

RICHARD KUHN und ADELIN GAUHE

Bestimmung der Bindungsstelle von Sialinsäureresten in Oligosacchariden mit Hilfe von Perjodat

Aus dem Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Institut für Chemie, Heidelberg
(Eingegangen am 4. August 1964)

Ketoside der Lactaminsäure ergeben nach Einwirkung von NaJO_4 , von NaBH_4 und Säurehydrolyse eine *N*-Acetyl-heptulosaminsäure. Ist die Sialinsäure mit dem C-Atom 6 einer Hexopyranose verknüpft, so entsteht dabei das Glycerin-(1)-ketosid dieser Heptulosaminsäure. Für 7 Oligosaccharide aus Frauenmilch bzw. Kuh-Colostrum, bei denen die Verknüpfungsstellen des Sialinsäurerestes noch unbekannt waren, ließen sich die Strukturformeln ermitteln. In der Dilactaminyllactose aus Kuh-Colostrum sind die beiden Sialinsäurereste direkt miteinander in 2→8-Stellung verbunden.

Die Polyalkohole, die durch Reduktion der bei der Perjodatoxydation von Polysacchariden erhaltenen Polyaldehyde entstehen, sind schon durch $0.1n \text{ H}_2\text{SO}_4$ bei Raumtemperatur hydrolysierbar¹⁾. Dabei bleiben die glykosidischen Bindungen an Hexopyranosen, die keine vicinalen OH-Gruppen besitzen (3- oder 2,4-substituierten), erhalten. Aus Hexosen, die durch Perjodat zwischen C-2 und C-3 oder zwischen C-3 und C-4 gespalten werden, entstehen leicht hydrolysierbare Acetale des Glykol- bzw. Glycerinaldehyds. Aus diesen erhält man im Falle der Spaltung zwischen C-2 und C-3 einen Tetrat, im Falle der Spaltung zwischen C-3 und C-4 Glycerin. Wir haben untersucht, ob dieses Verfahren, das sich mit kleinen Substanzmengen durchführen läßt, geeignet ist, um bei sialinsäurehaltigen Oligosacchariden die Verknüpfungsstelle der Säure mit dem neutralen Kohlenhydratteil zu ermitteln.

A. DIE *N*-ACETYL-HEPTULOSAMINSÄURE

Alle geprüften Lactaminsäure^{*)}-haltigen Oligosaccharide, auch das Methylglykosid der Lactaminsäure, lieferten nach Perjodatoxydation, Reduktion mit NaBH_4 und partieller Hydrolyse eine Substanz von $R_{LS} 1.32^{**})$, die positive Ehrlich-Reaktion, aber im Gegensatz zu Lactaminsäure (LS) unter den üblichen Bedingungen keine Reaktion mit NaJO_4 /Benzidin gibt. Es handelt sich um das niedrigere Homologe der Lactaminsäure mit nur 7 C-Atomen (außer der Acetaminogruppe). Wir bezeichnen diese *N*-Acetyl-heptulosaminsäure im folgenden als C_7LS . Zur präparativen Gewinnung sind wir von 3'-LS-Lactose²⁾ ausgegangen.

Die C_7LS kristallisierte nicht und zersetzte sich leicht. Mit *o*-Phenylendiamin lieferte sie ein kristallisiertes Chinoxalinderivat, Zers.-P. 204–206°; $[\alpha]_D^{20}$: -112° (in Dimethyl-

*) Lactaminsäure (LS) = *N*-Acetyl-neuraminsäure.

***) Zu den hier und im folgenden angegebenen *R*-Werten s. S. 404.

1) I. J. GOLDSTEIN, G. M. HAY, B. A. LEWIS und F. SMITH, Abstr. Paper Amer. chem. Soc. 135, 3 D [1959].

2) R. KUHN und R. BROSSMER, Chem. Ber. 89, 2013 [1956].

sulfoxyd/Wasser 1:1)*). Die C₇LS liefert bei der Reaktion mit Perjodsäure/Thiobarbitursäure nach AMINOFF³⁾ den gleichen Farbstoff (Spektrum) wie LS. Wenn die Reaktion unter Standardbedingungen, d. h. mit saurer Perjodsäurelösung ausgeführt wird, ist die Farbstoffausbeute bei C₇LS erheblich niedriger als bei LS. Oxydiert man dagegen bei pH 7.25, ist der Unterschied zwischen C₇LS und LS geringer.

Durch Oxydation/Reduktion von LS-Methylglykosid erhielten wir kristallisiertes C₇LS-Methylglykosid (R_{LS} 1.61), $[\alpha]_D$: -62.3° (in Methanol). Es läßt sich mittels Kationenaustauschers in absol. methanolischer Lösung in den ebenfalls kristallisierten Methyl ester des C₇LS-Methylglykosids überführen (Zers.-P. 107–109°; R_{LS} 3.92).

Bei der Farbreaktion mit Resorcin⁴⁾ zeigt C₇LS-Methylglykosid im Vergleich zu LS eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 580 nach 630 m μ und eine Erhöhung der Farbstoffausbeute. Bei der Ehrlich-Reaktion⁵⁾ verhalten sich die molaren Extinktionen von LS und C₇LS etwa wie 1:3.

B. DIE ISOMEREN LACTAMINYL-LACTOSEN

Wir haben die Methode der Perjodatoxydation mit anschließender Reduktion zunächst an den beiden isomeren LS-Lactosen geprüft, bei denen die Verknüpfungsstelle der LS bekannt war. Die 3'-LS-Lactose aus Kuh-Colostrum, deren Konstitution von KUHN und BROSSMER⁶⁾ durch Permethylierung bewiesen worden war, lieferte dabei, der Erwartung entsprechend, C₇LS und D-Galaktosyl(1→2)erythrit.

Auch für 6'-LS-Lactose⁷⁾ (VII) aus Frauenmilch war die Verknüpfungsstelle der LS durch Methylierung, bei der 2.3.6-Trimethyl-glucose und 2.3.4-Trimethyl-galaktose erhalten wurden, gesichert. Nach Behandlung mit Perjodat, NaBH₄ und partieller Hydrolyse erhielten wir C₇LS, Erythrit und Glycerin (Formelschema 2). Das Auftreten von Erythrit schließt eine Verknüpfung der LS mit C-2 oder C-3 der Glucose aus; aus der Bildung von Glycerin geht hervor, daß sie nicht an C-3 oder C-4 der Galaktose gebunden sein kann. Damit bleiben als mögliche Verknüpfungsstellen C-6 der Glucose sowie C-2 und C-6 der Galaktose. Im Falle der Bindung an C-6 der Glucose wäre bei der Hydrolyse das intermediäre Auftreten von C₇LS-Erythrit zu erwarten, bzw. bei Bindung an C-6 der Galaktose das von C₇LS-Glycerin.

Wie sich beim Abbau der 3'-LS-Lactose gezeigt hatte, sind ketosidische Derivate der C₇LS sehr säurelabil und werden (ebenso wie die der LS) bei pH 1.5 schon bei Raumtemperatur allmählich gespalten. Um das Auftreten eines Erythrit- oder Glyceringlykosids der C₇LS zu beobachten, haben wir die Eigenhydrolyse des Reduktionsprodukts der mit Perjodat oxydierten 6'-LS-Lactose chromatographisch verfolgt. Als

*) Zum Vergleich haben wir auch LS (aus 3'-LS-Lactose und synthet. LS) mit *o*-Phenylendiamin umgesetzt. Der Schmelzpunkt des Chinoxalinderivats lag in beiden Fällen bei 229°, während R. KUHN und G. BASCHANG, Liebigs Ann. Chem. 659, 156 [1962], 204 bis 205° angegeben hatten. $[\alpha]_D$: -100° ($c = 0.27$, in DMSO/Wasser 1:1) wie früher.

3) D. AMINOFF, Biochem. J. 81, 384 [1961].

4) L. SVENNERHOLM, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 24, 604 [1957].

5) I. WERNER und L. ODIN, Acta Soc. med. Upsaliensis 57, 230 [1952].

6) R. KUHN und R. BROSSMER, Chem. Ber. 92, 1667 [1959].

7) R. KUHN, Naturwissenschaften 46, 43 [1959]. Die Beschreibung der Methylierung, die noch nicht veröffentlicht wurde, bringen wir im experimentellen Teil.

erste Hydrolyseprodukte fanden wir Erythrit und eine Substanz mit dem R_{LS} -Wert 1.15, die positive Ehrlich-Reaktion und schwach positive Reaktion mit Perjodat/Benzidin zeigte. Wir isolierten sie mit Hilfe eines Streifenchromatogramms. Sie lieferte bei der Säurehydrolyse Glycerin und C_7LS . Es handelt sich also um C_7LS -Glycerin, das nur entstanden sein kann, wenn die LS an C-6 der Galaktose gebunden war. Damit wird das Ergebnis der Permethylierung der 6'-Lactaminyllactose bestätigt.

C. SIALINSÄURE IN 3-STELLUNG DER GALAKTOSE

Ein in Kuh-Colostrum in sehr geringer Menge vorkommender LS-Zucker ($R_{3'-LS-Lactose}$ 1.39), der bei gelinder Hydrolyse Galaktose und LS liefert, ergab nach Oxydation, Reduktion und Hydrolyse C_7LS und Lyxit (\equiv Arabit); es muß daher *3-LS-Galaktose* vorliegen.

Den gleichen LS-Zucker haben KUHN und WIEGANDT durch Acetolyse aus Gangliosid G_1^8) und aus 3'-LS-Lactose⁹⁾ sowie durch Ozonabbau und Fragmentierung von Gangliosid G_{Gal}^9) erhalten und durch Perjodatabbau zu Lyxose die 3-Verknüpfung der LS bewiesen.

Rohe 3'-LS-Lactose-Präparate aus Kuh-Colostrum enthalten eine *N*-Glykolylnuraminyl-lactose ($R_{3'-LS-Lactose}$ 0.82). Das partielle Hydrolysat der oxydierten und reduzierten Verbindung zeigt chromatographisch Galaktosyl-erythrit: der Sialinsäurerest muß also, wie in der 3'-LS-Lactose, die *3-Stellung der Galaktose* besetzen. Außerdem entsteht eine Ehrlich-positive Substanz (R_{LS} 1.07), welche die der C_7LS entsprechende *N*-Glykolyl-heptulosaminsäure sein dürfte.

Nach KUHN und WIEGANDT¹⁰⁾ bildet die 3'-[*N*-Glykolylnuraminyl]-lactose den Kohlehydratteil eines Gangliosids, das aus Rindererythrocytenstroma und aus Rindermilz isoliert wurde. Der Strukturbeweis wurde geführt durch Spaltung zu Lactose und *N*-Glykolylnuraminsäure (RDE sowie saure Partialhydrolyse) und durch Perjodatoxydation, bei der Galaktose erhalten bleibt.

Im *LS-Tetrasaccharid a* (*Pentasaccharid a*)¹¹⁾ (I), das durch Säure oder Neuramidase in LS und Lacto-*N*-tetraose zerlegt wird, bleiben bei der Perjodatoxydation beide Galaktosereste der Lacto-*N*-tetraose erhalten; während aus Lacto-*N*-tetraose durch Oxydation, Reduktion und vorsichtige Hydrolyse GlcNAc-Gal-Erythrit entsteht, liefert das LS-Tetrasaccharid eine chromatographisch langsamere Substanz (III, Formelschema 1). Diese ergibt bei der Totalhydrolyse relativ mehr Galaktose und bei partieller Hydrolyse neben anderen Bruchstücken die Lacto-*N*-biose I¹²⁾, Gal(1 \rightarrow 3)GlcNAc (IV), die sich papierchromatographisch leicht identifizieren läßt, da sie die Morgan-Elson-Reaktion schon nach Einwirkung von kaltem Alkali gibt. Da mithin der endständige Galaktoserest der Lacto-*N*-tetraose im LS-Tetrasaccharid durch Perjodat nicht angegriffen wird, muß die LS die *3-Stellung des endständigen Galaktoserestes* besetzen.

Dieses Ergebnis ließ sich mit Hilfe des alkalischen Abbaus von LS-Tetrasaccharid a bestätigen: er führt unter Abbau von Glucose und der anschließenden Galaktose zur Bildung

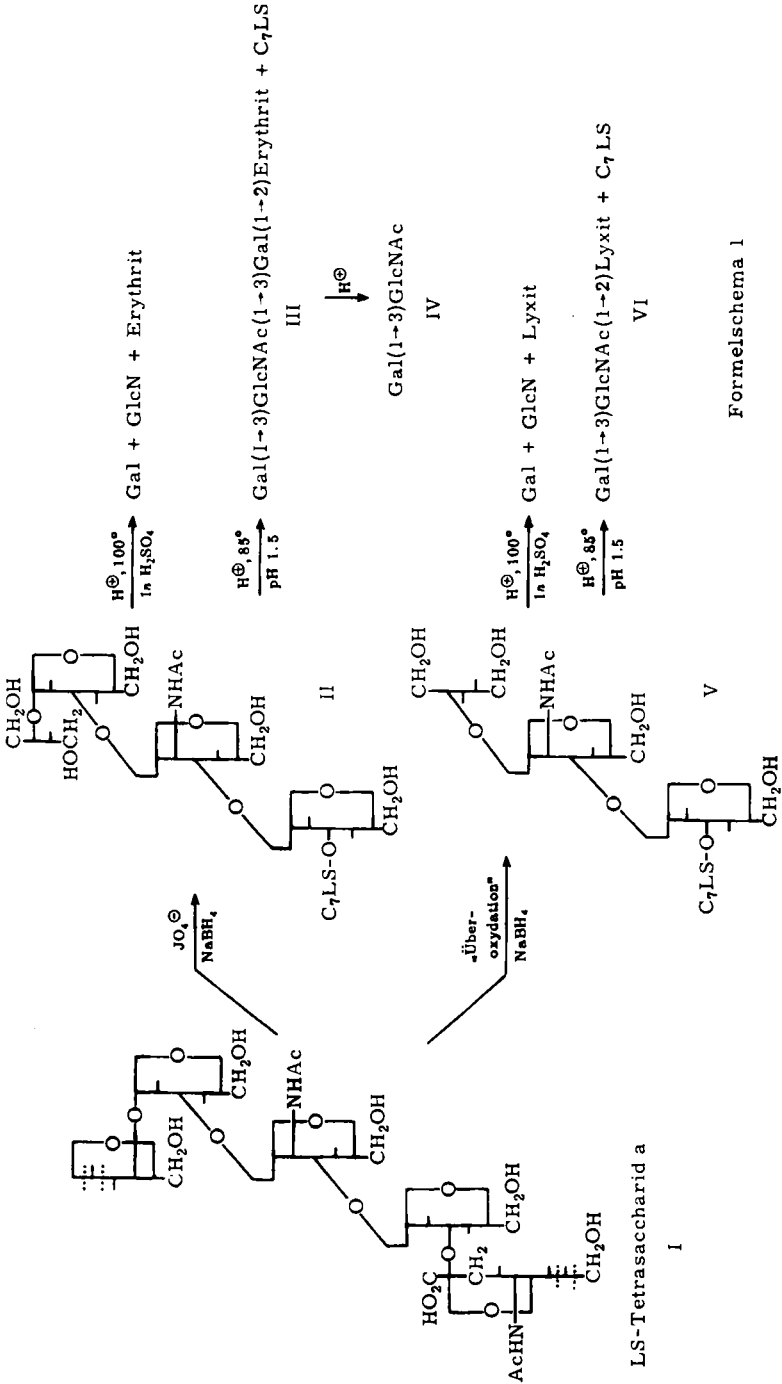
8) R. KUHN und H. WIEGANDT, Chem. Ber. 96, 866 [1963].

9) R. KUHN und H. WIEGANDT, Z. Naturforsch. 19b, 256 [1964].

10) R. KUHN und H. WIEGANDT, unveröffentlicht.

11) R. KUHN und A. GAUHE, Chem. Ber. 95, 513 [1962].

12) R. KUHN, A. GAUHE und H. H. BAER, Chem. Ber. 87, 289 [1954].



von Chromogen I (und wenig Chromogen III)¹³) aus dem GlcNAc-Rest unter Eliminierung von LS(2→3)Galaktose. Diese konnten wir durch chromatographischen Vergleich mit LS(2→3)Galaktose aus Kuh-Colostrum und durch Hydrolyse zu LS und Galaktose identifizieren.

Dilactaminyllactose (XX, aus Kuh-Colostrum) liefert ebenso wie 3'-LS-Lactose und 3'-[N-Glykolylnuraminyllactose Galaktosyl(1→2)erythrit. Einer der beiden Lactaminsäurereste muß also die 3-Stellung der Galaktose besetzen. Bezüglich der Stellung des zweiten LS-Restes s. Absatz F.

D. SIALINSÄURE IN 6-STELLUNG DER GALAKTOSE

Analog der 6'-LS-Lactose (s. o.) verhält sich *LS-N-Acetyl-lactosamin* (X) ($R_{3'}\text{-LS-Lactose 1.0}$), das wir bei der Reinigung von rohen 3'-LS-Lactose-Präparaten aus Kuh-Colostrum isoliert haben. Nach Oxydation und Reduktion erhält man bei vorsichtiger Hydrolyse neben 2-Desoxy-2-acetamino-sorbit zunächst $C_7\text{LS}(2\rightarrow 1)\text{Glycerin}$ (Formelschema 2), wodurch die *Verknüpfung der LS mit C-6 der Galaktose* bewiesen ist.

Im *LS-Tetrasaccharid c*¹¹⁾ (*Pentasaccharid c, XII*) aus Frauenmilch ist die LS mit Lacto-*N*-neotetraose¹⁴) verknüpft. Oxydation, Reduktion und vorsichtige Hydrolyse führen auch hier zu $C_7\text{LS-Glycerin}$, daneben entsteht GlcNAc-Gal-Erythrit (Formelschema 2). Die Lactaminsäure ist also mit *C-6 der endständigen Galaktose* verknüpft.

E. SIALINSÄURE IN 6-STELLUNG VON HEXOSAMIN

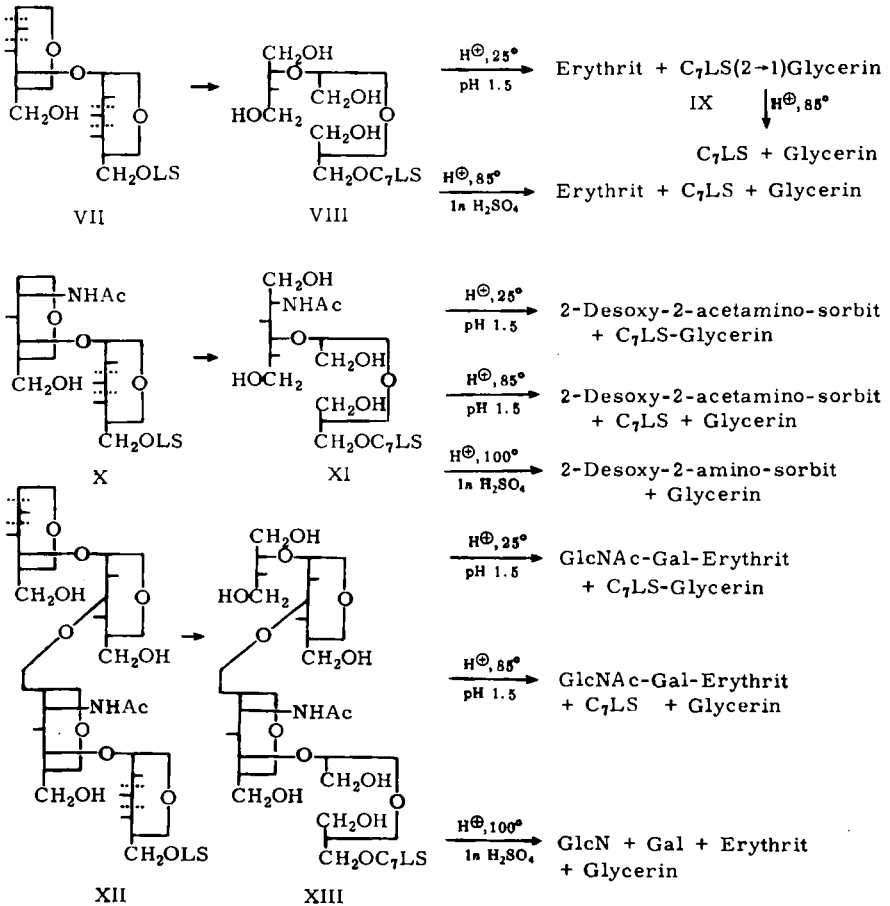
Das *LS-Tetrasaccharid b*¹¹⁾ (*Pentasaccharid b, XIV*), das aus Lacto-*N*-tetraose und LS aufgebaut ist, lieferte nach Oxydation/Reduktion und vorsichtiger Hydrolyse unter Abspaltung von Glycerin ein (chromatographisch langsames) Ehrlich-positives Produkt (XVI, Formelschema 3), aus dem durch Abspaltung von $C_7\text{LS}$ der GlcNAc-Gal-Erythrit gebildet wurde. Die LS kann also nicht an die endständige Galaktose gebunden sein, da die $C_7\text{LS}$ nach Hydrolyse des entstandenen Glykolaldehyd-acetals sonst mitentfernt worden wäre; auch C-2 und C-3 der Glucose scheiden als Verknüpfungsstellen der LS aus. Die *Verbindung aus $C_7\text{LS}$ und GlcNAc-Gal-Erythrit* isolierten wir mit Hilfe eines Papierchromatogramms und führten eine neue Oxydation/Reduktion mit ihr durch. Bei der Totalhydrolyse erhielten wir nun Glycerin und Galaktose; Glucosamin und Erythrit waren nicht mehr vorhanden. Damit war eine Verknüpfung der LS mit C-6 der Glucose sowie mit C-3 oder C-4 des Acetylglucosaminrestes ebenfalls ausgeschlossen. Bei vorsichtiger Hydrolyse gelang es nicht, ein $C_7\text{LS}$ -haltiges Bruchstück zu bekommen.

Um zwischen den verbleibenden Verknüpfungsmöglichkeiten: C-2, C-4 und C-6 der Galaktose sowie C-6 des *N*-Acetylglucosamins zu entscheiden, haben wir eine weitere Probe des LS-Tetrasaccharids b vom reduzierenden Ende her „überoxydiert“.

Oligosaccharide mit einer an C-3 oder C-4 substituierten Hexopyranose als reduzierendem Ende unterliegen bei der Oxydation mit überschüssigem Perjodat stets zu einem gewissen Teil der „Überoxydation“, auch wenn der pH-Wert der Oxydationslösung auf 4.3–4.5 gehalten wird. Folgt auf die reduzierende Endgruppe eine an C-3 substituierte Hexopyranose mit freiem Hydroxyl an C-2, so führt die „Überoxydation“

¹³⁾ R. KUHN und G. KRÜGER, Chem. Ber. **89**, 1473 [1956]; **90**, 264 [1957].

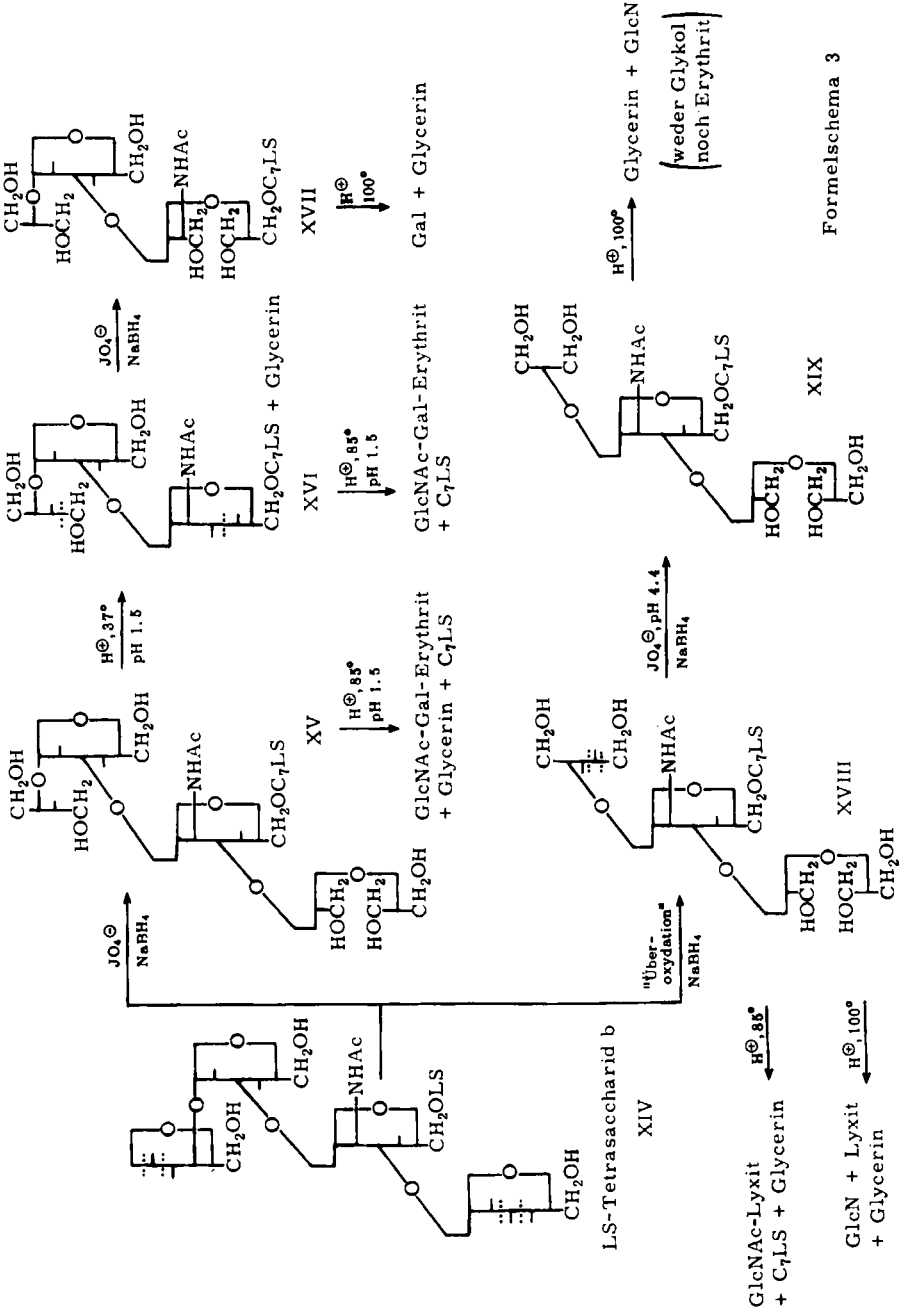
¹⁴⁾ R. KUHN und A. GAUHE, Chem. Ber. **95**, 518 [1962].



Formelschema 2

nach vollständiger Entfernung des ersten Zuckerrestes zur Bildung einer Pentose aus dem zweiten Zuckerrest, bzw. bei nachfolgender Reduktion zur Bildung des entsprechenden Pentits. So erhielten wir z. B. aus Lacto-*N*-tetraose neben GlcNAc-Gal-Erythrit stets etwas GlcNAc-Lyxit. Überoxydation kann nur eintreten, wenn die bei der Oxydation des kopfständigen Hexoserestes aus dem C-Atom 1 entstehende Formylestergruppe verseift wird. Um das zu erreichen, haben wir die mit NaJO₄ bei pH 4.4 oxydierte Lösung nach Zerstörung von überschüssigem Perjodat auf pH 7.5 gebracht und 1 Stde. stehengelassen. Anschließend wurde erneut mit Perjodat bei pH 4.4 oxydiert und mit NaBH₄ reduziert. Unter diesen Bedingungen verläuft die Überoxydation nahezu quantitativ, ohne daß weitergehender Abbau des zweiten Hexoserestes eintritt.

Da die „vordere“ Galaktose des so behandelten LS-Tetrasaccharids b in Lyxit übergeht, muß das Hydroxyl an C-2 der Galaktose frei sein: die LS kann also nicht



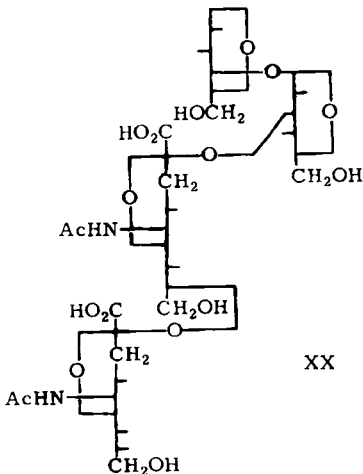
an C-2 der Galaktose gebunden sein. Bei einer Verknüpfung mit C-4 bzw. C-6 der vorderen Galaktose wäre bei einer weiteren Oxydation/Reduktion das Auftreten von Erythrit bzw. von Glykol als Hydrolyseprodukt zu erwarten. Beide waren nicht nachzuweisen, das Totalhydrolysat zeigte chromatographisch nur Glucosamin und Glycerin. Damit bleibt als Verknüpfungsstelle der LS nur C-6 des *Acetylglucosaminrestes*.

Dieser Befund ließ sich mit Hilfe des alkalischen Abbaus von LS-Tetrasaccharid b bestätigen. Durch Alkali-Behandlung konnten GOTTSCHALK und GRAHAM¹⁵⁾ die prosthetische Gruppe von Schaf- und Rinder-Submaxillaris-mucopolysaccharid in die Sialyl-Chromogene I und III überführen, die mit Neuraminidase in *N*-Acetyl-neuraminsäure und die Chromogene I und III der Morgan-Elson-Reaktion gespalten werden. Die Tatsache, daß bei der Chromogenbildung aus dem *N*-Acetyl-hexosamin die Sialinsäure nicht eliminiert wird, war beweisend für ihre Verknüpfung mit C-6 des Hexosamins. Beim LS-Tetrasaccharid b fanden wir, daß durch Behandlung mit heißem Alkali unter Abbau der beiden vorderen Zucker der Lacto-*N*-tetraose und unter Abspaltung der endständigen Galaktose aus der 3-Stellung des Hexosamins ebenfalls zwei LS-Chromogene gebildet werden, von denen das chromatographisch langsamere die Hauptmenge ausmacht. Bei der RDE-Spaltung erhielten wir LS und Chromogen I (Chromogen III war im RDE-Ansatz nicht nachzuweisen).

Nach der Oxydation von XVI bei pH 4.4 wäre bei vorsichtiger Hydrolyse das intermediäre Auftreten von C₇LS-Glycerin zu erwarten gewesen. Es gelang uns jedoch nicht, das aus dem *N*-Acetyl-glucosaminrest gebildete Acetal des Acetaminoglycerinaldehyds zu spalten, ohne zugleich die C₇LS in Freiheit zu setzen.

F. 2→8-VERKNÜPFUNG VON 2 SIALINSÄURERESTEN

Wie unter C. ausgeführt wurde, ist in der Dilactaminyllactose (XX) einer der beiden LS-Reste mit dem C-Atom 3 der Galaktose verknüpft. Verschiedene Tatsachen, über die wir in einer folgenden Veröffentlichung¹⁶⁾ berichten werden, hatten uns zu der Annahme geführt, daß die beiden LS-Reste ketosidisch in 2→8- oder 2→9-Verknüpfung miteinander verbunden sind.



Nach Oxydation/Reduktion erhielten wir bei partieller Hydrolyse außer C₇LS zunächst wenig unveränderte LS, deren Menge mit fortschreitender Hydrolyse zunahm. Offenbar besitzt einer der beiden LS-Reste keine durch Perjodat angreifbare Glykolgruppierung. Wir schließen daraus auf eine 2→8-Verknüpfung der beiden LS-Reste in XX.

Auf die gleiche Weise konnten KUHN und WIEGANDT¹⁷⁾ für die Ganglioside G_{III} und G_{IV} die 2→8-Verknüpfung von 2 LS-Resten beweisen.

Die Dilactaminyllactose LS(2→8)LS(2→3)-Gal(1^β→4)Glc (XX) verliert schon beim Gefrier-trocknen der sauren wäßrigen Lösung Wasser unter Bildung eines Lactons¹⁶⁾, das mit Hydro-

15) A. GOTTSCHALK und E. R. B. GRAHAM, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **34**, 380 [1959]; E. R. B. GRAHAM und A. GOTTSCHALK, ebenda **38**, 513 [1960].

16) R. KUHN und A. GAUHE, in Vorbereitung.

xylamin eine Hydroxamsäure (FeCl₃-Reaktion) liefert. Dieses Lacton ergibt nach Oxydation mit Perjodat, Reduktion mit NaBH₄ und Säurehydrolyse den der C₇LS entsprechenden Alkohol mit kopfständiger CH₂OH-Gruppe (Heptulosaminol). Daraus geht hervor, daß es die CO₂H-Gruppe des endständigen LS-Restes ist, die unter Bildung eines Lactons (Esters) Wasser abspaltet.

Dilactaminyllactose weist also ebenso wie die Ganglioside G_{III} und G_{IV} den gleichen Verknüpfungstyp der Sialinsäurereste auf, wie ihn MCGUIRE und BINKLEY¹⁸⁾ für Colominsäure auf Grund des Perjodatverbrauchs bei der Oxydation bewiesen haben. Auch dort wurde Lactonbildung beobachtet.

Zusammenfassend ergibt sich, daß unter den von uns isolierten sauren Oligosacchariden der Milch 4 Typen vorkommen, bei denen die Sialinsäurereste entweder in 3- oder 6-Stellung mit Galaktose oder in 6-Stellung mit Hexosamin oder in 2.8-Stellung miteinander verknüpft sind.

Die Verknüpfung mit Galaktose findet man auch in den Gangliosiden sowie im Fetuin¹⁹⁾ und im sauren α₂-Glykoprotein aus menschlichem Serum²⁰⁾, die 6-Verknüpfung mit Hexosamin im Submaxillarismucin¹⁵⁾ und die 2.8-Verknüpfung untereinander in den Gangliosiden G_{III} und G_{IV}¹⁷⁾ und in der Colominsäure¹⁸⁾.

Eine Verknüpfung mit C-4 von Galaktose, wie sie EYLAR und JEANLOZ²¹⁾ auf Grund von Perjodatversuchen für Orosomucoid annehmen, findet sich bei keinem unserer Oligosaccharide. Aus Permethylierungsversuchen schließen JEANLOZ und CLOSSE²²⁾, daß die Sialinsäurereste in Orosomucoid z. T. auch an C-3 und C-6 der Galaktose gebunden sind.

ROSEMAN und Mitarbb. fanden eine Reihe von Transferasen, welche Sialinsäure von CMP-Sialinsäure auf geeignete Acceptoren übertragen. Die Einführung von Sialinsäure in C-3 von Galaktose bei Lactose und anderen Oligosacchariden mit endständigem β-Galaktosyl-Rest gelang mit Hilfe eines zellfreien Enzympräparats aus Ratten-Milchdrüsen²³⁾. Aus Submaxillaridrüsen von Schafen wurden Transferasepräparate gewonnen, die ebenfalls 3'-LS-Lactose synthetisieren; überdies bewirken sie bei mit Neuraminidase hergestelltem Desialomucoid die Einführung von Sialinsäureresten wahrscheinlich in die Hexosaminreste²⁴⁾. Ein Präparat aus *E. coli* K 235 bewirkt die Synthese von Colominsäure, also die Verknüpfung von Sialinsäureresten in 2.8-Stellung²⁵⁾. Eine Transferase aus Colostrum von Ziege und Mensch bewirkt die Übertragung von Sialinsäure auf Lactose, wahrscheinlich in 6-Stellung der Lactose²⁶⁾.

Über die Synthese eines Monosialo-gangliosids mit Hilfe eines Präparats aus Rattennieren wurde kürzlich berichtet²⁷⁾. Dabei wird offenbar die Sialinsäure in die 3-Stellung der „vorderen“ Galaktose der Ganglio-N-tetraose eingeführt.

17) R. KUHN und H. WIEGANDT, Z. Naturforsch. **18 b**, 541 [1963].

18) E. J. MCGUIRE und S. B. BINKLEY, Biochemistry **3**, 247 [1964].

19) R. G. SPIRO, J. biol. Chemistry **239**, 567 [1964].

20) S. KAMIYAMA und K. SCHMIDT, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **49**, 250 [1961].

21) E. H. EYLAR und R. W. JEANLOZ, J. biol. Chemistry **237**, 1021 [1962].

22) R. W. JEANLOZ und A. CLOSSE, Federat. Proc. **22**, 536 [1963].

23) G. W. JOURDIAN, D. M. CARLSON und S. ROSEMAN, Biochem. biophysic. Res. Commun. **10**, 352 [1963].

24) D. M. CARLSON, E. J. MCGUIRE, G. W. JOURDIAN und S. ROSEMAN, Federat. Proc. **23**, 380 [1963].

25) D. AMINOFF, F. DODYK und S. ROSEMAN, J. biol. Chemistry **238**, PC 1177 [1963].

26) Briefliche Mitteilung von S. ROSEMAN.

27) J. N. KANFER, R. S. BLACKLOW, L. WARREN und R. O. BRADY, Biochem. biophysic. Res. Commun. **14**, 287 [1964].

Fräulein D. TSCHAMPEL danken wir für eifrige Mitarbeit und Herrn H. TRISCHMANN für Methylierungsversuche. Für gaschromatographische Identifizierungen methylierter Zucker haben wir Herrn Dr. H. EGGE zu danken.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Papierchromatographie: Als Lösungsmittel verwendeten wir Äthylacetat/Pyridin/Wasser/Eisessig 5:5:3:1 (Lm I); Äthylacetat/Eisessig/Wasser 7:2:2 (Lm II); n-Butanol/Pyridin/Wasser 6:4:3 (Lm III). In Lm I chromatographierten wir absteigend oder aufsteigend, in Lm II und III nur absteigend.

Bei der Chromatographie in Lm I und in Lm III benützten wir im allgemeinen das Papier 2043 b mgl von Schleicher & Schüll; für Streifenchromatogramme 2043 b ausgew. Für die Chromatographie in Lm II wurde nur das ausgewaschene Papier benutzt. In diesem Lm laufen C₇LS sowie die Methylketoside von LS und von C₇LS verschieden schnell, je nachdem, ob man Lösungen der freien Säuren oder der Natriumsalze auf das Papier aufträgt. Die gleichen R_F-Werte wie mit Natriumsalzlösungen erhält man, wenn man vor dem Aufbringen der sauren Substanzlösungen dicht über den Startpunkten je einen Tropfen 0.5 m Natriumacetat aufträgt (s. Tab. 1). Zur Bestimmung der R_{LS}-Werte von LS-haltigen Substanzen mit freier (nicht veresterter) Carboxylgruppe in Lm II haben wir uns stets dieser Methode bedient.

Die Laufstrecken haben wir bei der absteigenden Chromatographie in Lm I auf 3'-LS-Lactose = 1 bezogen (R_{3'-LS-Lactose}-Werte), in Lm II auf LS (Natriumsalz) = 1. Bei der aufsteigenden Chromatographie in Lm I sowie bei der absteigenden in Lm III geben wir R_F-Werte an.

Die R-Werte von LS, C₇LS und einigen ihrer Derivate sind in Tab. I zusammengefaßt; chromatographische Daten der (Ehrlich-negativen) Hydrolysenprodukte der oxydierten und reduzierten Oligosaccharide in Tab. 2.

Zum Sichtbarmachen der Substanzen dienten folgende Reagenzien: Ehrlich-Reagenz (E); Anilinhydrogenphthalat (AP); Perjodat/Benzidin (JO₄[⊖]); Morgan-Elson-Reagenz (ME; KOH/Äthanol/Butanol 10 Min. 105°, dann p-Dimethylamino-benzaldehyd/HCl/Äthanol/Butanol); p-Dimethylamino-benzaldehyd/HCl/Äthanol/Butanol (p-DAB; für Chromogene aus Hexosamin), Ninhydrin und Chlor/Benzidin nach GREIG und LEABACK²⁸⁾.

LS-haltige Oligosaccharide: 3'-LS-Lactose wurde nach KUHN und BROSSMER²⁾ aus Kuh-Colostrum hergestellt. Ebenfalls aus Kuh-Colostrum erhielten wir die Dilactaminyllactose sowie (geringe Mengen) 3-LS-Galaktose, 6'-LS-N-Acetyl-lactosamin und 3'-[N-Glykolylnuraminyl]-lactose, über deren Gewinnung gesondert berichtet werden wird¹⁰⁾. Die Isolierung der drei LS-Tetrasaccharide a, b und c aus Frauenmilch haben wir früher¹¹⁾ beschrieben. Aus den dabei anfallenden LS-Lactose-Fractionen wurde die 6'-LS-Lactose in der gleichen Weise wie die LS-Tetrasaccharide — nämlich durch Chromatographie an Cellulosesäulen und nochmalige Reinigung über Ionenaustauscher — gewonnen. Aus 1 l Frauenmilch erhielten wir 200–400 mg 6'-LS-Lactose. R_{3'-LS-Lactose} = 0.76 (Lm I, abst.).

Partielle Hydrolyse von 6'-LS-Lactose: 300 mg Substanz in 6 ccm 0.01 n H₂SO₄ wurden 64 Stdn. bei 40° stehengelassen. Die mit Bariumacetat von SO₄^{2⊖} befreite Lösung wurde über IR 120 (H[⊖]) (Säule 1.2 × 20 cm) und anschließend über Anionenaustauscher MIH (CH₃CO₂[⊖]) (1.8 × 20 cm) filtriert. Filtrat und Waschwasser der MIH-Säule enthielten 144 mg (85 %) rohe Lactose. Nach Umkristallisieren aus 75-proz. Äthanol [α]_D²⁵: +54.6° (c = 1, Wasser). Debye-Scherrer-Diagramm übereinstimmend mit dem von Lactose.

²⁸⁾ C. G. GREIG und D. H. LEABACK, Nature **188**, 310 [1960].

Tab. 1. R_F -Werte von LS und C_7 LS sowie von Derivaten

	Lm I	Lm II	
	R_F	R_{LS} -Natriumsalz	
		a)	b)
LS	0.20	1.0	etwas schneller, lang gestreckt
LS-Methylester	0.64	2.16	2.14
LS-Methylglykosid	0.21	1.20	1.98
LS-Methylester-methylglykosid	0.72	2.95	2.95
C_7 LS	0.28	1.32	1.60
C_7 LS-Methylglykosid	0.29	1.61	3.00
C_7 LS-Methylester-methylglykosid	0.81	3.92	3.92

a) Über dem Startfleck 0.5 *m* Natriumacetat aufgetragen. b) Ohne Natriumacetat.

Tab. 2. R_F -Werte und Farbreaktionen.

AP = Anilinhydrogenphthalat, ME = Morgan-Elson-Reaktion (ohne Acetylaceton)

	R_F	AP	ME	Cl_2 / Benzidin
	Lm I aufst.			
Glykol	0.67–0.72	—	—	—
Glycerin	0.57–0.62	—	—	—
Erythrit	0.48–0.54	—	—	—
Lyxit (= Arabit)	0.42–0.47	—	—	—
2-Desoxy-2-acetamino-sorbit	0.43–0.47	—	—	+
2-Desoxy-2-acetamino-glucose (GlcNAc)	0.50–0.53	+	+	+
2-Desoxy-2-amino-sorbit ^{a)}	0.19–0.24	—	—	+
2-Desoxy-2-amino-glucose ^{a)} (GlcN)	0.23–0.27	+	—	+
Galaktose	0.31–0.37	+	—	—
GlcNAc(1→2)Lyxit	0.31–0.38	—	—	+
Gal(1→2)Erythrit	0.30–0.33	—	—	—
Gal(1→3)GlcNAc (Lacto- <i>N</i> -biose I)	0.33–0.36	+	+ ^{b)}	+
GlcNAc(1→3)Gal (Lacto- <i>N</i> -biose II)	0.25–0.27	+	+	+
Gal(1→3)Acetaminosorbit	0.24–0.28	—	—	+
GlcNAc(1→3)Gal(1→2)Erythrit	0.21–0.27	—	—	+
Gal(1→3)GlcNAc(1→3)Gal(1→2)Erythrit	0.11–0.13	—	—	+

a) Positive Reaktion mit Ninhydrin. b) Schon nach Einwirkung von kaltem Alkali.

Alle Substanzen in Tab. 2 geben positive Reaktion mit Perjodat/Benzidin; GlcNAc und GlcN nur schwach, die beiden Lacto-*N*-biosen sehr schwach. Die Schwankungsbreite der an sich scharfen R_F -Werte ist bedingt durch geringe Änderungen in der Zusammensetzung des Lösungsmittels infolge der Flüchtigkeit des Äthylacetats.

Die MIH-Säule wurde mit 0.05 *m* Natriumacetat eluiert. Aus dem Ehrlich-positiven Eluat erhielten wir (nach Entfernen der Na^+ -Ionen mit IR 120 und der CH_3CO_2H durch vorsichtiges Abdampfen i. Vak. mit Wasser und Gefriertrocknen) 139 mg (95%) LS. Umkristallisation aus $H_2O/CH_3OH/ACOH/P\ddot{A}$ nach l. c.²⁹⁾ ergab 100 mg *Lactaminsäure*, die nach IR- und Debye-Scherrer-Diagramm mit LS aus 3'-LS-Lactose²⁾ bzw. Schaf-Sialinsäure identisch war.

$C_{11}H_{19}NO_9$ (309.3) Ber. C 42.68 H 6.19 N 4.53 (C)CH₃ 4.86

Gef. C 42.97 H 5.95 N 4.59 (C)CH₃ 4.65

²⁹⁾ G. BLIX, E. LINDBERG, L. ODIN und I. WERNER, Acta Soc. med. Upsaliensis 61, 1 [1956].

120 mg rohe LS aus 6'-LS-Lactose wurden nach KUHN und BROSSMER³⁰⁾ in das Diäthylmercaptal-lacton übergeführt. Ausb. 149 mg, aus heißem Wasser umkristallisiert: 37 mg. $[\alpha]_D^{25}$: -84° ($c = 1$, CH_3OH), Lit.³⁰⁾: -83° ($c = 1$, CH_3OH).

$\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{NO}_7\text{S}_2$ (397.3) Ber. C 45.32 H 6.85 Gef. C 45.43 H 6.53

Permethylierung von 6'-LS-Lactose: 830 mg Substanz wurden in 3 ccm Wasser + 200 ccm Methanol bei 0° bis zur bleibenden Gelbfärbung mit äther. *Diazomethan* behandelt. Der Abdampfückstand wurde in Dimethylformamid bei 0° mit $\text{CH}_3\text{J}/\text{Ag}_2\text{O}$ ³¹⁾ methyliert (48 Std. bei $+4^\circ$, nach nochmaliger Zugabe von CH_3J und Ag_2O weitere 48 Std. bei 20° gerührt). Die methylierte Substanz (775 mg, OCH_3 42.38, bei einem anderen Ansatz 44.12; ber. 45.6) wurde in der gleichen Weise wie das Methylierungsprodukt von 3'-LS-Lactose⁶⁾ weiterbehandelt. Das nach Methanolyse, Abtrennung der methylierten LS und Säurehydrolyse erhaltene Gemisch der methylierten Hexosen (306 mg) wurde nach LEMIEUX³²⁾ an einer Säule aus 110 g Celite mit wassergesättigtem Butanol chromatographiert, wobei wir 60 Fraktionen zu 25 ccm auffingen. Die Frakt. 11–23 (120 mg) enthielten 2.3.6-Trimethyl-glucose, die anfangs von geringen Mengen 2.3.4.6-Tetramethyl-galaktose begleitet war. Aus den Frakt. 24–31 erhielten wir 109 mg 2.3.4-Trimethyl-galaktose, aus den Frakt. 32–34 weitere 13 mg. Die Frakt. 35–60 (45 mg) enthielten anfangs noch etwas 2.3.4-Trimethyl-galaktose, außerdem etwa 5 verschiedene, chromatographisch langsamer wandernde Substanzen, vermutlich Di- und Monomethylhexosen. Frakt. 24–31 wurden i. Hochvak. destilliert: bräunlicher Sirup, kristallisiert nach Animpfen mit authent. 2.3.4-Trimethyl-galaktose beim Stehenlassen an der Luft. Nach Entfärbung mit Carboraffin wurde aus Essigester/Cyclohexan umkristallisiert. $[\alpha]_D^{25}$: $+135^\circ$ (5 Min.) $\rightarrow +108.5^\circ$ (12 Min., konst.) (Mikrorohr, $c = 0.46$, Wasser); Lit.³³⁾ für 2.3.4-Trimethyl-galaktose-Monohydrat: $[\alpha]_D^{25}$: $+135^\circ$ (15 Min.) $\rightarrow +114.5^\circ$ (3 Std., konst., $c = 0.3$, Wasser). Nach IR-Spektrum und Gaschromatogramm identisch mit authent. 2.3.4-Trimethyl-galaktose.

Perjodatoxydation und Reduktion mit NaBH_4 : Die zu oxydierenden Oligosaccharide (bei Ansätzen für chromatographische Zwecke 0.01–0.02 mMol) haben wir in der zur Neutralisation nötigen Menge 0.2n Na_2CO_3 gelöst. Dann gaben wir im Eisbad gleiche Volumina 0.5 m Acetatpuffer pH 4.4 und 0.25 m NaJO_4 -Lösung zu, wobei wir die Perjodatmenge etwa 2–2½ mal so groß wählten, als dem vermutlichen Verbrauch entsprach. Das Oxydationsgemisch wurde mit so viel Wasser versetzt, daß es 0.1 m an NaJO_4 war, und 24–28 Std. bei $+4^\circ$ im Dunkeln stehengelassen. Anschließend zerstörten wir überschüss. Perjodat mit Glykol oder mit Diacetyl.

a) Na^\oplus - und JO_3^\ominus -Ionen (und HCO_2H) entfernten wir über eine kleine Austauschersäule, die über einer Schicht von IR 45 (OH^\ominus) eine IR 120 (H^\oplus)-Schicht enthielt. Das Filtrat wurde gefriergetrocknet, in 0.05–0.2 ccm Wasser aufgenommen und mit einer Kapillare einer eisgekühlten wäßr. Lösung von NaBH_4 (mehrfacher Überschuß) zugetropft. Wir ließen 4 bis 8 Std. bei Raumtemp. stehen, wobei wir nach einigen Stunden noch etwas festes NaBH_4 nachgaben. Zur Zerstörung von überschüss. NaBH_4 wurde die Lösung mit 2n $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ auf pH 6.5 gebracht. Natrium-Ionen entfernten wir mit Hilfe einer kleinen Säule von IR 120 (H^\oplus) und dampften am Rotationsverdampfer — unter mehrmaligem Zusatz von Wasser — bei einer Badtemp. von unter 30° zur Trockne ein. Den Rückstand befreiten wir von Borsäure durch mehrmaliges Abdampfen mit absol. Methanol bei ca. 20° .

30) R. KUHN und R. BROSSMER, *Angew. Chem.* **69**, 534 [1957].

31) R. KUHN, H. TRISCHMANN und I. LÖW, *Angew. Chem.* **67**, 32 [1955].

32) R. U. LEMIEUX, C. T. BISHOP und G. E. PELLETIER, *Canad. J. Chem.* **34**, 1365 [1956].

33) R. A. LAIDLAW und C. B. WYLAM, *J. chem. Soc. [London]* **1953**, 567.

Da bei der Entfernung von JO_3^\ominus mit IR 45 (OH^\ominus) saure Oxydationsprodukte teilweise vom Austauscher festgehalten werden, haben wir bei späteren Versuchen meist nach b) gearbeitet.

b) nach Zerstörung von überschüss. Perjodat brachten wir die Lösung mit $1n$ Na_2CO_3 auf pH 6.5 und ließen sie dann aus einer Mikropipette in eisgekühlte wäßr. NaBH_4 -Lösung tropfen (3–4 Mol NaBH_4 /Mol Perjodat im Oxydationsansatz). Nach mehrstdg. Stehenlassen bei Raumtemp. brachten wir die Lösung mit $2n$ Essigsäure wieder auf pH 6.5 und fällten die gebildeten J^\ominus -Ionen mit heiß gesättigter Silberacetat-Lösung. Nach Absaugen des AgJ über Talcum befreiten wir die Lösung von überschüss. Ag^\ominus - und von Na^\ominus -Ionen mit Hilfe einer IR 120 (H^\ominus)-Säule und verfahren weiter wie unter a).

„Überoxydation“: Nach 24 stdg. Oxydation bei $+4^\circ$ (wie oben) und Zerstörung des überschüss. Perjodats brachten wir die Lösung mit Na_2CO_3 auf pH 7.5–8.0 und ließen 45–60 Min. bei Raumtemp. stehen, um den aus dem kopfständigen Pyranoseresst hervorgegangenen Formylester zu verseifen. Anschließend stellten wir durch Zusatz von Essigsäure wieder auf pH 4.4–5.0 ein. Nach Zugabe eines Perjodat-Überschusses ließen wir zur „Überoxydation“ die Lösung erneut 24 Stdn. bei $+4^\circ$ stehen, zerstörten den Perjodat-Überschuß und verfahren weiter wie unter a) oder b).

Hydrolysen

1. Um die bei der Oxydation/Reduktion gebildeten Glykolaldehyd-acetale möglichst unter Schonung der Ketosidbindung der C_7LS zu hydrolysieren, ließen wir bei pH 1.5 6–12 Stdn. bei Raumtemp. oder 1–2 Stdn. bei 37° stehen. Bei 0.2 m Lösungen genügte die Eigenacidität der C_7LS -haltigen Substanzen; verdünntere Lösungen brachten wir mit 0.2 n H_2SO_4 auf pH 1.5. Unter diesen Bedingungen wird auch C_7LS schon teilweise abgespalten. Bei LS-freien Substanzen nahmen wir den nach Entfernen der Borsäure verbleibenden Rückstand mit 0.05 n H_2SO_4 auf.

2. Zur Abspaltung von C_7LS erwärmten wir 75–90 Min. bei pH 1.5 auf 85° . Dabei findet gleichzeitig Hydrolyse von Acetalen des Glykolaldehyds statt. Glykosidbindungen bleiben erhalten.

3. Zur Totalhydrolyse erwärmten wir 6–12 Stdn. in 0.5 oder $1n$ H_2SO_4 auf 100° . Dabei wird C_7LS zerstört und läßt sich im Chromatogramm nicht mehr nachweisen.

Vergleichssubstanzen aus Lacto-*N*-tetraose; *N*-Acetyl-glucosaminyl(1→3)galaktosyl(1→2)-erythrit und *N*-Acetyl-glucosaminyl(1→2)lyxit: 70 mg Lacto-*N*-tetraose werden in der beschriebenen Weise oxydiert und nach b) weiterverarbeitet. Nach Entfernen der Borsäure zeigt der Rückstand im Papierchromatogramm (Lm I, aufsteigend) mit Perjodat/Benzidin 2 schwache Flecke (R_F 0.32 bzw. 0.40). Durch Hydrolyse (mit 0.5 ccm $n/20$ H_2SO_4 , 75 Min. 85°) entstehen unter Abspaltung von Glycerin (R_F 0.61) 2 chromatographisch langsamere Substanzen von R_F 0.255 [= GlcNAc(1→3)Gal(1→2)Erythrit] bzw. R_F 0.352 [= GlcNAc(1→2)Lyxit, durch Überoxydation entstanden], die mit Perjodat/Benzidin stärker ansprechen. Wir trennten sie mit Hilfe eines Streifenchromatogramms (Lm I absteigend, 30 Stdn.), wobei es nicht nötig war, die Schwefelsäure vorher aus dem Hydrolysat zu entfernen. Die den beiden Substanzen entsprechenden Streifen (deren Lage durch Besprühen schmaler Randstreifen mit Perjodat/Benzidin festgestellt wurde) wurden ausgeschnitten und mit Wasser eluiert. Die Eluate engten wir i. Vak. ein und reinigten sie über kleine Ionenaustauschersäulen (IR 120 und IR 45, je 0.8×2 cm). Gefriertrocknen der Filtrate ergab 26 mg (54%) GlcNAc-Gal-Erythrit bzw. 4.5 mg GlcNAc-Lyxit (13%, bez. auf Lacto-*N*-tetraose). Bei Aufarbeitung des Oxydationsansatzes der Lacto-*N*-tetraose nach a) betrug die Ausbeuten 52% bzw. 11%. Der GlcNAc-Gal-Erythrit, umkristallisiert aus 85-proz. Äthanol,

ergab 18 mg farblose Stäbchen, Zers.-P. 259—261° (Monoskop). Totalhydrolyse führte zu Glucosamin, Galaktose und Erythrit. Nach partieller Hydrolyse (2 mg, mit 0.2 ccm 0.5 *n* H₂SO₄, 15 Min. siedendes Wasserbad) konnten wir chromatographisch alle zu erwartenden Bruchstücke nachweisen: Erythrit, GlcNAc, Gal, Gal-Erythrit, GlcNAc-Gal (= Lacto-*N*-biose II). Bei der Totalhydrolyse von GlcNAc-Lyxit entstanden Glucosamin und Lyxit.

Bei Überoxydation von 35 mg *Lacto-N-tetraose* erhielten wir aus dem Hydrolysat mit Hilfe eines Streifenchromatogramms 9 mg (51 %) *GlcNAc-Lyxit*.

Lactaminsäure wurde nach KUHN und BROSSMER²⁾ aus 3'-LS-Lactose hergestellt. Ein synthetisches Präparat³⁴⁾ verdanken wir Herrn Dr. G. BASCHANG.

Lyxit (Arabit) stellten wir durch Reduktion von Arabinose mit NaBH₄ her.

N-Acetyl-heptulosaminsäure (C₇LS): 1.34 g rohe 3'-LS-Lactose (etwas 6'-LS-Lactose und 6'-LS-*N*-Acetyl-lactosamin enthaltend) in 10 ccm 0.2 *n* Na₂CO₃ versetzte man mit je 85 ccm 0.5 *m* Acetatpuffer (pH 4.4) und 0.25 *m* NaJO₄-Lösung sowie 25 ccm Wasser bei 0° und ließ 28 Stdn. bei +4° stehen. Nach Zerstörung von überschüss. Perjodat mit Glykol wurde nach a) aufgearbeitet. Wir filterten über eine Austauschersäule (∅ 2.85 cm, IR 45-Schicht 22 cm, darüber IR 120-Schicht 15 cm), die wir mit 250 ccm Wasser nachwuschen. Filtrat und Waschwasser brachten wir durch Zusatz von Na₂CO₃ auf pH 6 und engten am Rotationsverdampfer ein. Die eingeeigte Lösung (5 ccm) tropften wir zu einer eisgekühlten Lösung von 1 g NaBH₄ in 15 ccm Wasser. Wir ließen 5 Stdn. bei Raumtemp. stehen, brachten mit 2 *n* Essigsäure auf pH 6.5, verdünnten mit Wasser auf 120 ccm und filterten über eine Säule von IR 120 (H[⊕]) (2.3 × 18 cm). Das saure Filtrat hinterließ nach Eindampfen i. Vak. und mehrmaligem Abdampfen mit Wasser und absol. Methanol 592 mg (54 %) C₇LS-Galaktosyl-erythrit als farblose, schaumige Masse; *R*_{LS} 0.42 (Lm II). Wir nahmen in 3 ccm Wasser auf (pH der Lösung 1.5) und hydrolysierten 75 Min. bei 85° im geschlossenen Gefäß. Dabei wurde C₇LS-Gal-Erythrit bis auf einen geringen Rest in C₇LS (*R*_{LS} 1.32; Ehrlich-positiv) und Galaktosyl-erythrit (*R*_{LS} 0.60; NaJO₄/Benzidin) gespalten (im Chromatogramm außerdem wenig Acetamino-sorbit, Glycerin und Erythrit aus den Beimengungen des verwendeten 3'-LS-Lactosepräparats). Die mit Wasser auf 30 ccm verdünnte Lösung filterten wir über eine Säule von Dowex 1 × 4 (HCO₃[⊖]) und wuschen mit 700 ccm Wasser. Die dritte und vierte 50-ccm-Fraktion enthielt den Galaktosyl-erythrit. Den Eindampfrückstand (305 mg) kristallisierten wir aus Methanol/Äthanol/Äthylacetat und aus 90-proz. Äthanol um: 2-*O*-β-*D*-Galaktosyl-*D*-erythrit, Schmp. 188—190° (Monoskop; Lit.³⁵⁾: 184—187°).

C₁₀H₂₀O₉ (284.3) Ber. C 42.26 H 7.09 Gef. C 42.28 H 7.19

Die Dowex-Säule eluierten wir nacheinander mit 750 ccm 0.01 *m*, 1750 ccm 0.15 *m*, 750 ccm 0.0175 *m* und 1250 ccm 0.02 *m* NH₄HCO₃. Mit 0.15 *m* NH₄HCO₃ wurden geringe Mengen chromatographisch langsamer, Ehrlich-positiver Substanzen eluiert. Das Eluat mit 0.02 *m* NH₄HCO₃ enthielt die C₇LS und wurde in 4 Portionen über IR 120 (H[⊕]) gegeben. Da die sauren Filtrate bei der Gefriertrocknung klebrige Rückstände gaben, die nach einiger Zeit anfangen, sich zu bräunen, neutralisierten wir die wäbr. Lösungen mit Na₂CO₃-Lösung und gefriertrockneten wieder. Wir erhielten so insgesamt 175 mg rohes C₇LS-Natriumsalz. Einen Teil davon chromatographierten wir an Kieselgel mit Propanol/Wasser (8:2). Dabei konnten wir zwar Verunreinigungen abtrennen, aber beim Eindampfen des die C₇LS enthaltenden Eluats i. Vak. trat Huminbildung ein. Der Rückstand wurde nach Filtrieren der wäbr. Lösung über IR 120 (H[⊕]) und Gefriertrocknung zur Bereitung des Chinoxalinderivats³⁴⁾ verwendet: 40 mg in 1.2 ccm absol. Methanol erwärmten wir mit 23 mg *o*-Phenylendiamin

³⁴⁾ R. KUHN und G. BASCHANG, Liebigs Ann. Chem. 659, 156 [1962].

³⁵⁾ A. J. CHARLSON und A. S. PERLIN, Canad. J. Chem. 34, 1804 [1956].

45 Min. unter Rückfluß, wobei das *Chinoxalinderivat* auszukristallisieren begann. Nach 24 Stdn. bei 4° wurde abgesaugt und mit viel absol. Methanol gewaschen: 28 mg (54%). Nach Umkristallisieren aus 2 ccm Wasser 23.7 mg farblose Stäbchen, Zers.-P. 204–206°. Zur Analyse trockneten wir über P₂O₅/KOH bei 110°/10⁻³ Torr.

C₁₅H₁₉N₃O₅ (321.3) Ber. C 56.07 H 5.96 N 13.07 Gef. C 56.43 H 5.95 N 13.15
[α]_D²⁰: -112° (c = 0.11, in Dimethylsulfoxyd/Wasser 1:1).

Das zum Vergleich hergestellte *Chinoxalinderivat der Lactaminsäure* (sowohl von synthetischer als von natürlicher aus Kuh-Colostrum) hat einen Zers.-P. von 229° (Monoskop, ab 225° Bräunung), [α]_D²⁰: -102° (c = 0.27, Dimethylsulfoxyd/Wasser 1:1).

C₁₇H₂₃N₃O₇ (381.3) Ber. C 53.55 H 6.08 N 11.02 Gef. C 53.34 53.16 H 5.61 5.99 N 11.22

C₇LS-Methylglykosid: Zu 235 mg *LS-Methylester-methylglykosid* (hergestellt nach BLIX und Mitarbb.²⁹⁾; modifiziert nach MACDONALD³⁶⁾) in 4 ccm Wasser + 0.75 ccm 1 n Na₂CO₃ fügten wir im Lauf von 8 Stdn. weitere 1.5 ccm 1 n Na₂CO₃. Die Lösung, die im Chromatogramm (Lm II) nur noch Spuren Ausgangsmaterial neben LS-Methylglykosid zeigt, brachten wir mit 2 n CH₃CO₂H (1.2 ccm) auf pH 5 und ließen nach Zusatz von 10 ccm 0.25 m NaJO₄ 15 Stdn. bei 0° stehen. Dann wurde nach b) weitergearbeitet. Wir erhielten 176 mg rohes *C₇LS-Methylglykosid* (96%), die wir aus Methanol/Äther/Petroläther (30–40°) umkristallisierten: 130 mg, nach nochmaligem Umkristallisieren 101 mg. Zers. ab 150°, ohne zu schmelzen. Zur Analyse trockneten wir über P₂O₅/KOH/Paraffin bei 50°/10⁻³ Torr.

C₁₀H₁₇NO₇ (263.24) Ber. C 45.62 H 6.51 N 5.32 OCH₃ 11.79
Gef. C 45.42 H 6.57 N 5.44 OCH₃ 12.52

[α]_D²⁰: -62.3° (c = 0.5, in Methanol).

Aus den bei der Reaktion von *C₇LS-Methylglykosid* mit *Resorcin* nach SVENNERHOLM⁴⁾ gefundenen Extinktionen bei 580 bzw. bei 630 mμ ergaben sich für *C₇LS* (unter der Voraussetzung, daß das Methylglykosid unter diesen Bedingungen vollständig gespalten wird) die molaren Extinktionskoeffizienten ε₅₈₀ = 11400 bzw. ε_{630(max)} = 13600. Die entsprechenden Werte für LS waren ε_{580(max)} = 8100 bzw. ε₆₃₀ = 6500. Der Wert für *C₇LS* beträgt also bei 580 mμ das 1.4-fache, bei 630 mμ das 2.1-fache des entsprechenden Wertes für LS. (Vgl. ähnliche Beobachtungen bei Oxydation/Reduktion von Fetuin¹⁹⁾.)

C₇LS-Methylester-methylglykosid: 75 mg rohes *C₇LS-Methylglykosid* in 25 ccm absol. Methanol wurden mit 250 mg Dowex 50 (H[⊕]), der im Exsikkator getrocknet und 2mal mit Methanol ausgekocht worden war, 5½ Stdn. gerührt. Nach Abfiltrieren des Austauschers wurde i. Vak. eingedampft. Nach 2maligem Umkristallisieren aus Methanol/Äther 42 mg farblose Stäbchen, Zers.-P. 107–109°.

C₁₁H₁₉NO₇ (277.3) Ber. C 47.64 H 6.91 OCH₃ 22.38 Gef. C 47.30 H 7.36 OCH₃ 21.62

Chromatographisch war eine geringe Beimengung von *C₇LS-Methylglykosid* zu sehen.

Reduktion von LS-Methylester-methylglykosid und C₇LS-Methylester-methylglykosid: Je 5 mg in 0.3 ccm Methanol gaben wir zur eisgekühlten Lösung von 10 mg NaBH₄ in 2 ccm Wasser. Wir ließen über Nacht bei +4° stehen, filtrierten die mit 2 n Essigsäure auf pH 6.5 gebrachte Lösung über IR 120 (0.8 × 4 cm). Nach Eindampfen und Entfernen der Borsäure mit Methanol chromatographierten wir die Rückstände unmittelbar sowie nach Hydrolyse (0.1 n H₂SO₄, 1 Stde. bei 85°, wobei starke Huminbildung auftritt). Die Reduktion von LS-Methylester-methylglykosid ergab eine Substanz von R_F 0.53 (Lm I, aufst.), bzw. R_{LS} 1.66

36) D. L. MACDONALD, Privatmitteilung.

(Lm II) = *N-Acetyl-nonulosaminol-methylglykosid*. Durch Hydrolyse ging sie über in ein Produkt von R_F 0.45 bzw. R_{LS} 1.16, = *N-Acetyl-nonulosaminol*. Aus C_7LS -Methylester-methylglykosid entstanden analog *N-Acetyl-heptulosaminol-methylglykosid*, R_F 0.65 bzw. R_{LS} 2.66 (JO_4^\ominus -negativ) sowie nach Hydrolyse *N-Acetyl-heptulosaminol*, R_F 0.54 bzw. R_{LS} 1.80 (JO_4^\ominus -positiv). -- Bei allen 4 Substanzen war die Ehrlich-Reaktion im Papierchromatogramm zu Beginn des Erhitzens rosa, später rosa-violett bis grau.

3-LS-Galaktose: 2.35 mg (5 μ Mol), oxydiert und reduziert nach b), ergeben ein Produkt (Ehrlich- und JO_4^\ominus -positiv) mit R_{LS} 0.83 (Lm II) bzw. R_F 0.163 (Lm I, aufst.). Die Lösung in 0.025 ccm Wasser zeigt nach 1 Stde. bei 85° C_7LS und *Lyxit* (daneben nur noch Spuren der Ausgangssubstanz).

3'-[N-Glykolylnuraminyl]-lactose: 3.3 mg (5 μ Mol), oxydiert und reduziert nach a), liefert eine Ehrlich-positive Substanz (R_{LS} 0.36, Lm II), die bei partieller Hydrolyse in *Gal(1→2)Erythrit* und eine Ehrlich-positive Substanz von R_{LS} 1.07 (Lm II) zerfällt.

LS-Tetrasaccharid a (I): 10 mg (10 μ Mol), Oxydation und Reduktion nach b). Durch Streifenchromatogramm (Lm I, abst., 45 Stdn.) wurde das Hauptprodukt (II; R_3 -LS-Lactose 0.69) isoliert, das bei partieller Hydrolyse (85°, pH 1.5, 75 Min.) in C_7LS und eine Substanz von R_3 -LS-Lactose 1.23 (III) zerfällt. Aus dem gleichen Streifenchromatogramm eluierten wir in viel geringerer Menge eine Ehrlich-positive Substanz mit R_3 -LS-Lactose 0.92 (V). Durch partielle Hydrolyse (85°, pH 1.5) wurde sie in C_7LS und eine Substanz mit R_3 -LS-Lactose 1.66 (VI) zerlegt.

Weitere 20 mg I wurden oxydiert und reduziert wie oben und zur Abspaltung von C_7LS partiell hydrolysiert (85°, pH 1.5, 75 Min.). Aus dem Hydrolysat erhielten wir mit Hilfe eines Streifenchromatogramms 3 mg III und 1 mg VI.

Nach *partieller Hydrolyse von III* (1.3 mg in 0.2 ccm 0.5n H_2SO_4 15 Min. im siedenden Wasserbad; Entfernen von $SO_4^{2\ominus}$ mit Anionenaustauscher MIH ($CH_3CO_2^\ominus$)) ließen sich papierchromatographisch nachweisen: *Erythrit*, *GlcNAc*, *Gal*; *Gal(1→2)Erythrit*, *GlcNAc(1→3)Gal* (= Lacto-N-biose II), *Gal(1→3)GlcNAc* (IV) (= Lacto-N-biose I); *Gal(1→3)-GlcNAc(1→3)Gal* (= Lacto-N-triose I). Nach *Totalhydrolyse von VI* (mit 1n H_2SO_4 , 12 Stdn., 100°; $SO_4^{2\ominus}$ mit $Ba(OH)_2$ entfernt) im Chromatogramm *Lyxit*, *GlcN* und *Gal*; außerdem mit JO_4^\ominus /Benzidin ein schwacher Fleck, wahrscheinlich *GlcN(1→2)Lyxit*.

5 mg *LS-Tetrasaccharid a* wurden „überoxydiert“ und reduziert nach b). Das Chromatogramm (Lm I, abst.) zeigte außer dem Hauptprodukt V zwei schwache, schneller wandernde, Ehrlich-positive Flecke, vielleicht durch weitergehende Überoxydation entstanden.

6'-LS-Lactose (VII): 19.5 mg (30 μ Mol) lieferten bei Oxydation und Reduktion nach b) eine Substanz von R_{LS} 0.76 (Lm II) (VIII). Aus der bei 27° aufbewahrten Lösung in 0.1 ccm Wasser entnahmen wir nach 15 Min., nach 2, 5, 10, 24 Stdn. sowie nach 3 Tagen Proben zur Chromatographie (Lm II). Während die Substanz VIII abnimmt, treten C_7LS -Glycerin und *Erythrit* (5 Stdn.) auf, gleichzeitig ist schon C_7LS zu erkennen. Dessen Menge nimmt auf Kosten von C_7LS -Glycerin zu, unter Freisetzung von Glycerin, das nach 10 Stdn. im Chromatogramm deutlich wird. Nach 24 Stdn. sind mit Perjodat/Benzidin etwa gleich starke Flecke von *Glycerin* und *Erythrit* zu sehen; mit Ehrlich-Reagenz erkennt man neben C_7LS nur noch wenig C_7LS -Glycerin.

Bei einem 2. Ansatz isolierten wir aus der Lösung von VIII nach 10stdg. partieller Hydrolyse bei 27° C_7LS -Glycerin mit Hilfe eines Streifenchromatogramms. Das Eluat wurde gefriergetrocknet, der Rückstand zeigte chromatographisch außer C_7LS -Glycerin nur Spuren C_7LS ; nach partieller Hydrolyse in 0.05n H_2SO_4 (75 Min., 85°) nur C_7LS und Glycerin.

6'-LS-N-Acetyl-lactosamin (X): 6.7 mg (10 μ Mol) lieferten bei Oxydation und Reduktion nach a) eine Substanz von R_{LS} 0.79 (in Lm II) (*XI*). Sie wurde in 0.067 ccm Wasser aufgenommen. Wir ließen 5 Stdn. bei 37° stehen. Im Chromatogramm (Lm II) zeigt sich nun mit Ehrlich-Reagenz nur noch wenig *XI* neben ziemlich viel *C₇LS* und wenig *C₇LS-Glycerin*. Mit Perjodat/Benzidin sieht man außer *C₇LS-Glycerin 2-Desoxy-2-acetamino-sorbit* (R_{LS} 1.27) und Glycerin (R_{LS} 2.03). Aus einem Streifenchromatogramm (Lm II) eluierten wir *C₇LS-Glycerin* sowie 2-Desoxy-2-acetamino-sorbit + *C₇LS* und filterten die Eluate über MIH ($\text{CH}_3\text{CO}_2^\ominus$)-Säulen (0.8 \times 2 cm). Filtrat und Waschwasser der *C₇LS-Glycerin*-Säule wurden verworfen. Das *C₇LS-Glycerin* eluierten wir mit 10 ccm 0.1 *m* Natriumacetat. Das mit IR 120 von Na^\oplus -Ionen befreite Eluat wurde gefriergetrocknet. Die wäbr. Lösung (pH 1.5) zeigte nur *C₇LS-Glycerin* (R_{LS} 1.15); nach 7 Stdn. bei 37° war *C₇LS-Glycerin* fast verschwunden, dafür sah man *C₇LS* (R_{LS} 1.32, E) und mit Perjodat/Benzidin Glycerin (R_{LS} 2.02, in Lm II, bzw. R_F 0.61, in Lm I aufst.).

Das Filtrat der zweiten MIH-Säule, das den von *C₇LS* befreiten 2-Desoxy-2-acetamino-sorbit enthielt, wurde gefriergetrocknet und der Rückstand hydrolysiert (mit 0.5 *n* H_2SO_4 , 12 Stdn., 100°). Im Chromatogramm (Lm I aufst.) mit Ninhydrin violetter Fleck, R_F 0.23, übereinstimmend mit authent. 2-Desoxy-2-amino-sorbit.

LS-Tetrasaccharid c (XII): 10 mg (10 μ Mol), oxydiert und reduziert nach a), gaben eine Substanz (*XIII*) mit $R_{3\text{-LS-Lactose}}$ 1.06, in Lm I, bzw. R_{LS} 0.27, in Lm II. Wir lösten in 0.05 ccm Wasser und ließen 9 Stdn. bei 37° stehen. Im Chromatogramm (Lm II) zeigte sich außer *C₇LS* wenig *C₇LS-Glycerin*. Mit Perjodat/Benzidin war schon reichlich Glycerin zu sehen, außerdem 2 Substanzen, die chromatographisch mit dem bei der Oxydation von Lacto-*N*-tetraose erhaltenen GlcNAc-Gal-Erythrit bzw. GlcNAc-Lyxit übereinstimmten (R_{LS} 0.32 bzw. 0.69, in Lm II). Durch Erwärmen der Lösung auf 85° (75 Min.) spalteten wir die *C₇LS* ganz ab und entfernten sie durch Filtration über eine kleine MIH ($\text{CH}_3\text{CO}_2^\ominus$)-Säule. Aus dem Filtrat isolierten wir mit Hilfe eines Streifenchromatogramms die Substanzen mit R_{LS} 0.32 und (sehr viel weniger) 0.68. Die erste lieferte bei Totalhydrolyse erwartungsgemäß Glucosamin, Galaktose und Erythrit; die zweite (durch Überoxydation entstandene) Glucosamin und Lyxit.

LS-Tetrasaccharid b (XIV): 50 mg (50 μ Mol) lieferten nach Oxydation und Reduktion nach a) eine Substanz (*XV*) vom $R_{3\text{-LS-Lactose}}$ -Wert 1.11 (Lm I); außerdem entstand eine geringe Menge einer Substanz vom $R_{3\text{-LS-Lactose}}$ -Wert 1.43 (Lm I) (*XVIII*). Bei der Eigenhydrolyse der Lösung (pH 1.5, 37°) tritt unter gleichzeitiger Bildung von Glycerin eine chromatographisch langsamere ebenfalls Ehrlich-positive Substanz (*XVI*) auf ($R_{3\text{-LS-Lactose}}$ 0.84), die im Verlauf der Hydrolyse auf Kosten von *XV* zunimmt. Außerdem findet bereits teilweise Abspaltung von *C₇LS* statt. Nach 2 Stdn. bei 37° trennten wir die Substanzen *XV* und *XVI* mit Hilfe eines Streifenchromatogramms (Lm I, 36 Stdn.). Aus den Papiereluatn erhielten wir nach Reinigung über kleine IR 120-/IR 45-Säulen 3.6 mg *XV* und 4.0 mg *XVI*. Je 0.5 mg in 0.025 ccm Wasser wurden 80 Min. auf 85° erwärmt. Dabei entstanden aus *XV* *C₇LS* + GlcNAc-Gal-Erythrit + Glycerin, aus *XVI* *C₇LS* + GlcNAc-Gal-Erythrit (Vergleich mit Präparat aus Lacto-*N*-tetraose).

Durch Oxydation/Reduktion [nach b)] von *XVI* (3 mg) erhielten wir *XVII* ($R_{3\text{-LS-Lactose}}$ 1.76, in Lm I; R_{LS} 0.65, in Lm II). Bei milder Hydrolyse (pH 1.5, 37°) konnten wir kein *C₇LS-Glycerin* nachweisen. Hydrolyse bei 85° führt zur Abspaltung von *C₇LS* dabei entstand kein mit Perjodat/Benzidin nachweisbares Produkt. Nach Totalhydrolyse (mit 1 *n* H_2SO_4 , 100°, 12 Stdn.; Entfernung von $\text{SO}_4^{2\ominus}$ mit $\text{Ba}(\text{OH})_2$) fanden wir Galaktose und Glycerin, aber kein Glucosamin.

Nach „Überoxydation“ von 20 mg *LS-Tetrasaccharid b* und Reduktion nach b) fanden wir als Hauptprodukt *XVIII* ($R_{3\text{-LS-Lactose}}$ 1.43, Lm I abst.); daneben war etwas *XV* vorhanden. Von der Lösung in 0.2 ccm Wasser versetzten wir 0.025 ccm mit der gleichen Menge

1 *n* H₂SO₄ und hydrolysierten 12 Stdn. bei 100°. Nach Entfernen der Schwefelsäure mit Ba(OH)₂ fanden wir chromatographisch *Glucosamin*, *Lyxit* und *Glycerin*. In weiteren 0.05 ccm der Lösung von XVIII fanden wir nach Eigenhydrolyse (75 Min., 85°): C₇LS, *Glycerin* und eine Substanz mit positiver Perjodat/Benzidin-Reaktion, welche *GlcNAc(1→2)Lyxit* sein sollte (R_{3'}-LS-Lactose 2.73, Lm I abst.).

0.1 ccm der Lösung von XVIII (entspr. 10 mg LS-Tetrasaccharid b) wurden mit 0.1 ccm 0.2 *n* Na₂CO₃ neutralisiert. Dann wurde in der üblichen Weise oxydiert und nach Zerstörung von überschüss. JO₄[⊖] mit Diacetyl nach b) reduziert. Dabei entstand XIX (R_{3'}-LS-Lactose 1.73, Lm I Ehrlich-positiv), das bei Totalhydrolyse (mit 0.5 *n* H₂SO₄, 12 Stdn., 100°; Entfernen von SO₂[⊖] mit Ba(OH)₂) *Glycerin* und *Glucosamin* lieferte.

Dilactaminyllactose (R_{3'}-LS-Lactose 0.47, Lm I): 4.6 mg (5 μMol) wurden oxydiert und nach a) reduziert. Das Oxydations-Reduktionsprodukt (R_{3'}-LS-Lactose 0.69) in 0.05 ccm Wasser (pH der Lösung ca. 2) erwärmt wir zunächst auf 80°. Nach 10 bzw. 20 Min. erscheint im Chromatogramm zunehmend C₇LS, während die Substanz mit R_{3'}-LS-Lactose 0.69 abnimmt. Außer C₇LS entstehen 2 weitere Ehrlich-positive Flecke (R_{3'}-LS-Lactose 0.93 und 1.35; letzterer JO₄[⊖]-positiv). Lactaminsäure ist nur in Spuren zu sehen; ebenso Galaktosylerythrit. Anschließend hydrolysierten wir 1 Stde. bei 85°. Dabei verschwanden die Substanzen mit R_{3'}-LS-Lactose 0.69, 0.93 und 1.35 und es trat *Lactaminsäure* auf. Entsprechend der höheren Farbstoffausbeute aus C₇LS im Vergleich zu LS bei der Ehrlich-Reaktion bleibt die Intensität des LS-Flecks, auch bei völliger Abspaltung beider Säuren, hinter der des C₇LS-Flecks zurück. Mit Perjodat/Benzidin sieht man im Chromatogramm Galaktosylerythrit sowie etwas Lyxit (durch Überoxydation entstanden).

Bei Di-LS-lactose-Präparaten, die durch Gefriertrocknung der sauren Lösungen gewonnen waren, sieht man nach Oxydation/Reduktion bereits im Anfangsstadium der Hydrolyse außer C₇LS eine Substanz, die chromatographisch (*R*-Werte, Farbe mit Ehrlich-Reagenz, positive Reaktion mit JO₄[⊖]/Benzidin) mit dem durch Reduktion und Hydrolyse aus C₇LS-Methylester-methylglykosid entstehenden *N*-Acetyl-heptulosaminol übereinstimmt (s. S. 410). Die Substanz trat nicht auf bei einem Di-LS-lactose-Präparat, das als Di-ammoniumsalz vorlag und demgemäß kein Lacton enthielt.

Alkalischer Abbau der LS-Tetrasaccharide a (I) und b (XIV): Je 5 mg (5 μMol) wurden mit 0.1 *n* Na₂CO₃ neutralisiert, mit Wasser auf 0.5 ccm aufgefüllt, mit 0.5 ccm 0.1 *n* Na₂CO₃ versetzt, 10 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt, nach Abkühlen mit IR 120 (H[⊕]) geschüttelt, filtriert und nach Gefriertrocknung in 0.1 ccm Wasser aufgenommen. Zum Vergleich wurde 1 mg GlcNAc in 1 ccm 0.05 *n* Na₂CO₃ ebenso behandelt.

Chromatogramme: Bei *LS-Tetrasaccharid a* sieht man *Chromogen I* (violett mit *p*-DAB, R_F 0.58, in Lm III bzw. 0.68, in Lm I aufst.) sowie Spuren von Chromogen III (R_F 0.74 in Lm III bzw. 0.83 in Lm I aufst.). Ein Chromatogramm in Lm I (abst., 36 Stdn.) zeigt als Hauptfleck *LS(2→3)Galaktose* (AP- und Ehrlich-positiv, R_{3'}-LS-Lactose 1.39), außerdem Spuren von Gal (AP), LS (E) sowie von unverändertem LS-Tetrasaccharid a (R_{3'}-LS-Lactose 0.38) und zwei weiteren Flecken (beide AP- und E-positiv; R_{3'}-LS-Lactose 0.48 bzw. 0.61). Ein Teil der Lösung wurde zur partiellen Hydrolyse 90 Min. auf 85° erwärmt und wieder chromatographiert: anstelle des nunmehr verschwundenen LS-Galaktose-Flecks sah man *LS* und *Galaktose*.

Bei *LS-Tetrasaccharid b* erscheint mit *p*-DAB (außer Spuren von α-Pyrrol-carbonsäure, Chromogen I und III) ein starker violetter Fleck (R_F 0.09, in Lm III bzw. 0.30, in Lm I aufst.) sowie ein weiterer sehr schwacher Fleck (R_F 0.22, in Lm III bzw. 0.41, in Lm I aufst.). Mit AP ist *Galaktose* zu erkennen. Wir brachten den Rest der Lösung mit Na₂CO₃ auf pH 6.5 und fügten zu je einer Hälfte das gleiche Volumen *Neuraminidase*-Lösung (RDE der BEHRINGWERKE,

Marburg) bzw. Wasser. Wir inkubierten 28 Stdn. bei 37°. Im Chromatogramm (Lm I aufst.) zeigte die enzymfreie Kontrolle mit *p*-DAB unverändert den Fleck mit R_F 0.30; im Enzymansatz ist er verschwunden, statt dessen sieht man Chromogen I (R_F 0.68) und LS (E). Danach ist der Fleck mit R_F 0.30 *LS-Chromogen-I*. Der Fleck mit R_F 0.41 könnte *LS-Chromogen-III* sein.
