

nazin vom Schmp. 208°. Aus der Mutterlauge ließen sich durch Ausziehen mit Chloroform und Chromatographieren an Aluminiumoxyd weitere 300 mg Phenazin vom Schmp. 211° gewinnen. Die hellgelben Kristalle lösten sich in konz. Schwefelsäure rot.

Phenazin des Kakothelins: Die Suspension von 2 g Kakothelin³⁶⁾ in 25 ccm Methanol wurde mit der Lösung von 1 g o-Phenyldiamin in 50 ccm Eisessig 15 Min. auf dem Wasserbad erwärmt. Dabei schieden sich gelbe Nadeln ab, die nach Stehenlassen über Nacht abgesaugt, gut mit Wasser gewaschen und auf Ton getrocknet wurden: 1.88 g gelbe Prismen vom Schmp. 285–290° (Zers.). Zur Analyse wurden sie aus Wasser unter Zusatz von etwas n Natriumacetat umkristallisiert. Danach lag der Schmp. oberhalb von 300°. Schwefelsäure löste rot.

$C_{27}H_{25}O_5N_5 \cdot 3\frac{1}{2}H_2O$ (562.8) Ber. C 57.64 H 5.73 N 12.45 Verl. ($3\frac{1}{2}H_2O$) 11.27
Gef. C 57.57, 57.50 H 5.93, 5.94 N 12.14 Verl. (100°) 12.34

Phenazin des Brucinchinons: Die Lösung von 3 g Brucinchinon-perchlorat³⁷⁾ in 100 ccm n NaHCO₃ wurde mehrmals mit insgesamt 250 ccm Chloroform ausgeschüttelt. Zu der i. Vak. auf 50 ccm eingedrängten, roten Chloroformlösung fügte man die Lösung von 700 mg o-Phenyldiamin in 50 ccm Chloroform. Nach 2 Tagen wurde i. Vak. zur Trockne gebracht, der gelbbraune, harzige Rückstand in Benzol aufgenommen und die Lösung an Aluminiumoxyd chromatographiert. Aus dem Eluat (Benzol + 1% Methanol) kristallisierten nach Einengen gelbe Prismen, die zur Analyse aus Methanol umkristallisiert wurden: 1.4 g reines Phenazin vom Schmp. 298° (Zers.). In konz. Schwefelsäure löste sich der Stoff tiefrot.

$C_{27}H_{24}O_2N_4$ (436.5) Ber. C 74.29 H 5.54 N 12.84 Gef. C 73.97 H 5.83 N 12.86

Das Phenazin ließ sich nicht analog wie im Falle des Kakothelins darstellen (verschiedene Löslichkeit und Stabilität der beiden Chinone).

72. Richard Kuhn und Hans Helmut Baer: Die Konstitution der Lacto-N-tetraose

[Aus dem Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Institut für Chemie, Heidelberg]
(Eingegangen am 14. November 1955)

Herrn Professor Dr. Karl Freudenberg zum 70. Geburtstag

Das Tetrasaccharid der Frauenmilch wurde katalytisch hydriert und der erhaltene Lacto-N-tetraose erschöpfend methyliert. Als Spaltstücke erhielten wir 1.2.3.5.6-Pentamethyl-D-sorbit, 2.4.6-Trimethyl-D-galaktose, 4.6-Dimethyl-D-glucosamin und 2.3.4.6-Tetramethyl-D-galaktose. Die Identifizierung der krist. 2.4.6-Trimethyl-D-galaktose mit einem synthet. Vergleichspräparat erfolgte durch Misch-Schmp., Drehungsvermögen und R_F-Wert. Dieses Spaltstück zeigt, daß die nicht reduzierende Hälfte der Tetraose (Lacto-N-biose I = 3-β-D-Galaktopyranosyl-N-acetyl-D-glucosamin) mit der reduzierenden Hälfte (Lactose) über das Hydroxyl am dritten C-Atom des Galaktose-Restes des Milchzuckers verknüpft ist. Der Lacto-N-tetraose kommt somit die Konstitutionsformel I zu. Das vorliegende Ergebnis klärt zugleich die Konstitution der Lacto-N-biose II (Formel II), der Lacto-N-triose I (Formel III) und der Lacto-N-triose II (Formel IV), die durch partielle Säurehydrolyse des Tetrasaccharids erhalten worden waren.

In einer Menge von durchschnittlich etwa 0.5 g pro Liter findet sich in der Frauenmilch ein Tetrasaccharid. Da es stickstoffhaltig ist und aus Milch

³⁶⁾ Dargestellt nach H. Leuchs, F. Osterburg u. H. Kaehr, Ber. dtsch. chem. Ges. 55, 564 [1922].

³⁷⁾ H. Leuchs, H. Seeger u. K. Jaegers, Ber. dtsch. chem. Ges. 71, 2023 [1938].

gewonnen wurde, erhielt es den Namen Lacto-*N*-tetraose¹). Sein Bauplan² ist: >*D*-Glucose > *D*-Galaktose > *N*-Acetyl-*D*-glucosamin > *D*-Galaktose. Die reduzierende Hälfte der Tetraose, nämlich das Disaccharid >*D*-Glucose > *D*-Galaktose, ist durch partielle Säurehydrolyse kristallisiert erhalten und mit Lactose identifiziert worden³). Die nicht reduzierende Hälfte der Tetraose, das als Lacto-*N*-biose I bezeichnete, schön kristallisierte und sehr alkaliempfindliche Disaccharid >*N*-Acetyl-*D*-glucosamin > *D*-Galaktose konnte in seiner Konstitution auch bereits aufgeklärt werden: es handelt sich um 3-β-*D*-Galaktopyranosyl-*N*-acetyl-*D*-glucosamin³). Ungeklärt war die zentrale glykosidische Bindung des Tetrasaccharids geblieben, d. h. die Natur des Disaccharids >*D*-Galaktose > *N*-Acetyl-*D*-glucosamin, das auch unter den Produkten der Partialhydrolyse mit verd. Säure gefunden und als Lacto-*N*-biose II bezeichnet worden ist.

Die direkte Konstitutionsaufklärung der Lacto-*N*-biose II hätte einen außerordentlichen präparativen Aufwand erfordert, da sie in viel geringeren Mengen als die Lacto-*N*-biose I auftritt und es nicht gelungen ist, durch Variation der zur Partialhydrolyse angewandten Säuren (HCl, H₂SO₄, CO₂) und Temperaturen (mit CO₂ unter Druck) die Mengen an *N*-Biose II nennenswert zu steigern. Wir haben daher das intakte, viel leichter zugängliche Tetrasaccharid zu permethylieren beschlossen. Aus den methylierten Spaltstücken mußte sich auch die Konstitution der in größeren Mengen nicht leicht erhältlichen Lacto-*N*-biose II ergeben.

Die einzigen Anhaltspunkte, die hinsichtlich der Natur dieses Disaccharids und damit der zentralen glykosidischen Bindung der Lacto-*N*-tetraose vorlagen, waren: a) die synthetisch erhaltene 6-β-*N*-Acetyl-*D*-glucosaminido-*D*-galaktose⁴) war von der Lacto-*N*-biose II verschieden; b) es konnte sich auch nicht um eine 2-Acetylglucosaminido-galaktose handeln, weil die kristallisierte Lacto-*N*-triose I (>*D*-Galaktose > *N*-Acetyl-*D*-glucosamin > *D*-Galaktose) ein schönes Phenylsazon der erwarteten Zusammensetzung ergab⁵); c) für 1,3-Verknüpfung in der Mitte des Tetrasaccharids sprachen Versuche mit Perjodsäure. Ließ man 5 Moll. Natriummetaperjodat bei pH 5 einwirken, so fand man nach anschließender Säurehydrolyse noch Galaktose und Glucosamin. Die kopfständige Glucose und die endständige Galaktose mit ihren Glykol-Gruppierungen waren abgebaut. Wäre die zentrale Bindung 1,4, dann hätte auch der zweite Galaktose-Rest eine Glykol-Gruppierung, die hätte angegriffen werden sollen.

Die Alkalieempfindlichkeit der Lacto-*N*-tetraose – sie zerfällt bei Einwirkung warmer verd. Natriumcarbonatlösung unter Bildung von „Anhydro-acetylglucosamin“, das mit *p*-Dimethylaminobenzaldehyd in salzsaurer Lösung eine violettrote Farbreaktion (Morgan-Elson) liefert⁶) – bedeutete eine ernste Schwierigkeit und stellte einen Erfolg sämtlicher Methylierungsmethoden in Frage. Wir haben nun gefunden, daß es mit Hilfe von brauem Palladium-oxyhydrat-Bariumsulfat⁷) gelingt, die Lacto-*N*-tetraose

¹⁾ R. Kuhn, A. Gauhe u. H. H. Baer, Chem. Ber. 86, 827 [1953].

²⁾ R. Kuhn, A. Gauhe u. H. H. Baer, Chem. Ber. 87, 289 [1954].

³⁾ R. Kuhn, H. H. Baer u. A. Gauhe, Chem. Ber. 87, 1553 [1954].

⁴⁾ R. Kuhn u. W. Kirschenlohr, Chem. Ber. 87, 384 [1954].

⁵⁾ Vergl. hierzu R. Kuhn, Angew. Chem. 67, 184 [1955], sowie eine folgende Mitteilung.

⁶⁾ R. Kuhn, A. Gauhe u. H. H. Baer, Chem. Ber. 87, 3138 [1954].

⁷⁾ R. Kuhn u. H. J. Haas, Angew. Chem. 67, 785 [1955].

katalytisch in wäßriger Lösung unter Aufnahme von 1 Mol. Wasserstoff glatt zum Lacto-N-tetrait zu hydrieren, der heiße Fehlingsche Lösung nicht reduziert, mit Anilinhydrogenphthalat nicht reagiert und auch die Morgan-Elson-Reaktion nicht mehr gibt. Damit war die Alkalilabilität des Tetrasaccharids überwunden und der Weg zur Permethylierung freigelegt. Wir haben diese mit Silberoxyd und Methyljodid in Dimethylformamid⁸⁾ durchgeführt und die Tetradekamethyl-Verbindung des Lacto-N-tetraits mit richtigem Methoxylgehalt in guter Ausbeute (über 80 % d.Th., chromatographisch gereinigt) erhalten.

Nach Säurehydrolyse des Tetradekamethyläthers zeigte sich ein weiterer Vorteil der vorangegangenen katalytischen Hydrierung. Die für die Konstitutionsfrage entscheidende Trimethyl-galaktose trat als alleinige Trimethylhexose auf; wäre das Tetrasaccharid als solches permethyliert worden, so hätte sie von der isomeren 2.3.6-Trimethyl-glucose getrennt werden müssen. Aus dem Hydrolysat (die Schwefelsäure hatten wir mit Bariumhydroxydlösung entfernt) ließen sich der 1.2.3.5.6-Pentamethyl-D-sorbit und die 2.3.4.6-Tetramethyl-D-galaktose mit Chloroform leicht ausschütteln. Die gesuchte Trimethyl-D-galaktose und das gebildete 4.6-Dimethyl-D-glucosamin blieben in der wäßrigen Lösung. Durch den Kationenaustauscher Amberlite IR 120 (H^{\ominus}) wurde der Aminozucker abgetrennt. Aus dem Filtrat der Austauschersäule schied sich beim Eindampfen 2.4.6-Trimethyl-D-galaktose sofort in farblosen Prismen ab. Ein synthetisches Präparat hat uns für Vergleichszwecke Herr Prof. Dr. E. L. Hirst, Edinburgh, in freundlicher Weise zur Verfügung gestellt. Der Misch-Schmp. ergab keine Depression, die R_F -Werte waren identisch.

2.4.6-Trimethyl-D-galaktose	$[\alpha]_D^{22}$ in H_2O	Schmp.
aus Lacto-N-tetraose	+ 126° → + 88.4°	102–103° }
Präparat von E. L. Hirst	– 124° → + 90.4° ⁹⁾	102–103° }

Auch die Anilide stimmen überein. Anilid der 2.4.6-Trimethyl-D-galaktose aus Lacto-N-tetraose: Schmp. 177°, $[\alpha]_D^{22}$: –90° → +38.8° (Aceton). Literaturwerte¹⁰⁾: Schmp. 179°, $[\alpha]_D^{22}$: –92° → +38° (Aceton).

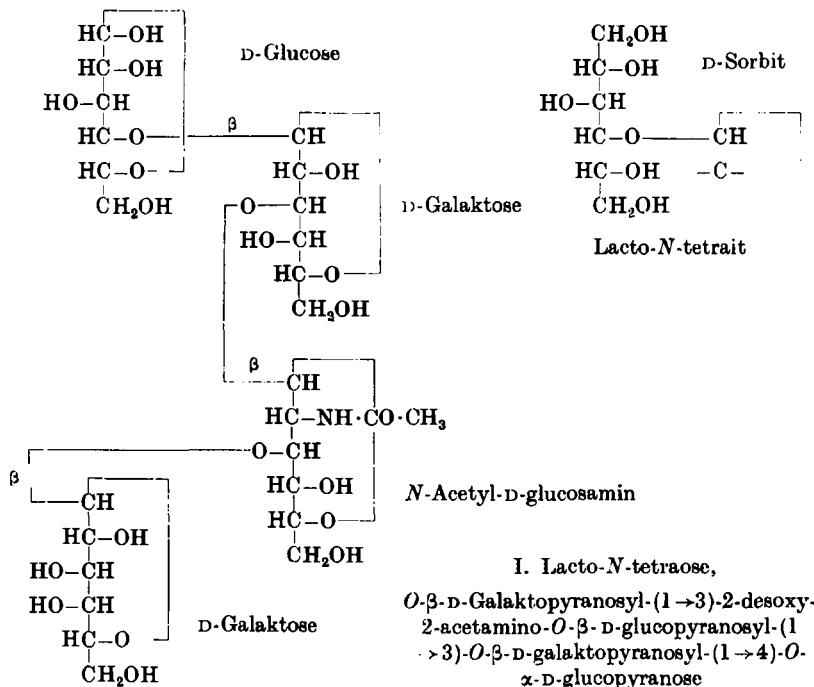
Die Isolierung von 2.3.4.6-Tetramethyl-D-galaktose (Anilid: Schmp. 192 bis 192.5°) und von 4.6-Dimethyl-D-glucosamin aus dem Hydrolysat des Tetradekamethyl-lacto-N-tetraits stehen in Einklang mit den auf anderen Wegen^{1,2,3)} bereits gewonnenen Einblicken in die Konstitution des Tetrasaccharids. Die 2.4.6-Trimethyl-D-galaktose beweist, daß die zentrale Bindung eine 1→3-Bindung ist und der Lacto-N-tetraose die Formel I zukommt. Sie enthält eine 1→4 und zwei 1→3-Bindungen, die alle β-glykosidisch sind. Für die Lactose und für die Lacto-N-biose I ist die β-glykosidische Verknüpfung der

⁸⁾ R. Kuhn, H. Trischmann u. I. Löw, Angew. Chem. 67, 32 [1955].

⁹⁾ D. J. Bell u. S. Williamson, J. chem. Soc. [London] 1938, 1196; E. G. V. Percival fand laut Privatmitteil. an diese Autoren: + 124° → + 89° (H_2O).

¹⁰⁾ E. L. Hirst u. J. K. N. Jones, J. chem. Soc. [London] 1939, 1482.

Hexosen synthetisch gesichert. Die Lacto-*N*-biose II und damit die zentrale Bindung der Lacto-*N*-tetraose ist gleichfalls β -glykosidisch, da die von R. Kuhn und H. Tiedemann¹¹⁾ aus *Aspergillus oryzae* gewonnene *N*-Acetyl-glucosaminidase, die nur β - aber keine α -Glykoside des *N*-Acetyl-D-glucosamins angreift, die Lacto-*N*-biose II leicht spaltet¹¹⁾. Es sind somit alle Einzelheiten der Konstitution und Konfiguration geklärt. In Formel I ist die oberste OH-Gruppe nach rechts geschrieben, weil die kristallisierte Lacto-*N*-tetraose abwärts mutarotiert.



Der den neuesten Regeln¹²⁾ entsprechende systematische Name für die Lacto-N-tetraose ist unter dem Formelbild I angegeben. Man hat kürzlich dagegen Stellung genommen, daß auf dem Gebiete der Oligosaccharide so viele das Gedächtnis belastende Trivialnamen eingeführt würden, obgleich rationelle Namen zur Verfügung stünden. „Consequently, chemists should not be burdened with the need for learning trivial names“¹³⁾. Wir möchten dem Leser das Urteil darüber überlassen, welcher von den beiden Namen, die unter Formel I stehen, die größere Bürde für das Gedächtnis bedeutet.

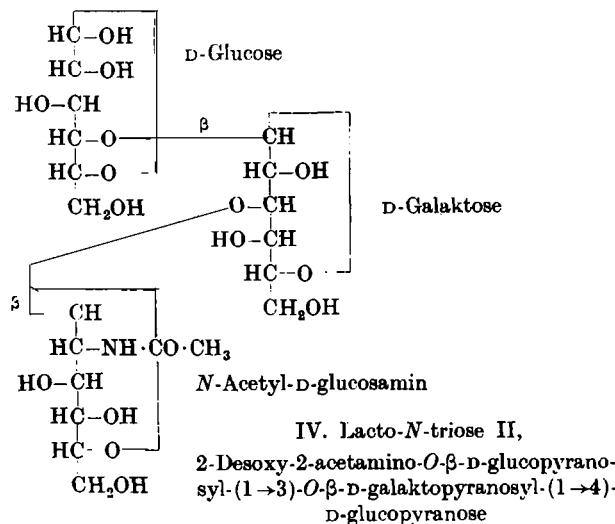
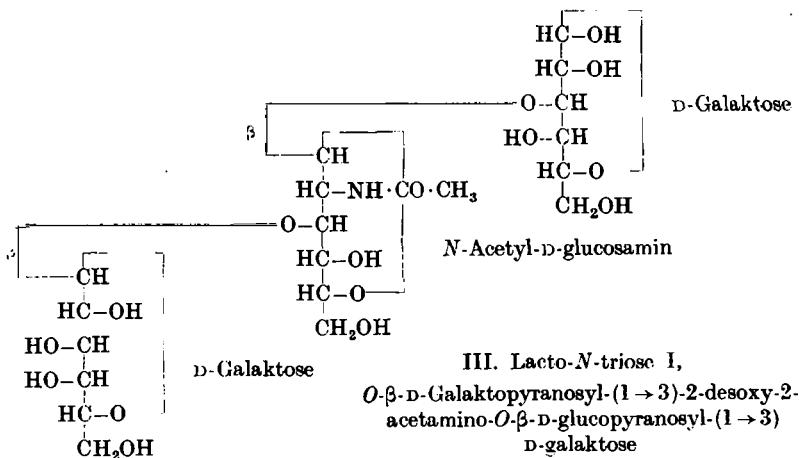
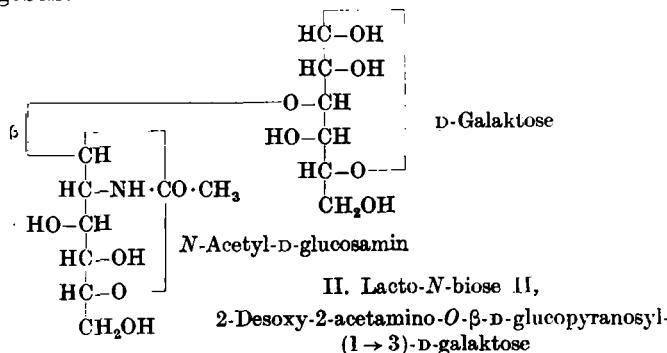
Die vorliegende Konstitutionsaufklärung der Lacto-*N*-tetraose erlaubt es auch für die Lacto-*N*-biose II, die Lacto-*N*-triose I und die Lacto-

¹¹⁾ Chem. Ber. 87, 1141 [1954].

¹²) J. chem. Soc. [London] 1952, 5108; Chem. Engng. News 31, 1776-1782 [1953].

¹³⁾ R. L. Whistler u. D. I. McGilvray, Ann. Rev. Biochem. **23**, 82 [1954].

N-triose II, die durch partielle Säurehydrolyse des Tetrasaccharids gewonnen worden sind, deren Konstitution aber noch unbekannt war, die folgenden Formeln anzugeben:



Sehr zu danken haben wir Fräulein Dr. A. Gauhe, die gemeinsam mit Fr. A. Sceliger, Fr. D. Tschampel und Herrn W. Dafeldecker die für diese Untersuchung benötigte Lacto-N-tetraose aus Frauenmilch isoliert hat. Für die Überlassung von Vergleichspräparaten möchten wir Herrn Prof. Dr. E. L. Hirst, Edinburgh, und Herrn Prof. Dr. J. K. N. Jones, Ontario/Kanada, auch an dieser Stelle bestens danken.

Beschreibung der Versuche

Lacto-N-tetraose: 2.1 g krist. Lacto-N-tetraose-trihydrat wurden mit 3 g brauem Palladium-oxydhydrat-Bariumsulfat in 25 ccm Wasser bei 90–100° unter 90–100 at hydriert. Nach 24 Stdn. zeigten vergleichende Proben mit Fehlingscher Lösung und mit Anilinhydrogenphthalat, daß der Zucker zu 95–97% hydriert war. Darauf haben wir noch 1 g Katalysator zugesetzt und weitere 4 Stdn. bei 100–107° unter 100 at hydriert. Die obigen Proben waren alsdann gänzlich negativ. Nach Absaugen des Katalysators über Talkum und gutem Auswaschen lieferte das eingedampfte Filtrat den Lacto-N-tetraose in quantitativer Ausbeute (1.95 g, exsiccatorgetrocknet). Durch Umfällen aus wenig Wasser mit Äthanol erhält man ihn als weißes, röntgenographisch feinkristallines Pulver, das sich oberhalb 180° unter Braunfärbung zersetzt. $[\alpha]_D^{20} : +4^\circ$ ($c = 2$ in Wasser).

Methylierung: 1.80 g Lacto-N-tetraose wurden in 50 ccm trockenem dest. Dimethylformamid unter gelindem Erwärmen gelöst. Nach dem Erkalten fügten wir 18 ccm Methyljodid und 18 g Silberoxyd zu und schüttelten auf der Maschine 24 Stdn. bei etwa 20° im Dunkeln. Danach haben wir den Schlammb aus Silberjodid und Silberoxyd abzentrifugiert und erst mit 20 ccm Dimethylformamid, dann mehrfach mit Chloroform gewaschen. Die Waschlösungen wurden mit der Lösung des Methylierungsproduktes vereinigt. Beim Zufügen des Chloroforms kristallisierte sofort die weiße Komplexverbindung $2\text{AgJ}\cdot\text{N}(\text{CH}_3)_4\text{J}$ aus, deren Ausscheidung durch überschüssiges Chloroform und kurzes Aufbewahren im Eisschrank vervollständigt wurde. Sie wog nach dem Absaugen, Auswaschen mit Chloroform und Trocknen im Exsiccator 4 g. Wegen ihrer Lichtempfindlichkeit in dem dimethylformamid-haltigen Lösungsmittel (Eintreten von Gelbfärbung) wurden alle Operationen möglichst unter Ausschluß von Licht durchgeführt.

Das Filtrat wurde zuerst bei 12 Torr, dann bei 2 Torr eingedampft (Badtemperatur 40°), wobei ein honiggelber Sirup zurückblieb. Wir reinigten ihn durch Chromatographie an einer kurzen Cellulose-Säule (25 cm lang, 3 cm Ø) unter Verwendung des Lösungsmittelgemisches *n*-Butanol : Benzin (100–120°) : Wasser = 38 : 60 : 2. Der in 10 ccm dieses Gemisches gelöste Sirup wurde auf die mit 65 ccm Gemisch angefeuchtete Säule aufgetragen. Die ersten 50 ccm des Eluats enthielten nichts, die zweiten 50 ccm lieferten nach Entfärben mit Tierkohle das Methylierungsprodukt als farblosen Sirup (2.0 g, exsiccatorgetrocknet), der 44.11% OCH_3 enthielt. Die folgenden Fraktionen aus der Säule ergaben nur noch wenig Rückstand und wurden verworfen.

Zwecks Nachmethylierung wurde das Produkt zweimal in 20 ccm Methyljodid mit 5 g Silberoxyd und 3 g wasserfreiem Calciumsulfat 4 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Der Tetradekamethyl-lacto-N-tetraose stellt einen farblosen zähen Sirup dar.



Hydrolyse: 1.80 g permethylierter Lacto-N-tetraose wurden in 120 ccm *n* H_2SO_4 gelöst und, nach Filtration mit wenig Tierkohle, unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Die Drehung im 2-dm-Rohr, die anfangs $+0.32^\circ$ betragen hatte, stieg dabei innerhalb von 7 Stdn. auf den konstanten Wert von $+1.94^\circ$. Nach 8 Stdn. wurde abgekühlt und die Hauptmenge der Schwefelsäure mit Bariumhydroxydlösung als Bariumsulfat ausgefällt (bis $p_{\text{H}} 5$) und abzentrifugiert. Das Volumen des mit den Waschwässern vereinigten Hydrolysats betrug 1 l. Eine eingeengte Probe ergab im Papierchromatogramm Tetramethyl-galaktopyranose ($R_F 0.69$), eine Trimethyl-galaktose ($R_F 0.55$) und 4,6-Dimethyl-glucosamin ($R_F 0.27$, ninhydrin-positiv). In kleinerer Menge war eine ninhydrin-negative Verbindung vom R_F -Wert 0.37 zugegen, in der wir *N*-Acetyl-4,6-dimethyl-glucosamin vermuten, das seine Gegenwart unvollständiger Hydrolyse verdankt. Die Trimethylgalaktose war von der zum Vergleich aufgetragenen 2,3,4-Trimethyl-galaktose ($R_F 0.53$)

und 3.4.6-Trimethyl-galaktose¹⁴⁾ (R_F 0.51) mit Sicherheit verschieden, jedoch konnten wir in unserem Lösungsmittelgemisch nicht zwischen 2.4.6- und 2.3.6-Trimethyl-galaktose unterscheiden. Wir bedienten uns absteigender Chromatographie auf Schleicher & Schüll-Papier 2043b in *n*-Butanol : Äthanol : Wasser = 4 : 1 : 5.

1.2.3.5.6-Pentamethyl-D-sorbit: Das Hydrolysat (1 l) wurde 3 mal mit 100 ccm Chloroform ausgeschüttelt. Die mit Natriumsulfat getrockneten Extrakte hinterließen beim Eindampfen i.Vak. ein schwach gelbliches Öl (425 mg), in dem zur Hauptsache Pentamethyl-sorbit vorlag, wie aus seiner sehr geringen spezif. Drehung — $[\alpha]_D^{25} : + 2^\circ$ ($c = 1$ in Benzol) — und aus dem hohen Methoxylwert einer i. Hochvak. destillierten Probe — gef. 60.2, ber. 61.5 — hervorging. Jedoch war auch etwas Tetramethyl-galaktose zugegen. Wir haben daher die Substanz einer Behandlung mit Hypojodit nach P. A. Levene und M. Kunz¹⁵⁾ unterworfen und anschließend 2 mal bei 10^{-3} Torr und $78\text{--}83^\circ$ destilliert. Der Pentamethyl-sorbit stellte ein farbloses, ziemlich bewegliches Öl dar. $[\alpha]_D^{25} : -9.4^\circ$ ($c = 1.8$ in absol. Äthanol); $n_D^{25} = 1.4423$.

Lit.¹⁶⁾: $[\alpha]_D^{25} : -10.1^\circ, -9.46^\circ$ (absol. Äthanol); $n_D^{25} \sim 1.4438$.

$C_{11}H_{24}O_6$ (252.3) Ber. C 52.36 H 9.59 OCH₃ 61.50 Gef. C 53.23 H 9.66 OCH₃ 62.02

2.3.4.6-Tetramethyl-D-galaktose-anilid: Nun haben wir die wässrige Hydrolysenlösung i.Vak. auf 100 ccm eingeengt und 10 mal mit 100 ccm Chloroform ausgeschüttelt. Die Fraktionen wurden polarimetrisch und chromatographisch geprüft. Sie enthielten in der Hauptsache Tetramethyl-galaktose, die von wenig Trimethyl-galaktose begleitet war. Nach dem Eindampfen erhielten wir 438 mg eines Sirups (exsiccatorgetrocknet), der nach einigen Tagen zu kristallisierten begann. Zur Überführung in das Anilid erhitzten wir den Zucker mit 175 mg frisch dest. Anilin (1 Mol.) und 5 mg Ammoniumchlorid in 3.5 ccm absol. Methanol 2 Std. gelinde unter Rückfluß. Schon in der Hitze schieden sich reichlich Kristallkrusten ab, die nach dem Abkühlen isoliert und im Zentrifugenglas 2 mal mit wenig kaltem Methanol und 2 mal mit trockenem Äther gewaschen wurden. 325 mg rein weiße Prismen vom Schmp. $192\text{--}192.5^\circ$. $[\alpha]_D^{25} : -82.8^\circ \rightarrow + 39.1^\circ$ (Gleichgewicht nach Zugabe einer Spur $n_{10} HCl$; $c = 1$ in Aceton).

Lit.¹⁶⁾: Schmp. 192° , $[\alpha]_D$ in Aceton: $-77^\circ \rightarrow + 37.7^\circ; -83^\circ \rightarrow + 41^\circ$.

$C_{16}H_{25}O_5N$ (311.4) Ber. N 4.50 4 OCH₃ 39.87 Gef. N 4.96 OCH₃ 39.85

Eine weitere Menge kristallisierten, aber unreineren Anilids erhielten wir durch Aufarbeiten der Mutterlaugen.

2.4.6-Trimethyl-D-galaktose: Nach den oben beschriebenen Abtrennungen des Pentamethyl-sorbits und der Tetramethyl-galaktose haben wir die wässrige Hydrolysenlösung zunächst i.Vak. von ihrem geringen Gehalt an Chloroform befreit und sodann mit Hilfe von etwas Amberlite IR-45 die restlichen Sulfationen entfernt. Die Lösung zeigte dann p_H 7 und enthielt neben der Trimethyl-galaktose als essigsaurer Salz das Dimethyl-glucosamin. Diese trennten wir ab mittels des Kationenaustauschers IR-120(H⁺). Hierzu rührten wir die Lösung — etwa 200 ccm — zuerst mit 10 ccm des Austauschers solange, bis die Ninhydrinreaktion in mit Natriumacetat gepufferten Proben nur noch ganz schwach war. Als dann gossen wir die Lösung mitsamt dem Harz auf eine Säule, die weitere 15 ccm Austauscher enthielt. Das Filtrat war ninhydrin-negativ und zeigte p_H 3.5. Die Säule wurde anschließend mit Wasser gewaschen, bis das Filtrat neutral war, dann noch mit weiteren 100 ccm. Nun engten wir die Lösung i.Vak. auf ein kleines Volumen ein, ent-säuerten mit fein gemahlenem Amberlite IR-45 und verdampften schließlich, zuletzt unter mehrmaligem Zusatz von einigen ccm *n*-Butanol. Der zuerst abgeschiedene Sirup kristallisierte hierbei rasch zu feinen, büschelförmig vereinigten Nadeln, die nach Trocknen im Exsiccator über Schwefelsäure und Kaliumhydroxyd 348 mg wogen und zunächst noch unscharf schmolzen ($70\text{--}82^\circ$). Wir kristallisierten zuerst aus Äther um, der etwas Methanol enthielt, unter Zusatz von Petroläther, wobei wir zwei bei $94\text{--}95^\circ$ bzw. $97\text{--}98^\circ$ schmelzende Fraktionen farbloser Prismen erhielten. Gemeinsame nochmalige Umkristallisation

¹⁴⁾ R. Kuhn u. H. H. Baer, Chent. Ber. 88, 1537 [1955].

¹⁵⁾ J. biol. Chemistry 127, 49 [1939].

¹⁶⁾ J. C. Irvine u. D. McNicoll, J. chem. Soc. [London] 97, 1449 [1910]; W. N. Haworth u. Mitarbb., ebenda 118, 188 [1918]; 1927, 3146.

aus Äther erhöhte den Schmp. auf 102–103°. Misch-Schmp. mit authent. 2.4.6-Tri-methyl-D-galaktose 101–102°.

Zur Analyse wurde 12 Stdn. bei 64°/3 Torr über Diphosphorpentoxyd und Paraffin getrocknet.

$C_6H_{18}O_6$ (222.2) Ber. C 48.64 H 8.16 3 OCH₃ 41.89 Gef. C 49.02 H 7.91 OCH₃ 42.69
 $[\alpha]_D^{25}$: + 126.5° (4 Min.) → + 88.4° (Endwert nach 3 Stdn., c = 1.08 in Wasser).

2.4.6-Tri-methyl-D-galaktose-anilid: 54 mg Trimethyl-galaktose wurden mit 23 mg frisch dest. Anilin (1 Mol.) in 2 ccm absol. Äthanol 3 Stdn. vorsichtig unter Rückfluß erhitzt. Die hellgebliebene Lösung engten wir i.Vak. stark ein. Die dabei abgeschiedenen Kristalle wurden mit Äther verrieben, abzentrifugiert und mit alkoholhaltigem Äther und danach mit reinem Äther gewaschen. Die vereinigten Waschflüssigkeiten wurden i.Vak. eingedampft. Der Rückstand lieferte, in 2 ccm Äthanol aufgenommen und mit frischem überschüssigem Anilin versetzt, nach 3 stdg. Erhitzen eine weitere beträchtliche Menge Anilid, das auf die gleiche Weise isoliert wurde. Der Schmp. des Rohproduktes war 172°. Nach Umkristallisation aus säurefreiem Essigester erhielten wir schöne, farblose, i.Vak. sublimierbare Prismen vom Schmp. 177°.

$C_{15}H_{23}O_5N$ (297.4) Ber. 3 OCH₃ 31.31 Gef. OCH₃ 31.02
 $[\alpha]_D^{25}$: -90° (10 Min.) → + 38.8° (Gleichgewichtseinstellung mit einer Spur n/10 HCl katalysiert; c = 0.5 in Aceton).

Perjodatoxydation der Lacto-N-tetraose: 141.4 mg wasserfreie Tetraose (0.2 mMol) und 217 mg Natriummetaperjodat (5 · 0.2 mMol = 213.9 mg) wurden in 25 ccm Wasser gelöst und bei 22° im Dunkeln stehen gelassen. Nach 48 Stdn. wurde ein aliquoter Teil zur Titration entnommen¹⁷⁾, die einen Verbrauch von 4.7 der eingesetzten 5 Moll. Perjodat anzeigen. Nach 72 Stdn. war kein Perjodat mehr vorhanden (Tüpfelreaktion!). Zur Entfernung des gebildeten Jodats und der Aneisensäure haben wir zunächst mit Ionenaustauschern behandelt. Da es uns auf diese Weise nicht gelang, die letzten Spuren von Jodat zu beseitigen, haben wir mit 1 ccm verd. Schwefelsäure und einigen Tropfen Kaliumjodidlösung versetzt und das wenige ausgeschiedene Jod nach 3 Min. mit Chloroform ausgeschüttelt. Nach erneuter Austauscherbehandlung wurde die Lösung i.Vak. eingedampft. Den Rückstand haben wir mit 10 ccm 2 n H₂SO₄ 2.5 Stdn. bei 105° in zugeschmolzener Ampulle hydrolysiert. Nach Neutralisation mit Bariumhydroxydlösung ergab das Papierchromatogramm reichlich Galaktose und Glucosamin; Glucose war abwesend.

73. Walter Mayer und Rolf Fikentscher¹⁾: 2.3.4.5-Tetrahydroxybenzoësäure

[Aus dem Chomischen Institut der Universität Heidelberg]
(Eingegangen am 17. November 1955)

Herrn Professor Dr. K. Freudenberg zum 70. Geburtstag gewidmet

Brom-trimethyläther-gallussäure, nach einem verbesserten Verfahren leicht aus Trimethyläther-gallussäure zugänglich, lässt sich in Gegenwart von Kupferpulver leicht zur Hydroxy-trimethyläther-gallussäure verseifen. Einige irrtümliche Angaben der Literatur über diese Verbindung werden berichtigt. Ihre Entmethylierung mit AlBr₃ oder AlCl₃ führt in glatter Reaktion zur 2.3.4.5-Tetrahydroxybenzoësäure. Eine am entsprechenden Methylester gleicherweise durchgeföhrte Entmethylierung ergab unter Schonung der Estergruppe 2.3.4.5-Tetrahydroxy-benzoësäure-methylester.

Dehydro-digallussäure²⁾ (I) liefert beim Erwärmten in verd. Natronlauge nahezu 1 Mol. Gallussäure²⁾. Eine ähnlich leichte Spaltung einer Diphenyl-

¹⁷⁾ Methodik: Vergl. l. c.²⁾.

¹⁾ Teil der Diplomarb. und Dissertat. R. Fikentscher, Heidelberg 1954 bzw. 1956.

²⁾ W. Mayer, Liebigs Ann. Chem. 578, 34 [1952].