructose, für Y Glucose und Xylose (s. Tab. 3).

7. Reduktion mit Natriumborhydrid¹¹⁾

30mg Natriumborhydrid werden in 1ccm Wasser gelöst. Je 0.2ccm dieser Lösung werden zu Lösungen von je 20mg Disaccharid in 0.4ccm Wasser gegeben. Man läßt die Proben 2 Sidn. bei 25° stehen. Das überschüss. Natriumborhydrid wird durch kurzes Erwärmen mit

¹⁰⁾ K. WALLENFELS, E. BERNT und G. LIMBERG, Liebigs Ann. Chem. 579, 113 [1953].

¹¹⁾ M. ABDEL-AKHER, J. K. HAMILTON und F. SMITH, J. Amer. chem. Soc. 73, 4691 [1951].

3 Tropfen Essigsäure auf dem Dampfbad zerstört. Die anorganischen Bestandteile werden an den Ionenaustauschern Amberlite IR-120 und IR-4b entfernt (Austauschersäule: Höhe 30cm, Durchmesser 1cm. Untere Hälfte mit IR-4b, obere Hälfte mit IR-120 gefüllt). Nach Konzentration der so entsalzten Lösung hydrolysiert man nach den unter 6 beschriebenen Bedingungen und identifiziert die Spaltprodukte papierchromatographisch.

Tab. 3. R_F -Werte der Hydrolysenprodukte von X und Y, deren Hydrierungsprodukte sowie von Vergleichssubstanzen

Substanz	R_F -Wert	Substanz	R_F -Wert
Glucose	0.18	X-Hydrolysat	0.18 und 0.23
Fructose	0.23	X-Alkohol-Hydrol.	0.18 und 0.23
Xylose	0.28	Y-Hydrolysat	0.18 und 0.38
Sorbit	0.18	Y-Alkohol-Hydrol.	0.18 und 0.38

Glucose und Sorbit werden durch differenzierte Entwicklung mit Permanganat und Silbernitrat unterschieden.

8. Derivate

a) *Primverose-heptaacetat*: 100mg Y werden mit 60mg wasserfreiem Natriumacetat und 1.5ccm *Acetanhydrid* in einem 5ccm fassenden Spitzkölbchen mit einem eingeschlifenen Liebigkühler in einem Ölbad langsam auf 120° erhitzt. Hierbei geht der Zucker und ein Teil des Natriumacetats allmählich in Lösung. Jetzt wird noch 20 Min. bei 120° erwärmt. Die Reaktionslösung wird in einem Becherglas auf 20g fein zerstoßenes Eis gegossen. Man läßt über Nacht stehen, damit alles Acetanhydrid hydrolysiert ist. Die Essigsäure wird mit Natriumhydrogencarbonat neutralisiert und die wäßrige Lösung etwa 4mal mit der halben Menge Chloroform ausgeschüttelt. Die vereinigten Auszüge werden mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird auf dem Wasserbad abgedampft. Letzte Reste Chloroform werden im Vakuumexsiccator entfernt. Fünfmaliges Umkristallisieren aus 95-proz. Äthanol liefert 80mg Acetat in langgestreckten rechteckigen Blättchen vom Schmp. 211.5–212°.

Misch-Schmelzpunkt: Das uns von Herrn Prof. REICHSTEIN zur Verfügung gestellte Präparat schmilzt bei 204° und kristallisiert in quadratischen Blättchen. Nach Animpfen unseres Präparates mit dem vom Schmp. 204° wurde es ebenfalls in quadratische Blättchen vom Schmp. und Misch-Schmp. 204° umgewandelt.

$C_{25}H_{34}O_{17}$ (606.5) Ber. C 49.50 H 5.65 Acetyl 49.74

Gef. C 49.34 H 5.72 Acetyl 52.20

b) *Ceratose-azobenzolsulfonylhydrazon*: 36mg *Ceratose* werden in 0.5ccm Methanol und 0.5ccm Acetonitril unter Erwärmen gelöst, mit 50mg *Azobenzolsulfonylhydrazin*¹²⁾ in 0.5ccm Methanol und 0.5ccm Acetonitril versetzt und in einem 5-ccm-Kölbchen 2 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Schon nach ungefähr 20 Min. scheiden sich kleine gelbe Kristalle ab. Nach 2 Stdn. läßt man auf 0° abkühlen und saugt die Kristalle ab. Sie sind in Methanol und Äthanol unlöslich und zersetzen sich bei 290° ohne zu schmelzen. Die Ausbeute beträgt 43mg. Nach Umkristallisieren aus 3 Tln. Pyridin und 1 Tl. Methanol schmilzt das Präparat bei 160–163° (Zers.).

$C_{24}H_{32}O_{12}N_4S \cdot 2 C_5H_5N$ (758.8) Ber. C 53.81 H 5.58 N 11.08

Gef. C 53.70 H 5.78 N 10.87

¹²⁾ O. WESTPHAL, H. FEIER, O. LÜDERITZ und I. FROMME, *Biochem. Z.* **326**, 139 [1954].

c) *Ceratose-oktaazobenzolcarbonsäureester*: 10 mg *Ceratose* und 90 mg *Azobenzolcarbonsäurechlorid*¹³⁾ werden in 2 ccm wasserfreiem Pyridin gelöst und 1 Tag bei -15° , 2 weitere Tage bei Zimmertemperatur stehengelassen. Der ausgefallene Ester wird abgesaugt und in Chloroform aufgenommen. Die Lösung chromatographiert man an Aluminiumoxyd und isoliert die Zone, die den fleischfarbenen Ester enthält. Durch Aufkochen mit Dioxan wird der Ester vom Adsorbens gelöst und durch Abkühlen auf -15° zur Kristallisation gebracht. Schmp. $270-273^{\circ}$ (Zers.). Ausb. 11 mg (19% d. Th.).

$C_{116}H_{86}O_{19}N_{16}$ (2007.6) Ber. N 11.16 Gef. N 11.42

LEOPOLD WOLF und KLAUS WETZEL
UNTERSUCHUNGEN ÜBER KOMPLEXVERBINDUNGEN
DER β -KETOSÄUREAMID-REIHE

Aus dem Institut für Anorganische Chemie der Universität Leipzig
(Eingegangen am 16. Januar 1957)

Herrn Professor Dr. B. Helferich zum 70. Geburtstag gewidmet

Es wurden in größerer Zahl *Chelatverbindungen* des Kupfers mit β -Ketosäureamiden (insbesondere mit β -Ketosäurearyliden) dargestellt und hinsichtlich ihrer *Stabilität* bezüglich der Dissoziation in Metallion und Enolation ausführlich untersucht, als Beitrag zur Theorie der chemischen Bindung in innerkomplexen Sechsring-Systemen. — Überlegungen und Abschätzungen der Beteiligung von *Resonanz-* und *elektrostatischen* Effekten führen zusammen mit den Ergebnissen der Stabilitätsmessungen zu der Auffassung, daß die Bindung zwischen Metallion und Enolation vorwiegend *elektrostatischer* Natur ist. Es wird dargelegt, daß bei vorherrschender Resonanz im Chelatring die *Stabilität* der substituierten Cu-Acetoacet-anilide in der Substituentenfolge $-NO_2 > -Cl > -Br > -CH_3 > -OCH_3$ abgestuft ist, während bei vorwiegend elektrostatischer Bindung des Metallions die umgekehrte Reihenfolge auftritt. Eine *lineare* Beziehung zwischen pK_D (Enol) und $-pK_1$ (Komplex) wird aufgezeigt. — Die theoretisch möglichere Existenz von *cis,trans*-Isomeren bei den Cu-Acetoacet-*nitroaniliden* wird durch Isolierung der beiden Stereoisomeren beim Cu-Acetoacet-*p*-nitroanilid nachgewiesen. — Die Cu-Derivate der Acetessigsäure-nitroanilide ermöglichen eine bequeme Darstellung der sonst schwer zugänglichen Acetoacet-nitroanilide.

Über β -Dioxoverbindungen und deren Enolisierungsprodukte sind in den letzten Jahrzehnten zahlreiche komplexchemische Untersuchungen bekannt geworden¹⁻⁷⁾.

¹³⁾ G. H. COLEMAN und C. M. McCLOSKEY, J. Amer. chem. Soc. **65**, 1588 [1943].

¹⁾ P. PFEIFFER und H. GLASER, J. prakt. Chem. [2] **151**, 145 [1938].

²⁾ G. E. UTZINGER, Helv. chim. Acta **35**, 1359 [1952].

³⁾ R. L. BELFORD, A. E. MARTELL und M. CALVIN, J. Inorg. Nuclear Chem. **1956**, 2, 11.

⁴⁾ H. O. CHAPLIN und L. HUNTER, J. chem. Soc. [London] **1939**, 484 ff.

⁵⁾ M. CALVIN und K. W. WILSON, J. Amer. chem. Soc. **67**, 2003 [1945].

⁶⁾ M. CALVIN und N. C. MELCHIOR, J. Amer. chem. Soc. **70**, 3270 [1948].

⁷⁾ L. J. BELLAMY und L. BEECHER, J. chem. Soc. [London] **1954**, 4487; L. J. BELLAMY und R. F. BRANCH, ebenda **1954**, 4491.