

einstimmt, sollten hiernach stets denselben Gefrierpunkt haben. Es wird zunächst experimentell gezeigt, daß ein wässriges System, welches ein aus Fäden hochpolymerer Stoffe gebildetes Netzwerk enthält, und welches auf den Tausendstel Millimeter genau denselben Dampfdruck wie destilliertes Wasser besitzt, gegenüber diesem eine Gefrierpunktsdifferenz von 0,9 bzw. 2,0 °C aufweist. Diese anomale Depression wird dadurch gedeutet, daß das Netzwerk zwar keine meßbare Dampfdruckerniedrigung bewirkt, aber die Größe der sich im Gel bildenden Eiskristalle begrenzt. Da die Maschenweite des Netzwerks aus dem

Elastizitätsmodul zu 3 bzw. $1,6 \cdot 10^{-8}$ cm berechnet wurde, läßt sich aus einer geschätzten Grenzflächenspannung zwischen Eis und Wasser die in diesem System zu erwartende „strukturbedingte“ Gefrierpunktserniedrigung berechnen bzw. abschätzen. Berechnung und Beobachtung stimmen gut überein. Ganz allgemein kann man bei solchen Systemen durch die Kryoskopie anstatt oder neben der Konzentration an Fremdstoffen die Abmessung von im System vorhandenen, die Kristallgröße begrenzenden Strukturen und die Veränderung solcher Strukturen feststellen.

Eingegangen am 24. Februar 1956 [A 723]

Chemie und Biochemie der Neuraminsäure

Von Professor Dr. E. KLENK*)

Physiologisch-chemisches Institut der Universität Köln

Neuraminsäure ist ein Baustein mancher Glykolipoide (Ganglioside) und vieler Glykoproteide. Sie kann als gut kristallisierendes Methylglykosid gefaßt werden. Aus Rindersubmaxillaris-Mucin wurde die außerordentlich alkali-empfindliche N-Acetyl-neuraminsäure gewonnen. Das Influenza-Virus spaltet aus Harn-Mucin, das ein starker Virus-Hämagglutinations-Hemmstoff ist, sowie aus Erythrocytenstroma N-Acetyl-neuraminsäure enzymatisch ab. Die Zellreceptoren für das Influenza-Virus dürften mit der N-Acetyl-neuraminsäure identisch sein, zumindest aber diese als wesentlichen Bestandteil enthalten. Schließlich werden noch die bisherigen experimentellen Befunde über die Konstitution der Neuraminsäure diskutiert.

Die Neuraminsäure wurde von mir¹⁾ 1941 als Spaltprodukt der Ganglioside aufgefunden. Diese sind Glykolipoide, welche im Nervengewebe bei der infantilen amaurotischen Idiotie vom Typ *Tay-Sachs* in abnormen Mengen gespeichert werden, die aber auch normalerweise im Nervengewebe, allerdings in sehr viel kleineren Mengen, vorkommen.

Bei der sauren hydrolytischen Spaltung der Ganglioside wird die Neuraminsäure unter Bildung von Humin-Substanzen vollständig zerstört. Die Spaltung gelingt aber mit methanolischer Salzsäure im Bombenrohr bei 105 °C. Die Neuraminsäure läßt sich dann als verhältnismäßig stabiles, gut kristallisierendes Methylglykosid von der Formel $C_{11}H_{21}NO_9$ oder vielleicht $C_{10}H_{19}NO_8$ fassen. Der Neuraminsäure selbst kommt also die Formel $C_{10}H_{19}NO_9$ (bzw. $C_9H_{17}NO_8$) zu. Nach allem mußte es sich hier um eine bis dahin noch unbekannte, den Kohlenhydraten nahestehende Polyoxyaminosäure handeln, in welcher eine der Alkohol-Gruppen zur Aldehyd- oder Keto-Gruppe oxydiert ist.

Neuraminsäure liefert zwei charakteristische Farbreaktionen. Bei der *Bialschen* Orcin-Reaktion entsteht ein rotvioletter Farbstoff. Diese Reaktion ist so empfindlich, daß Zucker in der Regel nicht stört. Man kann also mit dieser Reaktion die Neuraminsäure einigermaßen zuverlässig quantitativ bestimmen. Weiter gibt die Neuraminsäure auch eine für acetylierte Aminosucker charakteristische Reaktion. Diese färben sich nach Vorbehandlung mit Alkali beim Erhitzen mit dem *Ehrlichschen* Aldehydreagens rot. Die Neuraminsäure gibt diese Reaktion bereits ohne Vorbehandlung mit Alkali. Ein Aminosucker ist aber am Aufbau der Neuraminsäure nicht beteiligt. Aminosucker sind im Gegensatz zu den einfachen Zuckern gegen Salzsäure außergewöhnlich beständig. Sie widerstehen selbst mehrstündigem Erhitzen mit konz. Salzsäure, wobei die gewöhnlichen Zucker unter Humin-Bildung restlos zerstört werden. Wenn man das Methylglykosid so behan-

delt, wird es ebenfalls vollständig zerstört. Im Filtrat läßt sich nach Abtrennung der Huminsubstanzen keine Spur eines Aminosuckers feststellen^{1,2)}. Überhaupt läßt sich die Neuraminsäure nicht noch weiter in einfachere Komponenten aufspalten.

N-Acetyl-neuraminsäure

Substanzen, die sich ähnlich wie die Neuraminsäure beim Erhitzen mit verdünnten Säuren unter Humin-Bildung zersetzen und direkt eine *Ehrlichsche* Reaktion geben, kommen auch in den Mucinen vor. Eine solche Substanz hatte *Blix*³⁾ 1936 aus Rindersubmaxillaris-Mucin durch sehr milde hydrolytische Spaltung erhalten. Es sollte sich um ein Hexosamin-haltiges Disaccharid von saurem Charakter handeln, das zwei Acetyl-Gruppen enthält. 15 Jahre später zweifelte er⁴⁾ daran, ob die Substanz einen Aminosucker enthalten hatte. Er führte für sie jetzt den Namen Sialinsäure ein. Gleichzeitig sprach er auf Grund der Farbreaktionen die Vermutung aus, daß Sialinsäure auch ein Baustein der Ganglioside ist.

Wir⁵⁾ haben deshalb das Submaxillaris-Mucin auf Neuraminsäure geprüft und das Mucin ähnlich wie die Ganglioside mit methanolischer Salzsäure gespalten. In der Tat konnte eine gut kristallisierte Substanz gewonnen werden, die in jeder Hinsicht mit dem Methylglykosid der Neuraminsäure identisch war. Es bestand also durchaus die Möglichkeit, daß es sich bei dem *Blixschen* Disaccharid um die Diacetyl-Verbindung der Neuraminsäure gehandelt hat, falls überhaupt eine chemisch wohl charakterisierte Verbindung vorlag.

Wir⁶⁾ haben uns deshalb große Mühe gegeben, die Substanz nach der Vorschrift von *Blix* wieder darzustellen, erhielten aber immer nur amorphe Substanzen, die zwar sehr Neuraminsäure-reich waren, aber niemals kristalli-

¹⁾ E. Klenk, Z. physiol. Chemie 268, 50 [1941].

²⁾ E. Klenk, ebenda 288, 216 [1951].

³⁾ G. Blix, ebenda 240, 43 [1936].

⁴⁾ G. Blix, Acta chem. Scand. 6, 358 [1952].

⁵⁾ E. Klenk u. K. Lauenstein, Z. physiol. Chemie 291, 147 [1952].

⁶⁾ E. Klenk u. H. Faillard, ebenda 298, 230 [1954].

*) Nach einem Vortrag auf der Sitzung v. 10. 2. 1956 der Gesellschaft Deutscher Chemiker Freiburg i. Br.

sierten und sich papierchromatographisch durchweg als äußerst komplexe Substanzgemische herausgestellt haben. Durch Säulenchromatographie gelang es schließlich mit Hilfe von Ionenaustauschern kleine Mengen einer kristallisierten Substanz aus dem Gemisch herauszufractionieren, die papierchromatographisch einheitlich waren und die sich als N-Acetyl-neuraminsäure herausstellten. Für eine Diacetyl-Verbindung ergaben sich keine Anzeichen.

Eigenschaften der N-Acetyl-neuraminsäure

Die N-Acetyl-neuraminsäure ist sehr labil. Schon die wäßrige Lösung zersetzt sich merklich beim Stehen, was sich durch die Verfärbung und papierchromatographisch eindeutig nachweisen läßt. Die Substanz ist enorm Alkaliempfindlich, schon bei p_H 8,0 wird sie in kürzester Zeit verändert. Erhitzt man einige min mit $n/10$ NaOH, so entsteht α -Pyrrol-carbonsäure, und zwar gerade ein Mol pro Mol Neuraminsäure. Außerdem zersetzt sich die Acetyl-Verbindung ähnlich wie das Methylglykosid auch mit Säuren unter Humin-Bildung. Das Methylglykosid ist dagegen, wie zu erwarten, außerordentlich Alkali-beständig.

Auf Grund neuerer Untersuchungen beschreibt Blix⁷⁾ jetzt 3 verschiedene Sialinsäuren, die aus Mucinen verschiedener Herkunft dargestellt werden konnten: 1. $C_{13}H_{23}NO_{11}$ (oder $C_{13}H_{21}NO_{10} \cdot H_2O$) aus Rinder-Submaxillarmucin; 2. $C_{11}H_{19}NO_9$ aus Eiemucin; 3. $C_{11}H_{19}NO_{10}$ aus Schweine-Submaxillarmucin.

Die erste soll eine Diacetyl-, die zweite eine N-Acetyl-, die dritte eine N-Glykoly-Verbindung sein. Der in diesen Körpern vorhandene Grundkörper müßte in allen drei Fällen die Formel $C_9H_{17}NO_8$ haben, was nach Yamakawa und Suzuki⁸⁾ auch die Summenformel der Neuraminsäure ist, während wir der Neuraminsäure die Formel $C_{10}H_{19}NO_9$ zusprechen. Dies macht es sehr wohl möglich, daß der gemeinsame Grundkörper für alle diese Substanzen Neuraminsäure ist und daß die aus Eiemucin gewonnene Verbindung $C_{11}H_{19}NO_9$ mit unserer N-Acetyl-neuraminsäure identisch ist.

Vorkommen von Neuraminsäure

Inzwischen ist Neuraminsäure in einer größeren Zahl von Glykoproteiden oder Glykoprotein-haltigem Material festgestellt worden, wie Tabelle 1 zeigt. Aufgenommen sind hier nur Fälle, in denen die Substanz tatsächlich auch als kristallisiertes Methylglykosid isoliert wurde.

		NS-Gehalt
Submaxillaris-Mucin vom Rind	E. Klenk u. K. Lauenstein [1952] ⁹⁾	10 %
vom Schwein	E. Klenk u. G. Uhlenbruck [1956] ⁹⁾	2 %
Menschl. Harn-Mucin	E. Klenk u. K. Lauenstein [1952] ⁹⁾	5 %
Amyloidose-Leber	E. Klenk u. H. Faillard [1954] ¹⁰⁾	1,6 %
Frauenmilch-Mucin	R. E. Hoover, G. A. Braun u. P. György [1953] ¹¹⁾	—
Menschl. Blutserum	P. Böhm u. L. Baumeister [1955] ¹²⁾	40–65 mg %
Fetuin (Glykoprotein aus Rinderfötterserum)	E. Klenk u. W. Stoffel [1955] ¹³⁾	6 %
Rinder-Erythrocytenstroma	E. Klenk u. W. Stoffel [1956] ¹⁴⁾	ca. 0,9 %

Tabelle 1
Vorkommen von Neuraminsäure in Glykoproteiden und Glykoprotein-haltigem Material

⁷⁾ G. Blix, E. Lindberg, L. Odin u. I. Werner, Nature [London] 175, 340 [1955].

⁸⁾ T. Yamakawa u. S. Suzuki, J. Biochemistry [Tokyo] 38, 199 [1951].

⁹⁾ E. Klenk u. G. Uhlenbruck, noch unveröffentlicht.

¹⁰⁾ E. Klenk u. H. Faillard, Z. physiol. Chemie 299, 191 [1955].

¹¹⁾ R. E. Hoover, G. A. Braun u. P. György, Arch. Biochem. Biophysics 47, 216 [1953].

¹²⁾ P. Böhm u. L. Baumeister, Z. physiol. Chemie 300, 153 [1955].

¹³⁾ E. Klenk u. W. Stoffel, Z. physiol. Chemie 302, 286 [1955].

¹⁴⁾ E. Klenk u. W. Stoffel, Z. physiol. Chemie 303, 78 [1956].

Es sei zunächst einmal das Vorkommen von Neuraminsäure in den Eiweißstoffen des Blutserums herausgegriffen. Nachdem schon vorher mit Hilfe der beschriebenen Farbreaktionen Blix und Mitarbeiter das Vorkommen von Sialinsäure in einer Reihe von Serumeiweiß-Fractionen festgestellt hatten, haben Böhm und Mitarbeiter¹²⁾ erstmals aus dem Serumeiweiß das reine Methylglykosid der Neuraminsäure isoliert. Sie finden im α_1 -Glykoprotein des menschlichen Serums etwa 8 % Neuraminsäure. Schultze und Mitarbeiter¹⁵⁾ haben neuerdings ein derartiges α_1 -Glykoprotein isoliert, das 10 % Neuraminsäure enthielt. Die letzten finden Neuraminsäure aber auch in den anderen Globulin-Fractionen, mit Ausnahme der γ -Globulin-Fraktion und ebenfalls nicht in der Albumin-Fraktion. Wir¹³⁾ fanden, daß im Serum von Kälberföten der Neuraminsäure-Gehalt etwa 2–3 mal so groß ist als im menschlichen Serum und daß das darin in überaus reichlichen Mengen vorhandene Glykoprotein (Fetuin) 6 % Neuraminsäure enthält. Auch hier wurde wieder das reine Methylglykosid isoliert.

Was das Frauenmilch-Mucin betrifft, so haben György und Mitarbeiter¹⁶⁾ nach der Gewinnung des Methylglykosids, auch die Acetyl-Verbindung der Neuraminsäure isoliert, welche sie Gynaminsäure nannten, die aber mit der kurz vorher von uns dargestellten N-Acetyl-neuraminsäure identisch sein dürfte. Demgegenüber erhielten R. Kuhn und Brossmer¹⁷⁾ aus Kuhcolostrum-Mucin die Laktaminsäure als Methoxyl-Verbindung, die fast dieselbe elementare Zusammensetzung besitzt wie das Methylglykosid der Neuraminsäure. Sie ist mit der letzteren aber sicher nicht identisch, da es sich um eine N-Acetyl-Verbindung handelt. Nach den neuesten Befunden von Kuhn und Brossmer^{17a)} hat die Laktaminsäure dieselbe elementare Zusammensetzung wie die N-Acetyl-neuraminsäure.

Biologische Bedeutung der Neuraminsäure

Besonders interessant ist das Vorkommen der Neuraminsäure im Harn-Mucin und im Erythrocytenstroma für die biologische Bedeutung der Neuraminsäure. Über sie ist bis jetzt nur wenig bekannt. Man weiß nur, daß die Substanz beim ersten Kontakt zwischen gewissen pathogenen Viren und den infizierbaren Zellen eine Rolle spielt. Genauer Einblick¹⁸⁾ erhielt man durch Hirsts Entdeckung der Virus-Hämagglutination. Die Erythrocyten werden durch diese Art von Viren, also z. B. durch Influenza-Virus, nicht infiziert. An der Oberfläche der Erythrocyten spielt sich aber derselbe Vorgang ab, wie bei den infizierbaren Zellen. Gibt man zu einer Erythrocyten-Aufschwemmung Influenza-Virus hinzu, so kommt es zu einer Agglutination. Das Virus wird dabei an die Zelloberfläche adsorbiert, so daß es aus der überstehenden Flüssigkeit verschwindet. Nach etwa einstündigem Stehen im Brutschrank löst sich das Virus wieder von den Blutkörperchen ab und diese haben die Fähigkeit zu agglutinieren verloren. Die Erythrocyten und die infizierbaren Zellen besitzen offensichtlich besondere Rezeptoren, die dem Virus als Haftstellen an der Zelloberfläche dienen. Hirst nimmt an, daß das Virus enzymatische Eigenschaften besitzt und daß durch das Virusenzym die Rezeptoren von der Zelle abgespalten werden, so daß das Virus wieder unverändert in Lösung geht, während den Blutkörperchen die Rezeptoren fehlen und sie somit die Fähigkeit zur Agglutination verloren haben.

¹⁵⁾ H. E. Schultze, I. Göllner, K. Heide, M. Schönenberger u. G. Schwick, Z. Naturforsch. 10b, 463 [1955].

¹⁶⁾ F. Zilliken, G. A. Braun u. P. György, Arch. Biochem. Biophysics 54, 564 [1955].

¹⁷⁾ R. Kuhn u. R. Brossmer, Chem. Ber. 87, 123 [1954].

^{17a)} R. Kuhn u. R. Brossmer, diese Ztschr. 68, 211 [1956].

¹⁸⁾ Siehe dazu F. M. Burnet, Croonian Lecture, Proc. Roy. Soc. [London] Ser. B 138, 47 [1951].

Weiter wurde gefunden, daß eine ganze Reihe von Mucinartigen Eiweißstoffen, so z. B. das Harn-Mucin die Agglutination hemmen. Die Mucine enthalten offenbar Rezeptorartige Wirkgruppen, durch welche eine Verbindung zwischen Virus und Mucin zustande kommt, so daß das Virus mit den Erythrocyten nicht mehr in Reaktion treten kann. Burnet nimmt an, daß die Zellmembran Mucin-artige Substanzen enthält, deren prosthetische Gruppen als Zellreceptoren fungieren.

In Burnets Institut konnte Gottschalk¹⁹⁾ nun auch die zunächst noch hypothetische enzymatische Wirkung des Influenzavirus experimentell bestätigen. Gottschalk ließ das Virus auf Mucine verschiedener Herkunft und auch auf Harn-Mucin einwirken. Dabei wird eine niedermolekulare Substanz abgespalten, welche sich beim Erhitzen mit verdünnten Säuren unter Humin-Bildung zersetzt und welche auch die direkte Ehrlichsche Reaktion gibt. Es lag nahe, dieses Spaltprodukt mit der Neuraminsäure in Beziehung zu bringen und deshalb haben wir⁵⁾ zunächst einmal das Harn-Mucin auf Neuraminsäure geprüft. Da wir daraus ebenso wie aus Submaxillaris-Mucin ohne Schwierigkeiten das kristallisierte Methylglykosid gewinnen konnten, wiederholten wir²⁰⁾ den Versuch von Gottschalk und konnten seinen Befund voll bestätigen. Darüber hinaus fanden wir, daß in den zahlreichen Versuchen 25–55% der im Harn-Mucin vorhandenen Neuraminsäure abgespalten werden. Papierchromatographisch verhielt sich das Spaltprodukt wie N-Acetyl-neuraminsäure. Da wir deren Eigenschaften kannten, gelang es auch die reine kristallisierte Substanz ohne größere Schwierigkeiten zu isolieren.

Nach allen Kontrollversuchen muß es als gesichert gelten, daß die Substanz in der Tat enzymatisch durch das Virus abgespalten wird. In dem Ultrafiltrat des Spaltungsansatzes sind neben der N-Acetyl-neuraminsäure allerdings noch beträchtliche Mengen Aminosäuren vorhanden. Sie sind wahrscheinlich durch proteolytische Fermente abgespalten worden, die im Substrat, also im Harn-Mucin noch vorhanden sind. Die Inaktivierung dieser proteolytischen Fermente durch Erhitzen führt gleichzeitig auch zur Inaktivierung des Hemmstoffs.

Nach diesen theoretischen Vorstellungen, die im wesentlichen auf die bahnbrechenden Untersuchungen von Hirst sowie von Burnet zurückgehen, müßte im Stroma der Erythrocyten ein Neuraminsäure-haltiges Glykoprotein vorhanden sein. In der Tat enthält, wie erwähnt, das Stroma-Eiweiß von Rindererythrocyten etwa 0,9% Neuraminsäure und wir¹⁴⁾ konnten daraus auch das kristallisierte Methylglykosid isolieren. Dasselbe trifft für das menschliche Stroma zu. Läßt man auf ein fein suspendiertes menschliches Stroma Influenza-Virus einwirken, so wird daraus ebenfalls Acetyl-neuraminsäure abgespalten²¹⁾. Die abgespaltene Menge ist groß genug, um die Substanz papierchromatographisch einwandfrei nachweisen zu können. Es kann also kaum noch ein Zweifel bestehen, daß die Zellreceptoren mit der N-Acetyl-neuraminsäure identisch sind oder daß diese zumindest ein wesentlicher Bestandteil der Zellreceptoren ist.

Die roten Blutkörperchen sind bekanntlich elektrophil geladen. Sie wandern im elektrischen Feld anodisch. Ihr isoelektrischer Punkt liegt bei p_H 1–2. Läßt man auf sie Influenza-Virus einwirken, nimmt die Wanderungsgeschwindigkeit merkbar ab²²⁾. Der isoelektrische

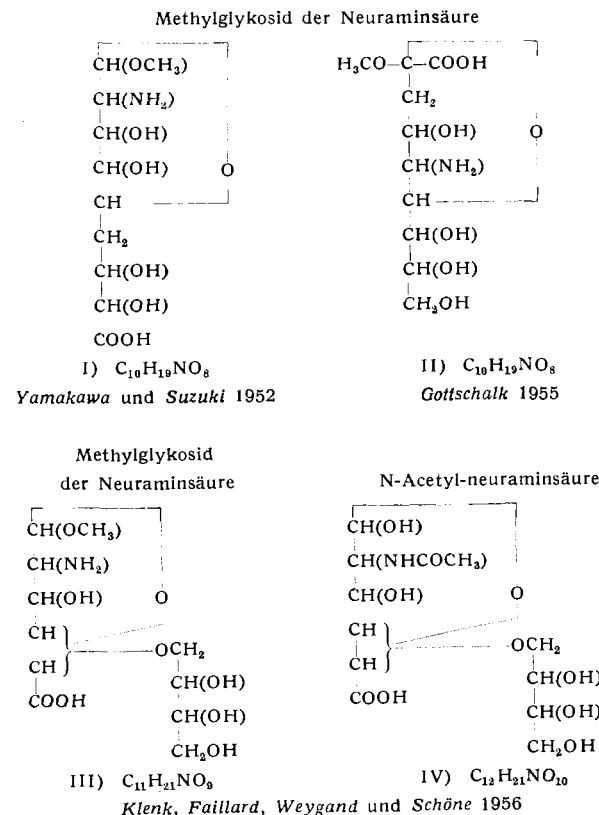
Punkt verschiebt sich in Richtung auf den Neutralpunkt. Dies ist offenbar auf die enzymatische Abspaltung der Zellreceptoren, d. h. N-Acetyl-neuraminsäure, zurückzuführen, die verhältnismäßig stark saure Eigenschaften hat. Man kann auch umgekehrt annehmen, daß die negative Ladung der Erythrocyten zu einem wesentlichen Teil von der in der Oberfläche der Erythrocyten vorhandenen Acetyl-neuraminsäure herrührt.

Konstitution der Neuraminsäure

Konstitutionsformeln für Neuraminsäure sind bis jetzt von Yamakawa und Suzuki²³⁾ (I), sowie von Gottschalk²⁴⁾ (II) aufgestellt worden. Wir (Klenk und Faillard) haben uns in letzter Zeit zusammen mit Weygand und Schöne²⁵⁾ ebenfalls mit der Konstitutionsaufklärung beschäftigt. Die Untersuchungen sind allerdings noch nicht abgeschlossen, so daß hier nur eine vorläufige, noch etwas hypothetische Formel gebracht werden kann.

Demnach wäre die Neuraminsäure der Erythrit-äther einer Amino-hexuronsäure. Das Methylglykosid hat dann die Formel III, N-Acetyl-neuraminsäure die Formel IV.

Bewiesen ist in der Acetyl-neuraminsäure das Vorhandensein einer freien Aldehyd-Gruppe. Sie läßt sich nach Willstätter-Schudel titrieren. Bewiesen ist weiter die Nachbarschaft der N-Acetyl-Gruppe zur Aldehyd-Gruppe. Spaltet man nämlich nach der Oxydation der Aldehyd-Gruppe nach Willstätter-Schudel die Acetyl-Gruppe ab, so erhält man eine α -Aminosäure, die beim Erhitzen mit Ninhydrin pro N-Atom ein Mol CO_2 abspaltet. Das Methylglykosid der Neuraminsäure spaltet dagegen mit Ninhydrin kein CO_2 ab, ist also keine α -Aminosäure. In Widerspruch dazu steht die Formel von Gottschalk. Die Formel stützt sich weiter auf das Ergebnis der Perjodat-Spaltung. Beim Methylglykosid ist der Verbrauch an Perjodat je nach den Reaktionsbedingungen etwas verschieden. Man verbraucht 3–5 Mol Perjodat und erhält 1–2 Mol Säure. Blockiert man in dem Methylglykosid die Amino-Gruppe durch



¹⁹⁾ A. Gottschalk u. P. E. Lind, Nature [London] 164, 232 [1949]; A. Gottschalk, Nature [London] 167, 845 [1951].

²⁰⁾ E. Klenk, H. Faillard u. H. Lemprid, Z. physiol. Chemie 301, 235 [1955]; Photogr. u. Wissenschaft 5, 3 [1956].

²¹⁾ E. Klenk u. H. Lemprid, noch unveröffentlicht.

²²⁾ M. Hanig, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 68, 385 [1948]; s. a. G. L. Ada u. J. D. Stone, Nature [London] 165, 189 [1950].

²³⁾ T. Yamakawa u. S. Suzuki, J. Biochemistry (Tokyo) 39, 175 [1952].

²⁴⁾ A. Gottschalk, Nature [London] 176, 881 [1955].

²⁵⁾ E. Klenk, H. Faillard, F. Weygand u. H. H. Schöne, Z. physiol. Chemie, 309, 35 [1956].

Acylierung, so verläuft die Perjodat-Spaltung durchsichtiger. Verbraucht werden jetzt 2 Mol Perjodat, wobei 1 Mol Säure und etwas weniger als 1 Mol Formaldehyd entsteht. Mit diesem Ergebnis steht die Formel von Yamakawa und Suzuki in Widerspruch.

Der Nachweis der Aminohexuronsäure wurde durch Oxydation der Aldehyd-Gruppe der Acetyl-neuraminsäure nach Willstätter-Schudel und Reduktion des Oxydationsproduktes mit H₂ im Bombenrohr versucht. Andererseits wurde die Aminoglucuronsäure von Heyns und Paulsen²⁶⁾ entsprechend behandelt und die Reaktionsprodukte wurden papier-

²⁶⁾ K. H. Heyns u. H. Paulsen, Chem. Ber. 88, 188 [1955].

chromatographisch miteinander verglichen. Die erwartete α -Aminoadipinsäure ließ sich in beiden Fällen nur in kleinen Mengen nachweisen, die als Hauptprodukt auftretenden Aminosäuren, offenbar unvollständige Reduktionsprodukte, hatten aber genau dieselben R_F -Werte. Damit ergaben sich immerhin Anhaltspunkte für das Vorkommen eines derartigen C₆-Körpers. Die Erythrit-Komponente konnte dagegen bis jetzt noch nicht gefaßt werden. Jedoch wird die hier als Arbeitshypothese vorgeschlagene Strukturformel (s. S. 351) allen bis jetzt vorliegenden experimentellen Befunden gerecht.

Eingegangen am 5. März 1956 [A 725]

Analytisch-technische Untersuchungen

Zur quantitativen Bestimmung organischer Peroxyde

Teil I: Zwei kolorimetrische Methoden

Von Prof. Dr. K. UEBERREITER und Dr. G. SORGE

Aus dem Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft, Berlin-Dahlem

Zwei neue kolorimetrische Verfahren zur quantitativen Bestimmung organischer Peroxyde werden beschrieben. Beide arbeiten in organischen Lösungsmitteln und homogener Phase. Für Messungen in Eisessig empfiehlt sich das Indamin-, für Messungen in Benzol das Methylenblau-Verfahren. Luftsauerstoff stört nicht, so daß man ohne Fremdgas-Atmosphäre arbeiten kann. Mit dem Methylenblau-Verfahren werden noch 0,03 γ aktiver Sauerstoff quantitativ erfaßt, die Grenzkonzentration beträgt 1:30000000. Damit gehört das Verfahren zu den empfindlichsten, bisher bekannten analytischen Methoden.

Bei der kinetischen Untersuchung¹⁾ der durch Fluorenon-peroxyd sensibilisierten Styrol-Polymerisation erschien wegen der geringen Peroxyd-Konzentrationen keines der bekannten Peroxyd-Bestimmungsverfahren geeignet.

Jodometrische Verfahren erfordern insbes. bei Gegenwart von Doppelbindungen unbequeme Arbeitsbedingungen; ferner stört in organischen Lösungsmitteln die gelbe Farbe des Fluorenon-peroxyds und Fluorenon. Die titanometrischen Methoden, die z. B. von Boundy und Boyer²⁾ empfohlen werden, arbeiten in wäßrigen oder wasserhaltigen Lösungen oder gar in zwei verschiedenen Phasen. Etwa vorhandenes Polystyrol muß vor oder während der Bestimmung ausgefällt werden, wobei bes. bei kleinen Peroxyd-Mengen Fehler durch Adsorption auftreten können.

Auch die übrigen Verfahren erwiesen sich als zu unempfindlich oder zu umständlich. Es mußte eine Methode gefunden werden, mit der 10⁻⁶ g aktiver Sauerstoff in organischen Verbindungen auch neben Doppelbindungen sicher und möglichst bequem quantitativ bestimmt werden konnte.

1. Indamin-Verfahren

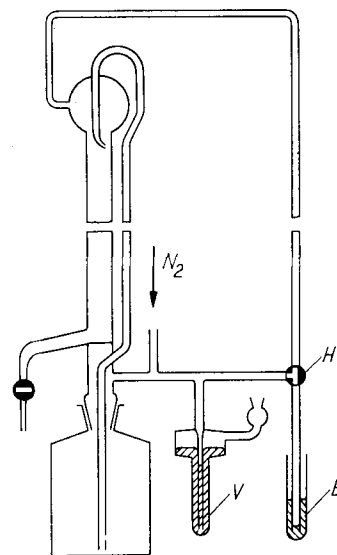
Rothenfußer³⁾ gibt ein halbquantitatives Verfahren an, das 4,4'-Diamino-diphenylaminsulfat in alkoholischer Suspension zum Nachweis von Benzoylperoxyd in Mehl verwendet. Danach soll eine 1proz. Aufschlämmung von handelsüblichem, blaugrauem Diamino-diphenylaminsulfat in Alkohol beim Kochen farblos werden. Die Methode erwies sich in dieser Form als nicht brauchbar und mußte umgearbeitet werden.

Reduktives Umsalzen des sehr schwer löslichen Sulfats durch Erhitzen in Eisessig unter Zusatz von Zink liefert leicht eine farblose Lösung des Diamino-diphenylaminacetats in Eisessig, die sich unter Stickstoff wochenlang unverändert hält. Stört der Zink-Gehalt der Lösung, so stellt man aus dem Sulfat zunächst die freie Base rein dar und löst diese dann in Eisessig.

Darstellung von Diamino-diphenylamin. Eine siedend gesättigte, schwach essigsäure wäßrige Lösung des 4,4'-Diamino-diphenylaminsulfats wird mit Zink reduziert und dann mit überschüssiger heißer Bariumacetat-Lösung versetzt. Nach einigen Minuten wird heiß filtriert. Das Filtrat wird unter Luftabschluß rasch gekühlt, in einem Scheidetrichter mit Chloroform unterschichtet, vorsichtig mit Natronlauge und Aluminium-Pulver versetzt und geschüttelt. Die nahezu farblose Lösung der freien Base in Chloroform wird abgetrennt und mit dem doppelten Volumen Petroläther versetzt. Nun wird erneut unter Luftabschluß gekühlt und nach einigen Stunden die abgeschiedene weiße Substanz abfiltriert. Nach dem Trocknen ist diese luftbeständig. Zur Peroxyd-Bestimmung verwendet man eine 0,05- bis 0,1proz. Lösung der Base in Eisessig.

Analysenvorschrift.

Die Diphenylaminacetat-Lösung wird in einer automatischen Bürette unter Stickstoff aufbewahrt (s. Bild 1). Ein (beispielsweise mit Glycerin gefüllter) Blasen-zähler B erleichtert die Einstellung und Kontrolle des Stickstoff-Stromes. Ein geringer Stickstoff-Überdruck in der Apparatur verhindert das Eindringen von Luftsauerstoff. Zum Füllen der Bürette dreht man den Dreiwegehahn H um 180° und verstärkt den Stickstoff-Strom. Die Form des Sicherheitsventils V verhindert bei zu großem Druck ein Überspritzen des Quecksilbers. Die Quecksilbersäule soll mindestens 80 mm hoch sein.



[A 715 T]

Bild 1

Apparatur zum Aufbewahren und Abmessen luftempfindlicher Lösungen. B = Blasen-zähler, H = Dreiwegehahn, V = Quecksilber-Sicherheitsventil

Oxydationsmittel färben die Lösung des 4,4'-Diamino-diphenylamins in Eisessig intensiv blau. Das Absorptionsmaximum liegt bei 640 m μ . Zur Peroxyd-Bestimmung verdünnt man die Lösung etwa im Verhältnis 1:20

¹⁾ Wird demnächst veröffentlicht.

²⁾ R. H. Boundy u. R. F. Boyer, Styrene, New York 1952, S. 162.

³⁾ S. Rothenfußer, Chemiker-Ztg. 49, 285, 535 [1925].