

b) *Mit α -Glucosidase.* Die verwendete α -Glucosidase (Maltase) stellten wir nach WILLSTÄTTER & BAMANN²⁸⁾ aus frischer Bierhefe durch Autolyse mit Essigester her²⁹⁾. Die Autolysate wurden anschliessend gefriergetrocknet³⁰⁾. Für den enzymatischen Abbau werden 6 mg Remazolbrillantblau-Glucose-Reaktionsprodukt in 2 ml Phosphatpuffer nach SÖRENSEN³¹⁾ (pH 6,8) gelöst und mit 1 ml frischem Autolysat versetzt. Man lässt im Brutschrank bei 30°–32° stehen. Nach der gewünschten Zeit werden 100 μ l Reaktionsgemisch abpipettiert. Man deaktiviert das Enzym durch dreiminütiges Erwärmen auf 100° und trägt von dieser Lösung auf das Papierchromatogramm auf. Zur Kontrolle der Aktivität des Enzyms werden analoge Versuche mit 20 mg Maltose bzw. 10 mg α -Methyl-D-glucosid angesetzt. Zu jedem Ansatz führt man einen Blindversuch mit dest. Wasser anstatt Enzymlösung durch.

SUMMARY

Reactive dyes of the Procion and Remazol types react with glucose or cellobiose in alkaline solution to give predominantly dye *glucosides*. Therefore the previous publications, claiming a direct chemical proof for a covalent bond between the *alcoholic* cellulose hydroxyl groups and the reactive dye by means of identifying a degradation product with a synthetic one from dye and free sugar are not reliable.

In normal dyeings of cellulose with reactive dyes, the C-1 hydroxyl of the reducing end group will react preferentially and therefore the percentage of glucosidic linked dye is higher with weak dyeings and with viscose of low molecular weight than with deep shades or with cotton.

Technisch-chemisches Laboratorium
Eidg. Technische Hochschule Zürich

²⁸⁾ R. WILLSTÄTTER & E. BAMANN, Z. physiol. Chem. 151, 242, 273 (1926).

²⁹⁾ R. WEIDENHAGEN in E. BAMANN & K. MYRBÄCK, Die Methoden der Fermentforschung, Bd. 2, S. 1745, Leipzig 1940.

³⁰⁾ Wir danken der BRAUEREI HÜRLIMANN, Zürich, für die Überlassung der benötigten Bierhefe (*Sacch. carlsbergensis*).

335. Zur Reaktion von Reaktivfarbstoffen mit Cellulose

III.) Konstitution der Abbauprodukte²⁾ 3)

10. Mitteilung über textilchemische Untersuchungen¹⁾

von O. A. Stamm

(4. X. 63)

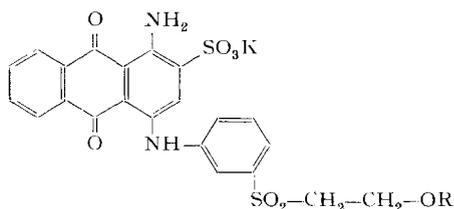
Im zweiten Teil¹⁾ wurde gezeigt, dass bei der Umsetzung von Cellulose mit einem Vinylsulfon-Reaktivfarbstoff (Remazolbrillantblau R, I) ein gewisser Teil nur glucosidisch gebunden wird. Es war nun interessant, abzuklären, mit welchen Hydroxylgruppen der restliche Farbstoff reagiert hat.

¹⁾ Teil II: O. A. STAMM, Helv. 46, 3008 (1963), zugleich 9. Mitteilung über textilchemische Untersuchungen.

²⁾ Teilweise vorgetragen am Technical Forum der Internationalen Föderation textilchemischer Vereine (IFATCC), Ashridge College, Berkhamsted (14. 9. 1962), und anlässlich eines Kolloquiums im Shirley Institute, Manchester (17. 9. 1962).

³⁾ Auszug aus der Habilitationsschrift O. A. STAMM, ETH, Zürich 1963.

Die Verknüpfungsstellen von Reaktivfarbstoffen mit der Cellulose sind bisher noch nie direkt bestimmt worden⁴⁾. Man begnügte sich mit indirekten Hinweisen oder Analogieschlüssen zu anderen, ähnlichen Umsetzungen. Aus der Literatur geht immerhin hervor, dass nicht, wie ursprünglich angenommen^{5) 6)}, nur die primäre Hydroxylgruppe am C-6 der Anhydroglucoseeinheit, sondern auch sekundäre Alkoholfunktionen reagieren können.



Zahlreiche Arbeiten über die Verteilung der Substituenten bei Umsetzungen mit Cellulose⁴⁾ haben gezeigt, dass bei Verätherungen eher die C-2-Hydroxylgruppe, bei Veresterungen die C-6-Hydroxylgruppe der Anhydroglucoseeinheit bevorzugt wird. Dabei kann diese Verteilung im Falle der stabilen Celluloseäther direkt bestimmt werden, indem man nach Totalhydrolyse die verschiedenen monomeren Substitutionsprodukte mit bekannten Vergleichssubstanzen identifiziert⁷⁾. Bei säureempfindlichen Derivaten, z. B. bei Celluloseestern, ist diese Methode natürlich nicht anwendbar, und man ist hier auf indirekte Verfahren angewiesen⁸⁾.

Nun haben wir mit den Remazolfarbstoffen Verbindungen zur Hand, welche die Cellulose durch Ätherbildung färben und deshalb Derivate liefern, die der direkten Bestimmungsmethode zugänglich sind. Da aber hier die Synthese der nötigen Vergleichssubstanzen zu mühsam wäre, bestimmten wir in den Abbauprodukten die Verknüpfungsstelle des Farbstoffs mit dem Glucoseres mit Hilfe des klassischen Verfahrens der Permethylierung, gefolgt von Hydrolyse, worauf die erhaltenen Glucosemethyläther mit entsprechenden synthetischen Verbindungen verglichen wurden. Dabei ist es entscheidend, dass Alkyläther, die in β -Stellung durch eine negative Gruppe substituiert sind, sich im alkalischen Gebiet mehr oder weniger leicht spalten lassen¹⁾, während die gewöhnlichen Methyläther und die Acetalgruppierung am C-1 des Zuckers unter diesen Bedingungen stabil sind⁹⁾. Im Falle der β -Sulfonyläthyläther vom Typ der Remazolfärbungen erfolgt eine Spaltung unter verhältnismässig milden Bedingungen. Durch anschliessende saure Hydrolyse wird das Methylglucosid in den freien Methylzucker übergeführt.

⁴⁾ Für eine Zusammenstellung und Besprechung der Literatur vgl. ³⁾.

⁵⁾ J. WEGMANN, *Textil-Rdsch.* 13, 323 (1958); *Melliand Textilber.* 39, 1006 (1958); H. BUCHER, *Das Papier* 14, 542 (1960).

⁶⁾ E. BOHNERT & R. WEINGARTEN, *Melliand Textilber.* 40, 1036 (1959).

⁷⁾ Vgl. I. CROON, *Svensk Papperstidn.* 63, 247 (1960).

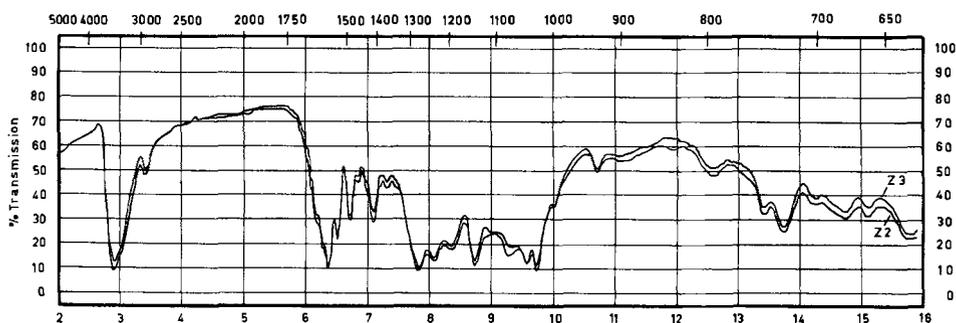
⁸⁾ Vgl. J. F. MAHONEY & C. B. PURVES, *J. Amer. chem. Soc.* 64, 9, 15 (1942); T. E. TIMELL, *Studies on Cellulose Reactions*, Esselte AB, Stockholm 1950; *id.*, *Svensk Papperstidn.* 55, 649 (1952).

⁹⁾ B. LINDBERG, *Svensk Papperstidn.* 59, 15, 531 (1956); vgl. auch W. PIGMAN (ed.), *The Carbohydrates*, New York 1957.

Für die Isolierung der benötigten präparativen Mengen der reinen Abbauprodukte aus dem wie früher¹⁾ beschrieben aufgearbeiteten Hydrolysat des niedermolekularen, gefärbten Viscosepulvers bewährte sich die Papierchromatographie auf Einzelchromatogrammen am besten. Wir eluierten die drei getrennten Zonen mit Wasser und entfernten aus dem Papier stammende Verunreinigungen und anorganische Salze aus den im Vakuum konzentrierten Extrakten durch doppelte Chromatographie an Sephadex G 25. Schliesslich wurden die Eluate noch dialysiert.

Die auf dem Papierchromatogramm am raschesten wandernde Zone 1 zeichnet sich durch eine gegenüber den beiden anderen Verbindungen deutlich herabgesetzte Wasserlöslichkeit aus. Sie kann daher auch durch genügendes Einengen der Eluate ausgefällt und so von löslichen Verunreinigungen abgetrennt werden. Durch Umfällen aus Wasser erhält man sie analysenrein. Sie ist zuckerfrei und auf Grund von Rf-Werten, IR.-Spektren und Analyse identisch mit dem Hydrolysenprodukt des Remazolbrillantblaus R (Hydroxyfarbstoff II). Ihre FEHLING-Reaktion ist negativ. Auf dem Papierelektropherogramm wandert sie in allen benutzten Puffersystemen einheitlich, und gleich wie authentischer Hydroxyfarbstoff. In einem Kontrollversuch wurde der Hydroxyfarbstoff den gleichen Abbaubedingungen unterworfen wie das gefärbte Viscosepulver; dabei blieb er unverändert.

Die anderen beiden Zonen reduzieren FEHLING'sche Lösung und entsprechen auf Grund ihrer Analysenwerte Verbindungen aus 1 Mol Farbstoff und 1 Mol Glucose. Ihre Infrarotspektren (in KBr) sind praktisch identisch (s. Fig.); sie sind ebenfalls sehr ähnlich denen des Hydroxyfarbstoffs. Auch die Spektren im ultravioletten und sichtbaren Bereich sind bei allen drei Abbauprodukten gleich. Während die Übereinstimmung der Elektronenspektren zu erwarten ist – Zucker tragen ja nichts zum chromophoren System bei und absorbieren selbst erst unter $210\text{ m}\mu$ –, war die Ähnlichkeit der Infrarotspektren der verschiedenen Verbindungen eher überraschend.



IR.-Spektren der zuckerhaltigen Abbauprodukte (Zone 2 bzw. Zone 3) in KBr

Die am langsamsten wandernde Zone 3 des Papierchromatogramms war auch papierelektrophoretisch einheitlich, während sich die in den übrigen Puffern geschlossenen wandernde Zone 2 in Boratpuffern in zwei Banden auftrennte, von denen wir die rascher wandernde als Zone 21 und die andere als Zone 22 bezeichnen.

Bei der Papierelektrophorese (Ergebnisse s. Tabelle) wandern in den Puffersystemen 1 bis 4 Hydroxyfarbstoff (Hy) und die damit identische Zone 1 am lang-

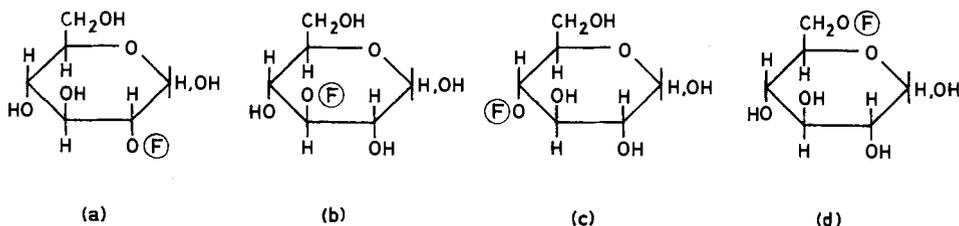
samsten, die Zone 3 am raschesten. Das relative Geschwindigkeitsverhältnis Q der beiden rascheren Zonen 2 und 3 $[(M_E(Z3)/M_E(Z2))]$ ist unabhängig vom pH-Wert. In allen Fällen wandern die Zonen einheitlich. In diesen Puffersystemen kann der Zuckerteil der Molekel nicht für die Wanderung verantwortlich sein, da er bei den betreffenden pH-Werten keine Ladung trägt.

Papierelektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeiten der Abbauprodukte

Vers. Nr.	Puffer	pH	V/cm	mA/cm	M_E^*)				$Q = \frac{M_E(Z3)}{M_E(Z2)}$
					Hy	Z1	Z2	Z3	
1	K-Hydrogenphthalat	5,9	6,63	0,25	0,10	0,11	0,15	0,18	1,2
2	SÖRENSEN-Phosphat	6,4	6,25	0,78	0,041	0,042	0,058	0,068	1,2
3	prim./sek. Na-Phosphat	7,4	5,63	0,13	0,41	0,40	0,46	0,55	1,2
4	Veronal	8,6	3,65	0,56	0,22	0,23	0,28	0,32	1,1
5	Borsäure/Borat	8,6	5,5	0,25	0,60	0,58	0,69	1,08	1,6
							1,00		1,1
6	0,2M K-Borat	9,5	3,25	0,52	0,27	0,26	0,40	0,73	1,8
							0,59		1,2

*) M_E = Wanderungsstrecke der Zonenfront in cm/Std.

Das in den Boratpuffersystemen gefundene Geschwindigkeitsverhältnis von Zone 3 zu Zone 21 entspricht den in den anderen Puffern gefundenen Q -Werten; d. h. die Zone 21 spricht nicht spezifisch auf den Puffer an. Die langsamer wandernde Zone 22 dagegen liefert je nach dem Puffer ein deutlich verschiedenes Geschwindigkeitsverhältnis; ihre Beweglichkeit wird also durch den Puffer in typischer Weise verändert. Dass es sich tatsächlich um einen für den betreffenden Puffertyp charakteristischen Effekt handelt, zeigen die Versuche 4, 5 und 6. Mit dem Veronalpuffer (Nr. 4) haben wir bei gleichem pH wie bei Versuch 5 keine Auftrennung der Zonen und das übliche Geschwindigkeitsverhältnis zwischen Zone 3 und Zone 2 (1,1). Bei den Boratpuffern (Nr. 5 und 6) erhalten wir bei pH 8,6 und pH 9,5 dasselbe Bild der Auftrennung von Zone 2; das Geschwindigkeitsverhältnis der beiden getrennten Zonen $[(M_E(Z21)/M_E(Z22))]$ bleibt ebenfalls gleich (1,45 bzw. 1,47).



Der Zuckerrest der Zone 22 muss also mit der Borsäure zur Komplexbildung befähigt sein, derjenige der Zone 21 sowie der Zone 3 nicht. Im allgemeinen wird als Voraussetzung für die Möglichkeit einer solchen Komplexbildung eine 1,2-*cis*-

Diolgruppierung angenommen¹⁰⁾. Bei den in unserem Fall theoretisch in Betracht kommenden Substitutionsprodukten (a–d) fehlen nur bei Substitution am Hydroxyl an C-2 jegliche *cis*-Paare von Hydroxylfunktionen; eine solche Verbindung wäre also Borat-inaktiv und würde der Zone 21 und der Zone 3 entsprechen. Die Charakterisierung der Zone 22 als C-3-, C-4- oder C-6-Substitutionsprodukt muss durch Permethylierung und anschließende Hydrolyse erfolgen.

Dazu haben wir die Zone 2 durch kontinuierliche Hochspannungs-Papierelektrophorese¹¹⁾ in Boratpuffer in die beiden Verbindungen aufgetrennt. Diese Trennung wurde durch die unter diesen Bedingungen grosse Zersetzlichkeit der Farbstoff-Zucker-Derivate sehr erschwert. Nach kurzer Zeit bildeten sich nämlich rotviolette Zersetzungsprodukte, welche die Trennung störten. Ihre Bildung dürfte auf ähnliche Ursachen zurückzuführen sein, wie sie bereits früher¹⁾ diskutiert wurden. Es erwies sich zudem, dass diese Zersetzung durch die anfänglich verwendeten metallischen Injektionsnadeln katalysiert wurde, weshalb wir für die Substanzzufuhr auf den Trennkarton nur Vollglasspritzen verwendeten. Um den Kontakt mit dem alkalischen Medium möglichst zu verkürzen, wurden die Farbstofflösungen nicht mit Puffer, sondern mit destilliertem Wasser angesetzt und die getrennten Fraktionen in einer vorgelegten Aufschlämmung von saurem Ionenaustauscher aufgefangen. Nach Entfernung der Borat-Ionen wurden die isolierten Produkte zusammen mit der Zone 3 nach KUHN, TRISCHMANN & LÖW¹²⁾ bei Raumtemperatur methyliert. Dann entfernte man den Farbstoff durch alkalische, die Methylglucosidgruppe durch saure Hydrolyse und verglich die erhaltenen Methylzucker papierchromatographisch mit synthetischen Derivaten.

Dabei sind nur die aus monosubstituierten Glucoseeinheiten entstehenden Trimethylglucosen interessant. Eine Di- oder gar Trisubstitution durch den Farbstoff ist aus statistischen und sterischen Gründen bei den niedrigen Substitutionsgraden, wie man sie beim Färben mit Reaktivfarbstoffen erhält, unwahrscheinlich. Eventuelle Di- und Monomethylglucosen stammen daher von einer unvollständigen Methylierung her. Es zeigte sich, dass selbst unter den schonenden Bedingungen der verwendeten Methylierungsmethode die Basizität des Reaktionsmediums ausreicht, um einen Teil des Farbstoffs abzuspalten. Das macht sich im Auftreten von 2,3,4,6-Tetra-O-methylglucose sowie deren Vorstufe bei der Methylierung von Glucose, 2,4,6-Tri-O-methylglucose, bemerkbar. Der Nachweis dieses Trimethylzuckers ist also für eine Zuordnung der Substitutionsstelle nicht signifikant.

Experimentell findet man, z. T. neben geringen Mengen dieser beiden erwähnten Methylglucosen sowie neben wechselnden Mengen Dimethyl- und Spuren von Monomethylglucosen bei der Zone 3 und der Zone 21, wie erwartet, 3,4,6-Tri-O-methylglucose, bei der Zone 22 aber 2,3,6-Tri-O-methylglucose. Die bei einer Substitution an der primären C-6-Hydroxylgruppe auftretende 2,3,4-Tri-O-methylglucose konnte nicht nachgewiesen werden. Die Identifikation erfolgte nicht nur auf Grund des

¹⁰⁾ J. BÖESEKEN, *Adv. Carbohydr. Chemistry* 4, 189 (1949); A. B. FOSTER, *ibid.* 12, 81 (1957); *J. chem. Soc.* 1957, 4214; J. L. FRAHN & J. A. MILLS, *Austr. J. Chemistry* 12, 65 (1959); B. CAPON & W. G. OVEREND, *Adv. Carbohydr. Chemistry* 15, 11 (1960).

¹¹⁾ K. HANNIG, *Z. physiol. Chem.* 311, 63 (1958).

¹²⁾ R. KUHN, H. TRISCHMANN & I. LÖW, *Angew. Chem.* 67, 32 (1955).

Rf-Wertes, sondern auch auf Grund der charakteristischen Farbreaktionen, welche Trimethylglucosen mit dem Sprühreagens nach BAILEY & BOURNE¹³⁾ liefern. Bei der Behandlung mit Methylchlorid und Silberoxid wird der Farbstoffrest zerstört; weder Methylchlorid noch Silberoxid allein bewirken diesen Farbverlust. Offenbar handelt es sich hier um ein Phänomen, wie es EINSELE¹⁴⁾ bereits bei der Acetylierung solcher Farbstofftypen beobachtet hat.

Damit ist die für diese Farbstoffe postulierte Reaktion in 6-Stellung des Glucose-restes⁶⁾¹⁵⁾ widerlegt; das Ergebnis bestätigt die bekannte Tatsache, dass bei Alkylierungen im allgemeinen die C-2-Hydroxylgruppe bevorzugt wird⁷⁾. Dies beruht auf elektronischen Faktoren. Im alkalischen Milieu greift bei den hier betrachteten nucleophilen Substitutions- und Additionsreaktionen das Alkoholat-Ion an. Das C-2-Hydroxyl ist nun aber infolge des negativen induktiven Effekts der benachbarten Acetalgruppierung wahrscheinlich die sauerste Alkoholfunktion der Glucoseinheit¹⁶⁾. Andererseits ist eine Reaktion an der primären C-6-Hydroxylgruppe sterisch begünstigt. Je grösser die räumliche Beanspruchung der Reaktion wird, desto mehr erfolgt auf Kosten der C-2-Substitution ein Angriff an der C-6-Hydroxylgruppe. So überwiegen z. B. bei der Tritylierung oder bei Veresterungen C-6-Substitutionsprodukte. In unserem Falle handelt es sich um eine nucleophile Addition, deren sterische Erfordernisse im Übergangszustand – allerdings unter Vernachlässigung eventueller Solvatationseffekte – deshalb geringer sind als bei einer S_N2 -Reaktion, weil eine entsprechende Abgangsgruppe fehlt. Damit wird die Bevorzugung der 2-Stellung noch ausgeprägter.

Wodurch sich die beiden am C-2 verknüpften, in bezug auf den Zuckerrest identischen Farbstoff-Glucoseäther der Zonen 21 und 3 unterscheiden, lässt sich nicht mit Sicherheit sagen. Offenbar ist bei der Verbindung der Zone 21, die ja nur in kleiner Menge auftritt, der Farbstoffrest irgendwie geringfügig modifiziert. Ob diese Änderung während des Abbaus auftrat oder ob bereits das Ausgangsmaterial diese nicht abtrennbare und analog aufgebaute Verbindung enthielt, liess sich nicht feststellen. Eine quantitative Bestimmung ergab, dass die Zone 2 aus 28% (d. h. 9% bezogen auf die Gesamtmenge der Abbauprodukte) Zone 21 und 72% Zone 22 bestand. Damit findet man (bei einem Fehler von ca. $\pm 5\%$) für das Viscosepulver vom durchschnittlichen Polymerisationsgrad 32 bei einem Substitutionsgrad von 0,03 rund 19% Substitution an der Halbacetalhydroxygruppe des reduzierenden Kettenendes, 57% an der an C-2 stehenden OH-Gruppe der Glucoseinheiten und 24% am C-4 des nicht reduzierenden Kettenendes. Die bei hohen Substitutionsgraden zu vernachlässigende Reaktion der Kettenenden muss also bei dem geringen Umsetzungsgrad, den wir beim Färben mit Remazolbrillantblau R erzielten, noch durchaus berücksichtigt werden. Dass am nicht reduzierenden Ende die C-4-Hydroxylgruppe reagiert, kann möglicherweise darauf zurückgeführt werden, dass sie, im Gegensatz zur C-6-Hydroxylgruppe, kaum durch eine H-Brückenbindung blockiert ist¹⁷⁾.

¹³⁾ R. W. BAILEY & E. J. BOURNE, *J. Chromatogr.* **4**, 206 (1960).

¹⁴⁾ U. EINSELE, *Melliand Textilber.* **42**, 427 (1961).

¹⁵⁾ E. BOHNERT, *Melliand Textilber.* **42**, 1156 (1961).

¹⁶⁾ J. M. SUGIHARA, *Adv. Carbohydr. Chemistry* **8**, 1 (1953).

¹⁷⁾ Vgl. H. J. MARRINAN in J. HONEYMAN (ed.), *Recent Advances in the Chemistry of Cellulose and Starch*, London 1959; W. G. FERRIER, *Acta crystallogr.* **13**, 678 (1960).

Experimenteller Teil¹⁸⁾

1. *Allgemeines.* Die Papierchromatographie erfolgte absteigend. Für die Trennung der gefärbten Verbindungen verwendeten wir die BINZER-Papiere Ederol Nr. 202 (E 202) und Ederol Nr. 226 (E 226), für die Trennung der Zucker WHATMAN Nr. 1 (W 1). Als Fließmittel dienten die früher¹⁾ beschriebenen Systeme FA, FB und FD. Die Sichtbarmachung der Zucker erfolgte mit Anilinhydrogenphthalat (S1)¹⁹⁾, Benzidin-Trichloressigsäure (S2)²⁰⁾, Diphenylamin-Anilin-Phosphorsäure (S3)¹⁸⁾ oder, für nicht reduzierende Zucker, mit Natriummetaperjodat-Benzidin nach MOWERY²¹⁾ (S4).

In bezug auf Rf-Werte, Dünnschichtchromatographie, Talkadsorption und quantitative Bestimmung der papierelektrophoretisch getrennten Farbzonon gilt das im Teil II¹⁾ Gesagte. Sephadex G 25 (medium) ist ein vernetztes Dextran der Firma PHARMACIA, Uppsala, Schweden.

Die Niedervolt-Papierelektrophorese-Versuche wurden auf der LKB-Apparatur Typ 3276 mit SCHLEICHER & SCHÜLL-Papier Nr. 2043 bmgf mit folgenden Puffersystemen durchgeführt:

P1 5,10 g Kaliumhydrogenphthalat + 0,86 g NaOH in 1000 ml dest. Wasser (pH = 5,9)²²⁾

P2 0,033 M SÖRENSEN-Phosphat-Puffer (pH = 6,44)²³⁾

P3 0,0065 M Ammoniumacetat (pH = 6,9)²⁴⁾

P4 2,2 g Na₂HPO₄ + 0,6 g NaH₂PO₄, H₂O in 1000 ml dest. Wasser (pH = 7,4)

P5 Veronal-Puffer nach MICHAELIS²⁵⁾: 0,05 M Natriumdiäthylbarbiturat + 0,005 M Diäthylbarbitursäure + 0,05 M Natriumacetat (pH = 8,6)

P6 8,80 g Na₂B₄O₇ · 10 H₂O + 4,65 g H₃BO₃ in 1000 ml dest. Wasser (pH = 8,6)²⁶⁾

P7 19,1 g Na₂B₄O₇ · 10 H₂O in 1000 ml dest. Wasser (pH = 9,2)²⁷⁾

P8 0,05 N NaOH

Die angegebenen M_E -Werte bezeichnen die Wanderungsstrecke der Zonenfront in cm/Std. unter den betreffenden Bedingungen. Die Zonen selbst sind infolge von Adsorptionseffekten oft ziemlich langgezogen, weshalb die Wahl des Farbschwerpunktes für die Bestimmung der M_E -Werte infolge der kleinen Wanderungsstrecken zu grossen Streuungen führen würde.

Die präparative Auftrennung der Verbindungen erfolgte mittels der Apparatur zur kontinuierlichen Ablenkungselektrophorese im hochgespannten elektrischen Feld nach GRASSMANN & HANNIG (Elphor VaP, Firma BENDER & HOBEIN, München)¹¹⁾. Als Trennkarton wurde das Papier BINZER Nr. 230 und als Aufdampfkarton BINZER Nr. 231 verwendet. Die Durchflussgeschwindigkeit setzten wir dadurch etwas herunter, dass wir durch Zuschneiden des Trennkartons den Pufferzufluss durch 8 je 1 cm breite Zungen erfolgen liessen. Vor Beginn einer Trennung wurde jeweils 16 Std. mit dem verwendeten Puffersystem vorklimatisiert. Wir arbeiteten im allgemeinen bei Spannungen von 950–1000 Volt und Stromstärken von 165–185 mAmp. Die Kammertemp. betrug 17° ± 1°. Als Puffer verwendeten wir den Boratpuffer P6 nach Verdünnung, und zwar im Verhältnis 1:1,5 als Elektrodenspülpuffer und 1:3 als Puffer für den Trennkarton.

Die Dialysen wurden in Celluloseschläuchen (KALLE & Co. AG, Wiesbaden-Biebrich) gegen bewegtes destilliertes Wasser durchgeführt; letzteres wurde periodisch erneuert und durch Eindampfen auf Trockenrückstand geprüft.

Die Synthesen der benötigten Methyläther der D-Glucose wurden nach bekannten, z. T. leicht modifizierten Vorschriften durchgeführt: 2,3,4,6-Tetra-O-methyl-D-glucopyranose²⁸⁾, 2,3,4-²⁹⁾,

¹⁸⁾ Für die Mithilfe bei einigen Versuchen danken wir Herrn P. RYS bestens.

¹⁹⁾ S. M. PARTRIDGE, *Nature* 164, 443 (1949).

²⁰⁾ J. S. D. BACON & J. EDELMAN, *Biochem. J.* 48, 114 (1951).

²¹⁾ D. F. MOWERY, *Analyt. Chemistry* 29, 1560 (1957).

²²⁾ W. M. CLARK & H. A. LUBS, *J. Bact.* 2, 1 (1917).

²³⁾ S. P. L. SÖRENSEN, *Biochem. Z.* 22, 352 (1909).

²⁴⁾ CH. WUNDERLY, *Die Papierelektrophorese*, Aarau 1959.

²⁵⁾ L. MICHAELIS, *Biochem. Z.* 234, 139 (1931).

²⁶⁾ R. CONSDEN & W. M. STANIER, *Nature* 169, 783 (1952).

²⁷⁾ J. L. FRAHN & J. A. MILLS, *Chemistry & Ind.* 1956, 578; *Austr. J. Chemistry* 12, 65 (1959).

²⁸⁾ E. S. WEST & R. F. HOLDEN in *Organic Syntheses*, Coll. Vol. III, S. 800, New York 1955.

²⁹⁾ W. N. HAWORTH, E. L. HIRST & E. J. MILLER, *J. chem. Soc.* 1927, 2443.

2,4,6-³⁰), 3,4,6-³¹), 2,3,6-Tri-O-methyl-D-glucopyranose³²), 2,3-³³), 2,4-³⁴), 2,6-³⁵), 3,6-³⁶) und 4,6-Di-O-methyl-D-glucopyranose³⁷).

In verdankenswerter Weise stellten uns die Proff. E. L. HIRST (Edinburg), R. KUHN (Heidelberg), B. LINDBERG (Stockholm) und N. K. RICHTMYER (Bethesda, USA) Impfkristalle und Vergleichsproben einiger dieser Derivate zur Verfügung.

Die IR.-Spektren wurden in KBr auf einem PERKIN-ELMER-Spektrophotometer, Modell 21, oder auf einem BECKMAN-IR-5-Gerät aufgenommen, die Elektronenspektren in wässriger Lösung auf einem CARY-Spektrophotometer, Modell 11.

Für die Durchführung der Elementaranalysen danken wir Herrn Dr. W. PADOWETZ (analytische Laboratorien der CIBA AG, Basel).

2. *Trennung und Isolierung der Abbauprodukte nach der sauren Hydrolyse gefärbter Cellulose.* Das wie in der vorhergehenden Mitteilung aufgearbeitete Hydrolysengemisch wird in geeigneter Konzentration auf Chromatographiepapierbogen (E 226) ausgestrichen und absteigend mit FA nach der Durchlauf-Methode entwickelt. Die Laufzeit, die sonst 26–32 Std. beträgt, konnte durch Sättigen der Kammer mit FB bei gleicher Trennschärfe um rund ein Drittel herabgesetzt werden. Die getrennten Zonen werden bei Zimmertemperatur mit Wasser extrahiert und die Extrakte schonend im Vakuum eingengt. Die Extrakte der Zonen 3 und 2 liefern dabei klare dunkelblau gefärbte Lösungen. Diese werden zweimal an Sephadex chromatographiert, wobei beim ersten Durchlauf viel brauner Vorlauf (77 mg Trockensubstanz bei Zone 3, 86 mg bei Zone 2; enthält u. a. Ninhydrin-positives Material und Sulfat-Ionen) abgetrennt wird. Nach der zweiten Passage werden die Eluate 6 Std. dialysiert (schwach blaue Anfärbung des Wassers). Der Inhalt der Dialysierschläuche wird schliesslich gefriergetrocknet. Man erhält so hygroskopische, blau gefärbte amorphe Pulver (Zone 3: 390 mg; Zone 2: 171 mg).

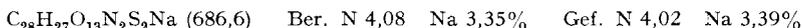
Beim Einengen der aus dem Papier eluierten Zone 1 fällt nach einiger Zeit ein blauvioletter Niederschlag aus. Er wird abgetrennt und getrocknet (127 mg). Die Mutterlauge wird weiter konzentriert, wobei nochmals 42 mg Farbstoff ausfallen. Aus der Restlösung lassen sich durch Chromatographie an Sephadex 110 mg braun gefärbter Vorlauf und nach Dialyse und Gefrier Trocknung nochmals 8 mg des blauvioletten Farbstoffs gewinnen. Der Farbstoff wird aus heissem Wasser umgefällt.

Die auf diese Weise isolierten Zonen verhalten sich papierchromatographisch und auf dem Dünnschichtchromatogramm in den verschiedensten Fließmittelsystemen einheitlich.

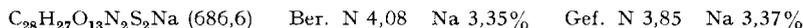
Zone 1: Papierchromatographisch, papierelektrophoretisch und nach IR.-Spektrum identisch mit Hydroxyfarbstoff. R_f (E 202; FA) = 0,70; M_E = 0,40 (P4)³⁸); FEHLING-Test: negativ; λ_{max} = 594 m μ (log ϵ = 3,48).



Zone 2: Farbstoff-Glucose-Verbindung. R_f (E 202; FA) = 0,60; M_E = 0,46 (P4)³⁸); FEHLING-Test: positiv; λ_{max} = 593 m μ (log ϵ = 3,40).



Zone 3: Farbstoff-Glucose-Verbindung. R_f (E 202; FA) = 0,52; M_E = 0,55 (P4)³⁸); FEHLING-Test: positiv; λ_{max} = 594 m μ (log ϵ = 3,46).



³⁰) R. KUHN, I. LÖW & H. TRISCHMANN, Chem. Ber. 90, 216 (1957).

³¹) U. LEMIEUX & C. BRICE, Canad. J. Chemistry 33, 109 (1955); U. LEMIEUX & J. CIPERA, *ibid.* 34, 906 (1956).

³²) W. N. HAWORTH & E. L. HIRST, J. chem. Soc. 119, 193 (1921).

³³) J. C. IRVINE & J. P. SCOTT, J. chem. Soc. 103, 575 (1913).

³⁴) J. W. VAN CLEVE & W. C. SCHAEFER, J. Amer. chem. Soc. 77, 5341 (1955).

³⁵) R. E. REEVES, J. Amer. chem. Soc. 70, 259 (1948).

³⁶) D. J. BELL, J. chem. Soc. 1936, 1553.

³⁷) D. J. BELL & J. LORBER, J. chem. Soc. 1940, 453; K. FREUDENBERG & E. PLANKENHORN, Chem. Ber. 73, 621 (1940).

³⁸) Versuchsdauer 9 Std. 5 Min.; 5,6 V/cm; 0,13 mA/cm; Raumtemp. 20°.

3. *Papierelektrophoretische Auftrennung der Zone 2.* Die für die betreffende Injektionsspritze, Übersetzung der automatischen Dosiervorrichtung und Trennkartonqualität geeignete Substanzkonzentration muss in Vorversuchen ermittelt werden. Man löst die isolierte Zone 2 in destilliertem Wasser, filtriert und bringt die Lösung auf den Trennkarton. So erhält man eine Auftrennung in eine wenig intensive, stärker abgelenkte Fraktion (Z21) und eine intensivere, weniger abgelenkte (Z22), die man beide, nebst einer Mischfraktion, getrennt in Reagenzgläsern auffängt, in denen je 2 ml Dowex 50 W X8 (H⁺-Form) vorgelegt sind. Die Fraktionen werden alle 8–10 Std. gewechselt. Man trennt vom Ionenaustauscher ab, wäscht diesen mehrmals mit Wasser aus, vereinigt Waschwasser und Farbstoff-Filtrat und engt die leicht saure Lösung im Rotationseindampfer ein. Dann wird von ausgefallener Borsäure abgesaugt und das Konzentrat zur vollständigen Entfernung der Borsäure an Talk adsorbiert. Man wäscht mit Wasser, bis der Ablauf boratfrei ist, und desorbiert dann die gefärbten Produkte mit Äthanol. Das alkoholische Eluat wird durch Hyflo-Super-Cel filtriert, um letzte Spuren mitgerissenen Talks zu entfernen, und im Vakuum abgedampft. Der Rückstand dient nach Trocknen bei 0,01 Torr über P₂O₅ für die Permethylierung.

Die prozentualen Anteile der Zonen 21 und 22 wurden nach Trennung durch Niedervolt-Papierelektrophorese im Puffer P6 quantitativ bestimmt.

4. *Permethylierung der isolierten Abbauprodukte.* Vorschrift für einen typischen Versuch: 50 mg Farbstoff-Glucose-Verbindung werden in 6 ml destilliertem, trockenem Dimethylformamid bei 20° durch Rühren aufgeschlämmt. Dabei geht der Farbstoff zum grossen Teil in Lösung. Nach Zusatz von 1 ml Methyljodid gibt man portionenweise 1 g Silberoxid (hergestellt nach HELFERICH & KLEIN³⁹⁾) zu. Nach 5 Std. hat sich die blaue Lösung entfärbt. Vor Licht geschützt rührt man 36 Std., zentrifugiert die ausgefallenen Silbersalze ab und wäscht den Rückstand mit Dimethylformamid. Die Waschflüssigkeit wird mit der rotbraun gefärbten Reaktionslösung vereinigt, das Ganze nochmals mit 0,5 ml Methyljodid und 0,5 g Silberoxid versetzt und 24 Std. im Dunkeln gerührt. Auf gleiche Weise wird noch einmal nachmethyliert. Der Niederschlag wird abzentrifugiert und mehrmals mit Dimethylformamid gewaschen. Dann versetzt man die vereinigten Extrakte mit soviel Chloroform, dass bei weiterer Zugabe kein Niederschlag mehr ausfällt. Man filtriert und schüttelt das Filtrat dreimal mit 4-proz. Kaliumcyanid-Lösung aus. Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird in 6 ml 0,1N Natronlauge 4 Std. unter Stickstoff auf 90–95° erwärmt. Nach Erkalten stellt man mit 0,6 ml 2N Schwefelsäure sauer und kocht über Nacht unter Rückfluss. Dann wird die Lösung mit Bariumhydroxid-Lösung neutralisiert, vom ausgefallenen Bariumsulfat abzentrifugiert und auf Amberlite IR-120 (H⁺-Form) und IR-45 (OH⁻-Form) gegeben. Das neutrale Eluat wird im Vakuum auf ein kleines Volumen konzentriert und papierchromatographisch auf seinen Gehalt an methylierten Zuckern untersucht (W 1; FD). Als Vergleichssubstanzen dienen die synthetisch hergestellten Glucosemethyläther. Die Sichtbarmachung der Zucker erfolgte mit S3. Auf diese Weise wurden alle isolierten Zonen in Mengen von 20–50 mg methyliert und auf Methylzucker analysiert.

SUMMARY

It is shown that Remazol Brilliant Blue R reacts with the glucose unit of cellulose mainly at the C-2 position. Some reaction also occurs at C-1 and C-4 of the reducing and non reducing end groups respectively.

Technisch-chemisches Laboratorium
Eidg. Technische Hochschule Zürich

³⁹⁾ B. HELFERICH & W. KLEIN, Liebigs Ann. Chem. 450, 219 (1926).