

Richard Kuhn, Peter Lutz und Donald L. MacDonald*)

Synthese anomerer Sialinsäure-methylketoside

Aus dem Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Institut für Chemie, Heidelberg
(Eingegangen am 6. August 1965)

Über die Acetochlor-Verbindung des Lactaminsäure-methylesters wurde nach *Koenigs-Knorr* ein Methylketosid-methylester von $[\alpha]_D^{20}$: -6° erhalten, der von Neuraminidase quantitativ gespalten wird. Der aus Lactaminsäure mit H^\oplus und Methanol dargestellte anomere Methylketosid-methylester von $[\alpha]_D^{20}$: -46° wird von dem Enzym nicht angegriffen. Bei den durch Verseifung der CO_2CH_3 -Gruppen erhaltenen anomeren Methoxycarbonsäuren besteht derselbe Unterschied.

Die für Hexose- und Pentose-Derivate bekannten Drehungsregeln sind auf Derivate der Sialinsäuren nicht ohne weiteres anwendbar¹⁾. Die natürlich vorkommenden durch Neuraminidase spaltbaren Sialinsäure-ketoside sind, soweit Drehungsvergleiche überhaupt in Frage kamen, als α -Ketoside angesprochen worden²⁾, doch wurde es als Voraussetzung einer einwandfreien Konfigurationsaufklärung angesehen, α,β -anomere Paare von Ketosiden überhaupt in die Hand zu bekommen. Über ein Paar α,β -anomere Methylketoside wird hier berichtet.

Schon länger bekannt³⁾ war ein Methylketosid des Methylesters der Schaf-Sialinsäure (Lactaminsäure, *N*-Acetyl-neuraminsäure), das aus der Säure und Methanol mit Dowex-50-H[®] gewonnen worden war. Die Synthese dieser Verbindung konnten wir verbessern⁴⁾. Sie zeigt $[\alpha]_D^{20}$: -46° (in Methanol) und wird durch Neuraminidase praktisch nicht gespalten. In den Mutterlaugen ließ sich eine anomere Verbindung nicht mit Sicherheit nachweisen (papierchromatographisch). Zu deren Gewinnung mußte somit ein anderer Weg eingeschlagen werden. Als aussichtsreich erschien die Synthese nach *Koenigs-Knorr* bzw. die Verwendung von Acetohalogen-Verbindungen. Lactaminsäure-methylester (LS-Methylester) wurde zunächst mit Acetanhydrid und etwas Perchlorsäure in den kristallisierenden 2.4.7.8.9-Penta-*O*-acetyl-LS-methylester ($[\alpha]_D^{20}$: -3.3°) verwandelt. Bei der Acetylierung mit Acetanhydrid/Pyridin entstanden nicht kristallisierende Gemische von Pentaacetylverbindungen ($[\alpha]_D^{20}$: -15 bis -20° ; offenbar mit α - und β -Stellung der Acetoxygruppen an C-2). Drehungsvermögen und

*) Special Postdoctoral Fellow, Division of General Medical Sciences, National Institutes of Health, United States Public Health Service, 1961–1962.

1) Z. B. ist das Mercaptal-lacton der Lactaminsäure linksdrehend ($[\alpha]_D^{20}$: -83°), obwohl die OH-Gruppe an C-4 in der Schreibweise von *E. Fischer* nach rechts gerichtet ist; *R. Kuhn* und *R. Brosmer*, *Angew. Chem.* **74**, 252 (1962); *Angew. Chem. internat. Edit.* **1**, 218 (1962); *R. Kuhn* und *G. Baschang*, *Chem. Ber.* **95**, 2384 (1962).

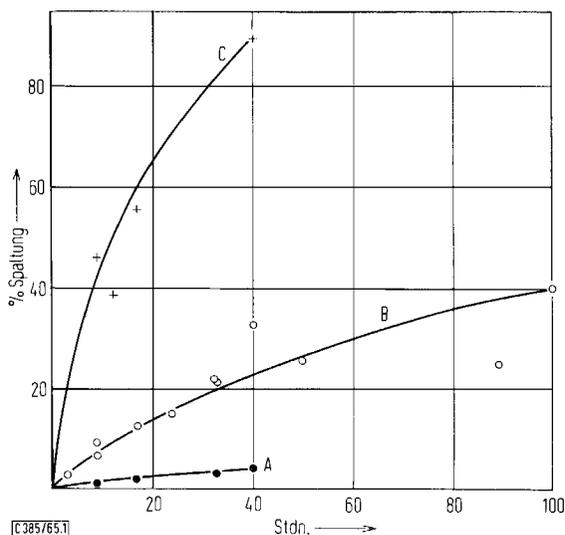
2) *R. Kuhn* und *R. Brosmer*, *Chem. Ber.* **92**, 1667 (1959).

3) *G. Blix*, *E. Lindberg*, *L. Odin* und *I. Werner*, *Acta Soc. med. Upsaliensis* **61**, I (1956); der Drehwert des Methylketosids wurde nicht bestimmt und die enzymatische Spaltbarkeit nicht geprüft.

4) *D. L. MacDonald*, Report on Postdoctoral Fellowship GPS-17001 (Sept. 1962).

Kristallisationstendenz hingen wie im Falle der Fructose^{5,6)} von geringen Änderungen der Darstellungsbedingungen ab. Es wurde auch eine kristallisierende Tetra-*O*-acetyl-Verbindung erhalten, bei der vermutlich die 2-ständige OH-Gruppe frei ist. Daß alle erhaltenen Acetylverbindungen Pyranosederivate und nicht *keto*-Verbindungen sind, folgt daraus, daß sie weder Mercaptale bilden⁶⁾ noch mit PtO₂/H₂ in Eisessig hydrierbar sind⁷⁾.

Für die anschließende Umsetzung mit Chlorwasserstoff in Acetylchlorid sind alle angeführten Derivate mit 4 bzw. 5 Acetoxygruppen in gleicher Weise geeignet. Es gelang, den Acetochlor-LS-methylester in guter Ausbeute (80% d. Th.) mit stimmen- dem Chlor-, Methoxyl- und Acetyl-Gehalt als stark linksdrehende ($[\alpha]_D^{20}$: -63°) amorphe Verbindung zu erhalten, die aber auch im Exsiccator nur wenige Stunden haltbar war.



Abbild. 1. Enzymatische Hydrolyse der 2-*O*-Methyl-LS von $[\alpha]_D^{20}$: -1° (Methanol).

A: 1.8 mg Subst., Acetatpuffer pH 4.0, 10 Einheiten Neuraminidase.

B: 1.8 mg Subst., Acetatpuffer pH 5.5, 10 Einheiten Neuraminidase.

C: 1.0 mg Subst., Acetatpuffer pH 5.5, 50 Einheiten Neuraminidase.

Spaltung zu 99% nach 70 Stdn. — 1.0 mg anomeres β -Ketosid ($[\alpha]_D^{20}$: -44° ; aus Esterketosid durch alkalische Verseifung¹¹⁾) zeigte unter denselben Bedingungen nach 50 Stdn. Spaltung zu $6\% \pm 3\%$; ein geringer Gehalt an spaltbarem Isomeren ist nicht ausgeschlossen. Acetatpuffer nach Colowick-Kaplan^{*)}, 0.05 m, zusätzlich 0.9% NaCl und 0.1% CaCl₂ enthaltend. — Neuraminidase aus *Vibrio cholerae* der Behring-Werke (100 Einheiten/1 cm). — Inkubiert bei 37°; Gesamtvolumen der Ansätze und der Kontrollen (letztere ohne Enzym) je 1.00 cm. Nach den angegebenen Zeiten werden je 0.1 cm der Warren-Reaktion unterworfen. E_t = Extinktion des Spaltungsansatzes nach der Zeit t ; E_k = Extinktion der Kontrolle nach der Zeit t ; E_∞ = Extinktion einer sauer hydrolysierten Probe.

$$\% \text{ Spaltung} = \frac{E_t - E_k}{E_\infty - E_k} \cdot 100$$

*) S. P. Colowick und N. O. Kaplan, Methods in Enzymology, Bd. 1, S. 138, Acad. Press, Inc., New York 1955.

5) Vgl. z. B. P. Brigl und R. Schinle, Ber. dtsh. chem. Ges. 67, 754 (1934).

6) M. L. Wolfrom und A. Thomson, J. Amer. chem. Soc. 56, 880 (1934).

7) E. Pacsu und F. v. Rich, J. Amer. chem. Soc. 55, 3018 (1933).

Die Umsetzung des Acetochlor-LS-methylesters mit Silbercarbonat in Methanol und die anschließende Abspaltung der Acetoxygruppen nach *Zemplén* lieferte 40–45% d. Th. (bez. auf LS-Methylester) eines LS-Methylester-methylketosids, das analysenrein, aber nicht kristallin erhalten wurde, und sich von dem aus Lactaminsäure + $\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}^\oplus$ erhaltenen Ketosid (s. oben) wie folgt unterschied:

Eigenschaften des nach *Koenigs-Knorr* und des aus $\text{LS} + \text{CH}_3\text{OH} + \text{H}^\oplus$ erhaltenen 2-Methyl-LS-methylesters

Synthese	$[\alpha]_D^{20}$ in Methanol	$[\alpha]_D^{20}$ in DMSO	$R_{\text{LS-Methylester}}$ (Fischer-Nebel-Gemisch)	Bezeichnung
nach <i>Koenigs-Knorr</i>	-6°	-18°	1.18 – 1.19	α -Ketosid
aus $\text{LS} + \text{CH}_3\text{OH} + \text{H}^\oplus$	-46°	-62°	1.13 – 1.14	β -Ketosid

Der nach *Koenigs-Knorr* erhaltene Ketosid-methylester wird durch Neuraminidase quantitativ gespalten, ebenso die durch alkalische Verseifung daraus erhaltene 2-Methyl-carbonsäure (Abbild. 1). Da das spaltbare Methylketosid weniger starke Linksdrehung als das unspaltbare zeigt, kann ersteres als α -Ketosid und letzteres als β -Ketosid bezeichnet werden. Diese Bezeichnungweise entspricht derjenigen, die *Fischer*⁸⁾ im Falle von α - und β -Methyl-glucosid gewählt hat, bevor noch die Konfiguration von α - und β -Glucose am C-Atom 1 bekannt war. Die absolute Konfiguration am C-Atom 2 bei den durch Neuraminidase spaltbaren Sialinsäure-ketosiden soll durch die Präfixe α - und β - noch nicht ausgedrückt werden.

Angesichts des geringen Unterschieds der R_F -Werte sei angeführt, daß α - und β -Methyl-ketosid nicht nur enzymatisch, sondern auch durch verdünnte Mineralsäure verschieden rasch hydrolysiert werden. Die durch das Enzym spaltbare α -Verbindung wird auch durch H^\oplus schneller gespalten (Tab. 1).

Tab. 1. Vergleich der Säurehydrolyse der enzymatisch spaltbaren (α -) und der nicht spaltbaren (β -) 2-O-Methyl-lactaminsäure. — A: Je 2 mg Subst. in 2 ccm 0.1 *n* HCl bei 60°. — B: Je 2 mg Subst. in 2 ccm 0.1 *m* HCl/KCl-Puffer von pH 2.0 bei 70°. — Es wurden je 0.1 ccm entnommen und der Warren-Reaktion unterworfen. E_0 = Extinktion bei 549 μ zur Zeit 0; E_t = Extinktion nach den angegebenen Zeiten; E_∞ = Endwert der Extinktion.

$$\% \text{ Spaltung} = \frac{E_t - E_0}{E_\infty - E_0} \cdot 100$$

Zeit [Min.]	A		Zeit [Min.]	B	
	% Spaltung enzymat. spaltbares α -Ketosid	% Spaltung enzymat. nicht spaltbares β -Ketosid		% Spaltung enzymat. spaltbares α -Ketosid	% Spaltung enzymat. nicht spaltbares β -Ketosid
15	14	4.5	15	38	19
30	24.5	6.5	30	57.5	21
60	50	15	60	74.5	49.5
120	99	37	120	93.5	99
360		99			

8) *E. Fischer*, Ber. dtsh. chem. Ges. 27, 2985 (1894).

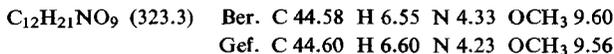
In zwei soeben erschienenen Mitteilungen haben *Meindl* und *Tuppy*⁹⁾ 2 Paare von anomeren Ketosiden, nämlich die beiden n-Amyl- und beide n-Hexyl-ketoside sowie weitere durch Neuraminidase spaltbare Ketoside der Lactaminsäure (*N*-Acetyl-D-neuraminsäure) beschrieben, die in ähnlicher Weise, jedoch über die Acetochlor-Verbindung der freien Säure (nicht des Methylesters) erhalten wurden. In allen Fällen waren, wie bei den von uns beschriebenen Methylketosid-methylestern, nur die weniger stark links drehenden Verbindungen (α -Ketoside) enzymatisch spaltbar, und diese wurden auch von verdünnter Mineralsäure rascher hydrolysiert als die stärker links drehenden β -Ketoside.

Herrn *W. Lochinger* danken wir für eifrige experimentelle Mitarbeit.

Beschreibung der Versuche

Die verwendete *Lactaminsäure* (LS) wurde nach *Kuhn* und *Baschang*¹⁰⁾ synthetisch dargestellt. — Für die *Papierchromatographie* (absteigend) diente Schleicher & Schüll-Papier 2043 b, gewaschen, als Fließmittel Essigester/Eisessig/Wasser 9:2:2 und Fischer-Nebel-Gemisch (Boden des Kastens bedeckt mit Pyridin/Essigester/Wasser 11:40:6; Fließmittel Pyridin/Essigester/Eisessig/Wasser 5:5:1:3). Wir besprühten mit Perjodat/Benzidin sowie mit Ehrlich-Reagenz. — Für die *Dünnschichtchromatographie* benützten wir Kieselgel G „Merck“, als Laufmittel bewährten sich Propanol/Wasser 15:5 und Butanol/Eisessig/Wasser 5:2:2. — Die *Drehwerte* wurden am Perkin-Elmer-Polarimeter 141 (mit Zeiss-Monochromator MM 12 und Xenonlampe Zeiss LX 501) bei 589.6 m μ gemessen.

LS-Methylester^{4,11)}: 1.00 g LS (umkrist.) wird in 100 ccm *absol. Methanol* gelöst. Dazu gibt man 3 g Dowex-50-H⁺ (X 8, 100–200 mesh; gründlich mit Methanol gewaschen und über KOH/P₂O₅ bei 50° i. Vak. getrocknet) und rührt 2 Stdn. bei Raumtemperatur. Man dekantiert und rührt den Austauscher nochmals 1–2 Stdn. mit 50 ccm *absol. Methanol*. Nach erneutem Dekantieren eluiert man den Ester in einer kleinen Säule mit ca. 200 ccm *Methanol*. Ausb. 1.01 g (97%). Meist ist der Methylester chromatographisch bereits nahezu einheitlich. Aus *Methanol* (15 ccm) + *Essigester* (15 ccm) erhält man durch allmähliche Zugabe von 220 ccm *Petroläther* (60–70°) und Wiederholung der Operation 0.52 g (50%) schöne Nadeln; aus den Mutterlaugen weitere 0.1 g (10%). Zur Analyse wird 24 Stdn. bei 70° i. Vak. über KOH/P₂O₅ getrocknet. Schmp. 179–180° (Zers.). $[\alpha]_D^{20}$: –28° ($c = 1$, Wasser); –33° ($c = 1$, DMSO); –27° ($c = 1$, *Methanol*). Eine Mutarotation wurde nicht beobachtet, auch nicht an Präparaten, die im Exsiccator aus Pyridin bzw. Eisessig durch Verdunsten des Lösungsmittels gewonnen wurden.



Bei der Dünnschichtchromatographie kann ein Teil des Esters gespalten werden; dies läßt sich stark herabsetzen, wenn man zusammen mit einer kleinen Menge Eisessig aufsetzt.

Enzymatisch nicht spaltbarer 2-O-Methyl-LS-methylester (2-Methyl-*N*-acetyl- β -D-neuraminsäure-methylester): 1.00 g LS werden in 200 ccm *absol. Methanol* zusammen mit 2.5 g Dowex-50-H⁺ (100–200 mesh, Vorbehandlung wie oben) 24 Stdn. unter Rückfluß und Rühren gekocht. Nach Abfiltrieren und Eluieren des Harzes in einer kleinen Säule enthält die Lö-

⁹⁾ *P. Meindl* und *H. Tuppy*, Mh. Chem. **96**, 802, 816 (1965).

¹⁰⁾ *R. Kuhn* und *G. Baschang*, Liebigs Ann. Chem. **659**, 156 (1962).

¹¹⁾ *J. D. Karkas* und *E. Chargaff*, J. biol. Chemistry **239**, 949 (1964); diese gingen von einem Gemisch aus *N*-Acetyl- und *N*-Glykoly-neuraminsäure aus.

sung 0.87 g Rohprodukt; sie wird mit etwas Kohle behandelt und auf 10 ccm eingengt. Durch allmähliche Zugabe von 150 ccm Äther erhält man 0.71 g Kristalle, die 2 weiteren Umkristallisationen aus jeweils 10 ccm Methanol + 40 ccm Äther unterworfen werden. Ausb. 0.35 g (32%). Die Dünnschichtchromatographie (Substanzen unter den oben angegebenen Kautelen aufgetragen) zeigt neben dem 2-*O*-Methyl-*LS*-ester nur mehr angedeutet *LS*-Methylester. Man trocknet 24 Stdn. über KOH/P₂O₅ bei 60°/1 Torr. Schmp. 115–130°, bei 190° wird die Schmelze klar (Zers.). $[\alpha]_D^{20}$: -46° ($c = 0.67$, Methanol); -62° ($c = 0.78$, DMSO).

C₁₃H₂₃NO₉ (337.3) Ber. C 46.39 H 6.87 N 4.15 OCH₃ 18.41
Gef. C 46.14 H 6.63 N 4.04 OCH₃ 18.11

2.4.7.8.9-Penta-*O*-acetyl-*LS*-methylester: 2.2 g *LS*-Methylester werden innerhalb von 30 Min. bei 35–40° in 7.2 g Acetanhydrid + 0.05 ccm 60-proz. Perchlorsäure unter Rühren eingetragen. Es wird weitere 2 Stdn. bei 40° gerührt, mit Eiswasser zersetzt und nach Sättigung mit Ammoniumchlorid 5–10 mal mit Chloroform extrahiert. Der Extrakt wird mit gesätt. NaHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und abgedampft. Der hinterbleibende Sirup kristallisiert beim Reiben mit Äther teilweise; $[\alpha]_D^{20}$: -5.9° ($c = 1$, Chloroform). Aus warmem Essigester/Benzin (60–70°) 1:3 kristallisieren 2.2 g (61%) vom Schmp. 156–157°; $[\alpha]_D^{20}$: -3.3° ($c = 1$, Chloroform); -4° ($c = 0.5$, DMSO). Zur Analyse wird bei 60°/1 Torr 6 Stdn. über P₂O₅ getrocknet.

C₂₂H₃₁NO₁₄ (533.5) Ber. C 49.50 H 5.86 N 2.62 COCH₃ 48.40 OCH₃ 5.80
Gef. C 49.25 H 5.91 N 2.80 COCH₃¹²⁾ 48.73 OCH₃ 6.01

Auf der Platte läuft die Substanz im Butanol/Eisessig/Wasser-Gemisch einheitlich mit R_F = 0.78. Das IR-Spektrum zeigt keine *N,N*-Diacetylgruppierung.

Tetra-*O*-acetyl-*LS*-methylester (freie OH-Gruppe vermutlich in 2-Stellung): Ansatz wie voranstehend, doch wird nach Zugabe des *LS*-Esters bei 20° weiter gerührt (nicht bei 40°). Nach Abziehen des Chloroforms erhält man 3 g (83%) hellgelben Sirup, der beim Zugeben von Äther partiell kristallin wird. 2.0 g hiervon werden in 25 ccm warmem Essigester gelöst und in der Hitze 65 ccm Benzin (60–70°) zugefügt. Nach 1 Stde. sind 0.9 g büschelförmig angeordnete Nadeln ausgefallen. Aus der Mutterlauge erhält man weitere 0.2 g; insgesamt 1.1 g (31%) vom Schmp. 174–175° (nach Sintern ab 171°). $[\alpha]_D^{20}$: -4.8 bis -5.2° ($c = 0.5$, Chloroform). Zur Analyse wird bei 60°/1 Torr 6 Stdn. über P₂O₅ getrocknet.

C₂₀H₂₉NO₁₃ (491.4) Ber. C 48.90 H 5.94 COCH₃ 43.80
Gef. C 49.69 H 6.09 COCH₃¹²⁾ 43.04

Auf der Platte läuft die Substanz kaum unterscheidbar von der Penta-*O*-acetyl-Verbindung. Aus den Mutterlaugen lassen sich durch Eindampfen Sirupe gewinnen, die nach tagelangem Stehenlassen fest, aber nicht kristallin werden; $[\alpha]_D^{20}$: -11.2 bis -13.7° .

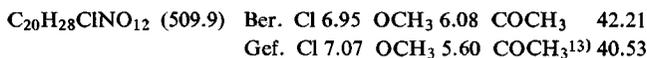
4.7.8.9-Tetra-*O*-benzoyl-*LS*-methylester: 0.32 g *LS*-Methylester in 3 ccm trockenem Pyridin werden innerhalb von 15 Min. bei 50° mit 0.7 g Benzoylchlorid versetzt und weitere 15 Min. bei 50° gerührt. Die Aufarbeitung ergibt einen sirupösen Ester, der beim Umfällen aus Essigester/Benzin fest wird. Ausb. 0.5 g; $[\alpha]_D^{20}$: -0.4° ($c = 1$, Chloroform). Getrocknet wurde i. Vak. über P₂O₅/KOH bei 50°.

C₄₀H₃₇NO₁₃ (739.7) Ber. C 64.95 H 5.04 N 1.88 Gef. C 65.15 H 5.28 N 1.71

Acetochlor-*LS*-methylester: 0.7 g acetylierter *LS*-Methylester (Rohprodukt) werden in 15 ccm Acetylchlorid *p. a.* gelöst und bei -40 bis -60° (Aceton/Kohlensäure) mit trockenem Chlorwasserstoff gesättigt. Das Bombenrohr wird zugeschmolzen und etwa 20 Stdn. bei Raumtemperatur belassen. Dann wird vorsichtig (Bad: 20°) im Rotationsverdampfer i. Vak.

¹²⁾ Durch Oxydation mit CrO₃ bestimmt.

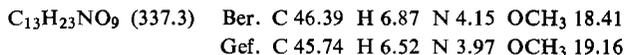
verdampft und je 3 mal mit absol. Äther und absol. Benzol nachgedampft, bis Gewichtskonstanz erreicht ist. Es hinterbleibt ein farbloser Sirup oder eine schaumige Masse. Ausb. ca. 80%. $[\alpha]_D^{20}$: -63° ($c = 1$, Chloroform). Analyse unmittelbar nach der Darstellung; im Exsiccator wird HCl abgespalten.



Enzymatisch spaltbarer 2-O-Methyl-LS-methylester (2-Methyl-*N*-acetyl- α -*D*-neuraminsäuremethylester): 25 ccm absol. Methanol, 5 g frisch bereitetes Silbercarbonat und 1 g ausgeglühter Drierite werden 30 Min. magnetisch gerührt; nach Zugabe einer Spatelspitze Jod wird 1.0 g *Acetochlor-LS-methylester* in 5 ccm absol. Methanol langsam zugetropft und über Nacht unter Lichtausschluß weitergerührt¹⁴). Dann wird abfiltriert und mit Methanol gründlich gewaschen. Waschflüssigkeit + Filtrat gibt man über eine methanolfeuchte Schicht von Hyflo-Supercel. Nach Abziehen des Methanols hinterbleibt ein Sirup. $[\alpha]_D^{20}$: -18° ($c = 4.0$, Methanol). Er wird in absol. Methanol aufgenommen und mit 0.1–0.2 ccm 2*n* Kalium-methylat in Methanol versetzt. Nach 2–4 Stdn. wird mit Dowex-50-H⁺ neutralisiert und zum Sirup eingedampft. $[\alpha]_D^{20}$: -8 bis -10° (bei verschiedenen Ansätzen); Ausb. 40–45% (bez. auf LS-Methylester). Im Papierchromatogramm erhält man einen starken Fleck mit $R = 1.19$ (Fischer-Nebel-Gemisch, bez. auf LS-Methylester = 1.00) und einen schwachen mit $R = 0.52$ – 0.53 , der dem Methylketosid der freien Säure entspricht. Diese Beimengung erklärt den zu tiefen Methoxylwert:

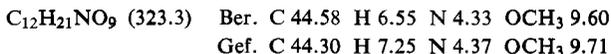


Ließ man zur *Zemplén*-Verseifung mehrere Tage stehen, so sank der Methoxylwert auf 13.8%. Den berechneten Methoxylwert und eine chromatographisch einheitliche Substanz mit $[\alpha]_D^{20}$: -6.3° ($c = 0.5$, Methanol) erhielt man, wenn das Rohprodukt mit absol. Methanol und trockenem Dowex-50-H⁺ 1–2 Stdn. bei Raumtemperatur gerührt wurde (Nachversesterung). Damit ist sichergestellt, daß der zu geringe Methoxylgehalt im Rohprodukt nur auf Kosten der CO₂CH₃-Gruppe geht:



Enzymatisch spaltbare 2-O-Methyl-lactaminsäure (2-Methyl-*N*-acetyl- α -*D*-neuraminsäure): Der ausgehend von 1.0 g *LS-Methylester* über die Acetochlor-Verbindung gewonnene *Ketosidester* wurde wie oben nach *Zemplén* verseift (ca. 2 Stdn.); die noch Methylat enthaltende Lösung versetzte man unter Kühlung mit Wasser im Verhältnis 1:1 und fügte über 2 Stdn. laufend soviel 1*n* NaOH zu, daß ein pH-Wert von 9–10 aufrechterhalten blieb (3–4 ccm); danach wurde über eine kleine Säule (ca. 15 ccm) IR-120-H⁺ gegeben und vorsichtig i. Vak. verdampft. Die Papierchromatographie zeigte 3 Substanzen mit $R_F = 0.28$, 0.37 und 0.49 (stark); die letztere wurde abgetrennt über eine Cellulosesäule (0.3 g auf 10 g Linterspulver Schleicher & Schüll Nr. 124; Pyridin/Essigester/Eisessig/Wasser 5:5:1:3). Ausb. 28–30% d. Th.; $[\alpha]_D^{20}$: -1° ($c = 0.5$, Methanol); -9.5° ($c = 0.47$, Wasser).

Zur Analyse wurden Reste von Pyridin auf einer Säule mit Dowex-50-H⁺ (2 ccm/0.4 g Rohprodukt) entfernt; nach Eindampfen des Eluats wurde 18 Stdn. bei 70°/1 Torr über P₂O₅/KOH getrocknet.



¹³ Mit *p*-Toluolsulfonsäure bestimmt; unter Zusatz von Silbersulfat.

¹⁴ Vgl. *J. Conchie* und *O. A. Levy*, in *R. L. Whistler* und *M. L. Wolfrom*, *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Bd. II, S. 332, Acad. Press, New York 1963.

Perjodat-Verbrauch: Je 0.05 mMol Subst. wurden in 25 ccm 0.01 *m* NaJO₄ gelöst; nach 24 bzw. 48 Stdn. wurden je 5 ccm mit 10 ccm 0.005 *n* Arsenit versetzt und das nicht verbrauchte Arsenit mit 0.01 *n* Jod zurücktitriert¹⁵⁾. Es verbrauchten: Lactaminsäure 2.92, Lactaminsäure-methylester 3.45 Mol.-Äquiv. NaJO₄ in Übereinstimmung mit früheren Befunden^{3,11)}; das enzymatisch spaltbare Methylester-methylketosid verbrauchte 1.79 bzw. 1.94 und das nicht spaltbare 1.90 bzw. 1.90 Mol.-Äquiv. NaJO₄. Hiernach haben beide Esterketoside offenbar dieselbe Spannweite des Sauerstoffringes.

¹⁵⁾ R. D. Guthrie, in R. L. Whistler und M. L. Wolfrom, *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Bd. I, S. 437, Acad. Press, New York 1962.

[385/65]