

81. Otto Westphal und Heinz Feier: Darstellung künstlicher Antigene mit determinanten Zuckergruppen, II. Mitteil.: Synthese der *p*-Aminophenyl-*O*- α -glykoside von L-Fucose, L-Rhamnose, D-Galaktose und D-Mannose¹⁾

[Aus dem Dr. A. Wander-Forschungsinstitut, Säckingen/Baden, und dem Chemischen Laboratorium der Universität Freiburg i. Br.]

(Eingegangen am 30. September 1955)

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

Zur Darstellung künstlicher Antigene mit L-Fucose, L-Rhamnose, D-Galaktose und D-Mannose als determinanter Gruppe wurden die bisher nicht bekannten *p*-Aminophenyl- α -glykoside dieser Zucker hergestellt. Die Glykoside wurden anschließend in bekannter Weise (Azoverfahren) diazotiert und an Proteine gekuppelt. Die Zuckerphenylazo-proteine sind geeignet, die antigene Spezifität der genannten Zucker im Vergleich mit einigen natürlichen Zucker- bzw. Polysaccharid-Antigenen zu untersuchen.

Bei der immunchemischen Analyse antigenen Polysaccharide und Polysaccharid-Komplexe (Mucopolysaccharide, Lipopolysaccharide usw.) hat sich immer wieder ergeben, daß die Immunspezifität durch oligosaccharidische determinante Gruppen – vielfach in der Größenordnung von Tri-, Di- oder gelegentlich sogar Monosacchariden – bedingt ist²⁾. Der Nachweis niedrigmolekularer determinanter Gruppen erfolgt durch serologische Hemmungsexperimente, bei welchen die Konkurrenz-Reaktion zwischen dem hochmolekularen Antigen einerseits und dem niedrigmolekularen determinierenden Hapten andererseits gegenüber dem vorgegebenen Antikörper (Antiserum) quantitativ verfolgt wird³⁾. Unter den natürlichen Mucopolysaccharid-Antigenen beanspruchen die Blutgruppensubstanzen des Menschen und der Tiere besonderes immunchemisches Interesse. Sie wurden bekanntlich durch K. Freudenberg und seine Mitarbeiter³⁾ vor mehr als 20 Jahren erstmals als Polysaccharide erkannt und näher analysiert. Neuerdings wurde gefunden, daß verschiedene Pflanzen- und Pilzextrakte, insbesondere Auszüge aus Samen von *Euphorbiaceen* und *Papilionaceen*, proteinische Substanzen enthalten, welche Blutkörperchen gruppenspezifisch agglutinieren (sog. Phytagglutinine)⁴⁾ und sich demgemäß ähnlich verhalten wie menschliche Isoagglutinine (Anti-A, Anti-B usw.). Die pflanzlichen Hämagglutine werden nun teilweise durch Monosaccharide, Disaccharide oder einfache Glykoside relativ spezifisch gehemmt⁵⁾. So wird nach D. Aminoff, W. T. J. Morgan und W. M.

¹⁾ I. Mitteil.: O. Westphal u. H. Schmidt, Liebigs Ann. Chem. **575**, 84 [1951].

²⁾ Siehe z. B. O. Westphal, Chemie **57**, 57 [1944]; W. C. Boyd, Fundamentals of Immunology, New York [1947]; H. Schmidt, Fortschritte der Serologie, Darmstadt [1950/52].

³⁾ K. Freudenberg u. H. Eichel, Liebigs Ann. Chem. **510**, 240 [1934]; **518**, 95 [1935]; K. Freudenberg u. O. Westphal, S.-B. Heidelberger Akad. Wiss., math.-naturwiss. Kl. **1938**, 1–38 u. weitere Publ. daselbst.

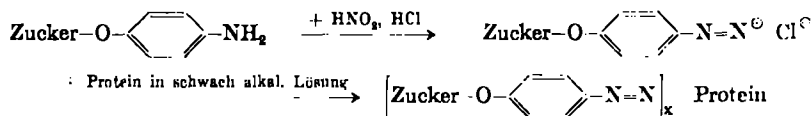
⁴⁾ Lit. bei M. Krüpe, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **299**, 277 [1955].

⁵⁾ Brit. J. exp. Pathol. **34**, 94 [1953].

Watkins⁵⁾ die Agglutination menschlicher O-Blutkörperchen mit Samenextrakt aus *Lotos tetragonolobus* durch α -Methyl-L-fucosid noch in Verdünnungen bis 1:50000 spezifisch gehemmt. Hemmungen anderer Systeme mit weiteren Zuckern sind ebenfalls beschrieben worden⁴⁾. Man kann vermuten, daß die mit den Phyttagglutininen reagierenden chemischen Gruppen an der Oberfläche der Erythrocyten bzw. in den Blutgruppensubstanzen enge strukturelle Beziehungen zu jenen Zuckern oder Glykosiden besitzen, welche als Hemmstoffe bei der Phyttagglutination wirksam sind.

Die für die Blutgruppen-Eigenschaften verantwortlichen Mucopolysaccharide bestehen nach Morgan⁶⁾ zu $\sim 80\%$ aus D-Galaktose, L-Fucose, N-Acetyl-D-glucosamin und N-Acetyl-D-galaktosamin sowie zu $\sim 20\%$ aus Aminosäuren. Es schien nun von Interesse, das immunologische Verhalten künstlicher Antigene mit den genannten und einigen weiteren Zuckern als jeweiliger determinanter Gruppe zu untersuchen und die erhaltenen Antiseren gegen diese Zucker mit passenden Phyttagglutininen zu vergleichen.

Zur Darstellung künstlicher Zuckerantigene koppelt man bekanntlich den betreffenden Zucker an antigene Proteine. Hierzu eignet sich besonders das Azoverfahren von K. Landsteiner (siehe i.c.²⁾), welches darin besteht, daß das jeweilige *p*-Aminophenyl- oder *p*-Aminobenzyl-glykosid diazotiert und in schwach alkalischer Lösung an Proteine gekuppelt wird, wobei gelb- bis orangefarbene Zucker-phenylazo-proteine gebildet werden²⁾.



Wir gingen, in Analogie zu einem schon früher angegebenen Verfahren¹⁾, von den *p*-Aminophenyl-glykosiden der betreffenden Zucker aus.

Von D-Galaktose⁷⁾ und N-Acetyl-D-glucosamin¹⁾ sind bisher nur die *p*-Aminophenyl- β -glykoside hergestellt und in künstliche Antigene übergeführt worden^{1, 7)}. *p*-Aminophenyl- α -D-galaktosid erhielten wir durch katalytische Hydrierung des bereits bekannten *p*-Nitrophenyl- α -D-galaktosids⁸⁾. Versuche zur Gewinnung des *p*-Aminophenyl-N-acetyl- α -D-glucosaminids waren bisher nicht erfolgreich. Wir berichten nachstehend über die Darstellung chemospezifischer Antigene mit α -L-Fucose. Zu Vergleichszwecken haben wir noch α -L-Rhamnose- und α -D-Mannose-Antigene hergestellt. In einer folgenden Mitteilung⁹⁾ beschreiben wir ferner die Darstellung von α - und β -D- und -L-Arabinose-Antigenen.

Bekanntlich lassen sich künstliche Antigene mit α - und β -Glucose unterscheiden¹⁰⁾; die Art der glykosidischen Bindung eines determinanten Zuckers ist demnach für die antigene Spezifität von Bedeutung.

¹⁾ Biochem. J. **48**, 426 [1950].

⁷⁾ W. F. Goebel u. O. T. Avery, J. exp. Medicine **50**, 521, 533 [1929].

⁸⁾ B. Helferich u. K.-H. Jung, Liebigs Ann. Chem. **589**, 77, [1954]; **595**, 242 [1955].

⁹⁾ H. Feier u. O. Westphal, Chem. Ber. **89**, 589 [1956].

¹⁰⁾ W. F. Goebel, O. T. Avery u. H. Babers, J. exp. Medicine **55**, 761, 769 [1932].

Die Synthese eines Phenylglykosids gelang erstmals A. Michael¹¹⁾, der Acetochlor-glucose in absol. Alkohol mit Phenolnatrium umsetzte. Diese Methode wurde später von E. Fischer und Mitarbb. durch Anwendung von reiner krist. Acetochlorglucose¹²⁾ und Variation des Lösungsmittels¹³⁾ verbessert. C. Mannich¹⁴⁾ setzte Acetobromglucose mit Natriumhydroxyd und Phenolen in homogener acetonischer Lösung um. Die nach den genannten Verfahren erhaltenen Phenylglykoside gehören sämtlich der β -Reihe an. Ersetzt man Alkali durch Chinolin, so entstehen nach E. Fischer und L. von Mechel¹⁵⁾ α - und β -Phenylglykoside nebeneinander, bei Anwendung von Chinolin und Silberoxyd¹⁶⁾ oder auch Silbercarbonat in Benzol¹⁷⁾ werden jedoch wiederum nur die β -Glykoside erhalten.

Ein andersartiger Katalysator wurde von G. Zemplén und Z. S. Nady¹⁸⁾ gefunden, indem sie zur Kondensation von Acetobromcellobiose mit Phenol in benzolischer Lösung Quecksilberacetat verwendeten, wobei sie überwiegend Phenyl- α -acetocellobiosid erhielten. Kürzlich haben B. Helferich und K.-H. Jung⁹⁾ α -Phenylglykoside aus den Acetobrom-zuckern mit Phenol bei Gegenwart von Quecksilbercyanid dargestellt.

Ein Verfahren zur Herstellung von α - und β -Phenylglykosiden beschrieben B. Helferich und E. Schmitz-Hillebrecht¹⁹⁾. Es besteht in der Umsetzung des vollacetylierten Zuckers mit dem betreffenden Phenol bei erhöhter Temperatur (in der Schmelze) unter Zusatz eines Katalysators. Bei Anwendung von *p*-Toluolsulfonsäure wird vorwiegend die β -Form, mit Zinkchlorid dagegen überwiegend die α -Form erhalten. K. Sisido²⁰⁾ erhöhte die Ausbeute an Phenylglykosid durch kontinuierliche Entfernung der bei der Reaktion entstehenden Essigsäure im Vakuum. Weitere Verbesserungen haben E. M. Montgomery, N. K. Richtmyer und C. S. Hudson^{21a)} sowie B. Lindberg^{21b)} angegeben.

Eine weitere Synthese von Phenylglykosiden fanden kürzlich K. W. Rosenmund und E. Güssow²²⁾. Sie setzten die vollacetylierten Zucker mit Aluminiumphenolaten um und erhielten hohe Ausbeuten (bis zu 75–80%) an β -Glykosiden.

Bezüglich der Zuordnung der spezifischen Drehungswerte sei daran erinnert, daß nach C. S. Hudson²³⁾ die α -L-Glykoside ($[\alpha] = -x^\circ$) das Spiegelbild der α -D-Glykoside sind ($[\alpha] = +x^\circ$), und ebenso sind die β -L-Glykoside ($[\alpha] = +y^\circ$) das Spiegelbild der β -D-Glykoside ($[\alpha] = -y^\circ$)²⁴⁾.

Wie schon erwähnt, haben wir versucht, *p*-Aminophenyl-*N*-acetyl- α -D-glucosaminid darzustellen, nachdem es früher schon gelungen war, die entsprechende β -Verbindung zu erhalten¹⁾. Zu diesem Zweck setzten wir α -Pentaacetyl-D-glucosamin²⁵⁾ mit *p*-Nitrophenol und Zinkchlorid als Katalysator um, welches nach Helferich und Schmitz-Hillebrecht¹⁹⁾ überwiegend zu phenylierten α -Glykosiden führt. Wir konnten jedoch nur die schon bekannte β -Form isolieren.

¹¹⁾ Ber. dtsh. chem. Ges. 12, 2260 [1879]; J. Amer. chem. Soc. 1, 306 [1879]; 5, 171 [1884].

¹²⁾ E. Fischer u. E. F. Armstrong, Ber. dtsh. chem. Ges. 34, 2885 [1901].

¹³⁾ E. Fischer u. K. Raske, Ber. dtsh. chem. Ges. 42, 1465 [1909].

¹⁴⁾ Liebigs Ann. Chem. 394, 225 [1912]. ¹⁵⁾ Ber. dtsh. chem. Ges. 49, 2814 [1916].

¹⁶⁾ M. Takahashi, J. pharmac. Soc. Japan 525, 969 [1925]; G. Zemplén u. A. Müller, Ber. dtsh. chem. Ges. 62, 2107 [1929]; A. Robertson u. R. B. Waters, J. chem. Soc. [London] 1930, 2729.

¹⁷⁾ N. M. Carter, Ber. dtsh. chem. Ges. 63, 586 [1930].

¹⁸⁾ Ber. dtsh. chem. Ges. 63, 368 [1930]. ¹⁹⁾ Ber. dtsh. chem. Ges. 66, 378 [1933].

²⁰⁾ J. Chem. Ind. Japan 39, Suppl.-Bd. 217 [1936]; C. A. 30, 7118 [1936].

²¹⁾ a) J. Amer. chem. Soc. 64, 690 [1942]; b) Acta chem. scand. 4, 49 [1950].

²²⁾ Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 287/59, 38 [1954].

²³⁾ J. Amer. chem. Soc. 81, 66 [1909]; Advances Carbohydrate Chem. 3, 15 [1948].

²⁴⁾ R. Kuhn, H. H. Baer u. A. Gauhe, Chem. Ber. 88, 1135 [1955].

²⁵⁾ O. Westphal u. H. Holzmann, Ber. dtsh. chem. Ges. 75, 1281 [1942].

Zur Darstellung der *p*-Nitrophenyl- α -glykoside von L-Fucose, L-Rhamnose und D-Mannose haben wir zunächst kristallisierte Tetraacetyl-L-fucose, die bisher nicht bekannt war, sowie (ölige) Tetraacetyl-L-rhamnose²⁶⁾ und Pentaacetyl-D-mannose hergestellt. Die acetylierten Zucker wurden dann in Anlehnung an das Verfahren von Helferich und Schmitz-Hillebrecht¹⁹⁾ bei 115–125° in der Schmelze mit überschüssigem Nitrophenol und Zinkchlorid als Katalysator umgesetzt, wobei wir die jeweiligen acetylierten *p*-Nitrophenyl- α -glykoside erhielten. Diese konnten wir in bekannter Weise¹⁾ mit Natriummethylat in absol. Methanol²⁷⁾ entacetylieren und die so erhaltenen *p*-Nitrophenyl- α -glykoside zu den *p*-Aminoverbindungen mit Pd/BaSO₄ hydrieren.

Tafel 1. Schmelzpunkte und spezif. Drehwerte der dargestellten Zucker-derivate

Zucker		Acetyl-	<i>p</i> -Nitro-phenyl-acetyl- α -	<i>p</i> -Nitro-phenyl- α -	<i>p</i> -Amino-phenyl- α -
L-Fucose	Schmp. $[\alpha]_D^{20}$ *	174° –39° (C)	169–170° –222° (C)	197° –	175° –204° (Me)
L-Rhamnose	Schmp. $[\alpha]_D^{20}$ *	ölig	145° –117° (C)	179° –144° (Me)	166–167° –
D-Mannose	Schmp. $[\alpha]_D^{20}$ *	ölig	156–157° +103° (C)	182° +161° (Me)	164° +128° (Me)
D-Galaktose	Schmp. $[\alpha]_D^{20}$ *	141° a) +25.6° (C)	133° b) +208° (C)	169° c) +225° (W)	178° +224° (Me)

a) E. Erwig u. W. Koenigs²⁸⁾ fanden Schmp. 142°; E. Fischer u. E. F. Armstrong²⁹⁾: $[\alpha]_D^{20}$: + 7.48° (in Benzol).

b) B. Helferich u. K.-H. Jung³⁾: Schmp. 129–130°, jedoch $[\alpha]_D^{20}$: + 275° (in Chlf.).
c) Dieselben l. o.³⁾: Schmp. 82–84°; $[\alpha]_D^{20}$: + 305.5° (in Wasser). Bei erneuter Prüfung des Präparates fanden sie zwei Schmp.: 82–84° und 169°, und $[\alpha]_D^{20}$: + 228.3° und 229° (in Wasser) (B. Helferich, Privatmittel.). Das erste Schmelzen bei 82–84° konnten wir weder an unserem noch an einer freundlicherweise überlassenen Probe von Helferichs Präparat feststellen.

*) C = Chloroform, Me = Methanol, W = Wasser.

Die *p*-Aminophenyl- α -glykoside wurden diazotiert und in schwach alkalischer Lösung an verschiedene antigene Proteine gekuppelt. Die roten Lösungen der Zucker-phenylazo-proteine wurden dialysiert, i. Vak. konzentriert und die künstlichen Azoantigene durch Lyophil Trocknung isoliert. Wir erhielten so die L-Fucose-, L-Rhamnose-, D-Galaktose- und D-Mannose-phenylazo-proteine als orangefarbene, wasserlösliche, leichte Pulver.

Kaninchen wurden mit den Zucker-Antigenen immunisiert. Die erhaltenen Antiseren zeigten spezifische Präcipitationstiter bis 1:500000. Über die

²⁶⁾ Rayman, Bull. Soc. chim. France [2], 47, 673 (Zit. Beilstein II, 158).

²⁷⁾ G. Zemplén u. E. Pacsu, Ber. dtsh. chem. Ges. 62, 1613 [1929].

²⁸⁾ Ber. dtsh. chem. Ges. 22, 2207 [1889].

²⁹⁾ E. Fischer u. E. F. Armstrong, Ber. dtsh. chem. Ges. 35, 838 [1902].

Immunisierungen und die immunologische Prüfung der Antisera berichten wir, gemeinsam mit M. Krüpe³⁰⁾, a. a. O.

Herrn Prof. Dr. H. Sarre, Direktor der Med. Universitäts-Poliklinik, Freiburg i. Br., danken wir für die zeitweilige Überlassung eines Laboratoriums-Raumes der Poliklinik an den einen von uns (H. F.), Herrn Dr. H. Lehner, Analytisches Laboratorium der Dr. A. Wander A.G., Bern/Schweiz, für die Ausführung der Mikroanalysen. Dem Fonds der Chemie schulden wir besonderen Dank für die Gewährung eines Stipendiums (an H. F.).

Beschreibung der Versuche

1. L-Fucosido

Tetraacetyl-L-fucose: 10 g wasserfreie L-Fucose werden mit 5 g frisch entwässertem Natriumacetat und 90 ccm reinem Acetanhydrid in einem 500-ccm-Erlenmeyerkolben unter häufigem Umschütteln auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Nach $\frac{1}{2}$ Stde. tritt klare Lösung ein. Man beläßt noch 1 Stde. auf dem Wasserbad und gießt die Lösung nach dem Abkühlen in dünnem Strahl unter Rühren in $\frac{1}{4}$ l Eiswasser. Nach 3 Stdn. wird die wäßrige Lösung mit Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroformauszüge trocknet man mit Calciumchlorid und dampft i. Vak. ab. Der zurückbleibende Sirup wird einige Tage im Vak.-Exsiccator über Calciumchlorid aufbewahrt, dann in 15 ccm Isopropylalkohol heiß gelöst und die Lösung in den Eisschrank gestellt. Nach mehreren Tagen hat sich Tetraacetyl-L-fucose in weißen Nadeln abgeschieden. Aus wenig absol. Äthanol umkristallisiert, feine, weiße Nadeln vom Schmp. 172° (korr.). Ausb. 11.8 g (58% d.Th.); $[\alpha]_D^{25}$: -39° (Chlf.).

p-Nitrophenyl-triacetyl- α -L-fucosid: 11 g wasserfreie Tetraacetyl-L-fucose werden mit 14 g p-Nitrophenol (dreifache Menge) in einem Rundkolben auf 120° erwärmt (Ölbad). Der Ansatz wird i. Wasserstrahlvak. solange auf 120° gehalten, bis keine Gasbläschen mehr entweichen. Dann gibt man 5 g frisch entwässertes und fein gepulvertes Zinkchlorid hinzu und hält weiter i. Vak. auf 115–125°. Sofort setzt kräftige Gasentwicklung ein (Essigsäure-Bildung); sobald diese nachläßt, rührt man mit einem Glasstab gut durch und evakuiert wieder. Nach etwa 1 Stde. wird die nunmehr tiefdunkle Schmelze auf etwa 50° abgekühlt und in 200 ccm Chloroform aufgenommen. Man schüttelt solange mit π NaOH aus, bis kein Nitrophenolat mehr erscheint (Farbe). Dann wird zweimal mit Wasser gewaschen, mit Calciumchlorid getrocknet und i. Vak. eingedampft. Der zurückbleibende Sirup wird unter Rückflußkühlung in 30 ccm Methanol aufgenommen und die methanol. Lösung nach Zusatz von Kohle heiß filtriert. Im Eisschrank kristallisiert das Fucosid innerhalb von 1–2 Tagen aus. Es wird aus wenig Methanol umkristallisiert: weiße Spieße vom Schmp. 178°, Ausb. 5.2 g (42.6% d.Th.); $[\alpha]_D^{25}$: -222° (Chlf.).

$C_{18}H_{21}O_{10}N$ (411.4) Ber. C 52.55 H 5.15 N 3.41 Gef. C 52.53 H 5.14 N 3.39

p-Nitrophenyl- α -L-fucosid: 1.7 g p-Nitrophenyl-triacetyl- α -L-fucosid werden in 30 ccm trockenem Methanol gelöst. Nach Zugabe von 3 ccm n_{10} Natriummethylat wird $\frac{1}{4}$ Stde. am Rückflußkühler erhitzt. Danach dampft man i. Vak. ab und nimmt den Rückstand in wenig (5 ccm) heißem Äthanol auf. In der Kälte kristallisiert das entacetylierte Fucosid in derben Rhomben vom Schmp. 196–197°. Ausb. 0.6 g (51% d.Th.).

$C_{18}H_{19}O_7N$ (285.3) Ber. C 50.52 H 5.30 N 4.91 Gef. C 50.81 H 5.60 N 4.91

p-Aminophenyl- α -L-fucosid: 0.6 g p-Nitrophenyl- α -L-fucosid werden in 25 ccm Methanol fein suspendiert, wobei nur ein Teil in Lösung geht. Es wird mit 0.4 g 10-proz. Pd/BaSO₄ bei Atmosphärendruck hydriert. Nach etwa 100 Min. ist alles Fucosid in Lösung gegangen und die theoret. Menge Wasserstoff aufgenommen, worauf die Reaktion zum Stillstand kommt. Es wird vom Katalysator abfiltriert, i. Vak. zur Trockne verdampft und der Rückstand in 6 ccm heißem Äthanol aufgenommen. Nach Zusatz von wenig Petroläther in der Kälte kristallisieren 0.34 g p-Aminophenyl- α -L-fucosid in feinen weißen Nadelchen vom Schmp. 175° (63% d.Th.). $[\alpha]_D^{25}$: -204° (Methanol).

$C_{18}H_{17}O_5N$ (255.3) Ber. C 56.46 H 6.71 N 5.49 Gef. C 56.47 H 6.90 N 5.47

³⁰⁾ M. Krüpe, H. Feier u. O. Westphal, in Vorbereitung.

2. L-Rhamnoside

Tetraacetyl-L-rhamnose²⁸): Aus 10 g wasserfreier L-Rhamnose, 5 g frisch entwässertem Natriumacetat und 90 ccm Acetanhydrid wurden nach der für L-Fucose angegebenen Arbeitsweise 10.8 g (53%) Tetraacetyl-L-rhamnose als nicht kristallisierender, glasklarer und farbloser Sirup erhalten, der als solcher weiter verarbeitet wurde.

p-Nitrophenyl-triacetyl- α -L-rhamnosid: 10 g Tetraacetyl-L-rhamnose werden mit 14 g *p*-Nitrophenol bei 120° i. Wasserstrahlvak. zusammengeschmolzen und anschließend, wie bei Fucose, 5 g feingepulvertes und entwässertes Zinkchlorid hinzugegeben. Beim erneuten Evakuieren setzt sogleich stürmische Gasentwicklung ein. Die Aufarbeitung nach 1stdg. Erhitzen des Ansatzes auf 115–125° i. Wasserstrahlvak. erfolgt wie bei L-Fucose, durch Aufnehmen in Chloroform, Ausschütteln des überschüssigen Nitrophenols mit *n* NaOH, Waschen mit Wasser und Abdampfen der dunklen Chloroformlösung. Der Rückstand wird unter Rückflußkühlung in wenig Methanol aufgenommen und die methanol. Lösung nach Zusatz von Tierkohle filtriert. Im Eisschrank kristallisiert das Rhamnosid innerhalb einiger Tage in schwach gelben, derben Rhomben aus. Es wird nochmals aus wenig heißem Methanol umkristallisiert. Schmp. 145°, Ausb. 4.7 g (38% d. Th.). $[\alpha]_D^{25}$: –117° (Chlf.).

$C_{18}H_{21}O_{10}N$ (411.4) Ber. C 52.55 H 5.15 N 3.41 Gef. C 53.06 H 5.16 N 3.29

p-Nitrophenyl- α -L-rhamnosid: 2.0 g des acetylierten Rhamnosids werden in 50 ccm trockenem Methanol gelöst und nach Zugabe von 3 ccm *n*/₁₀ Natriummethylat $\frac{1}{4}$ Stde. am Rückflußkühler erhitzt. Nach dem Abdampfen i. Vak. wird der Rückstand in wenig heißem Äthanol aufgenommen. Beim Erkalten kristallisiert *p*-Nitrophenyl- α -L-rhamnosid aus. Es wird nochmals aus Äthanol umkristallisiert: weiße Spieße vom Schmp. 179°, Ausb. 0.55 g (40% d. Th.). $[\alpha]_D^{25}$: –144° (Methanol).

$C_{12}H_{15}O_7N$ (285.3) Ber. C 50.52 H 5.30 N 4.91 Gef. C 50.95 H 5.51 N 4.94

p-Aminophenyl- α -L-rhamnosid: 0.5 g *p*-Nitrophenyl- α -L-rhamnosid werden in ca. 20 ccm Methanol suspendiert und mit 0.3 g 10-proz. Pd/BaSO₄, wie bei Fucose beschrieben, hydriert. Das Reaktionsprodukt wird nach dem Abdampfen des Methanols aus wenig heißem Äthanol unter Zusatz von wenig Petroläther umkristallisiert. Man erhält das *p*-Aminophenyl- α -L-rhamnosid in schwach gelben Nadelchen vom Schmp. 166–167°, welche an der Luft ein wenig hygroskopisch sind. Ausb. 0.33 g (70% d. Th.).

$C_{15}H_{17}O_6N$ (255.3) Ber. C 56.46 H 6.71 N 5.49 Gef. C 56.69 H 6.74 N 5.39

3. D-Mannoside

Pentaacetyl-D-mannose: Aus 10 g D-Mannose, 5 g frisch entwässertem Natriumacetat und 90 ccm Acetanhydrid erhielten wir nach Aufarbeitung, wie bei Fucose beschrieben, 14 g (66% d. Th.) D-Mannose-pentaacetat als farblosen, klaren, nicht kristallisierenden Sirup, der als solcher weiter verarbeitet wurde.

p-Nitrophenyl-tetraacetyl- α -D-mannosid: 10 g Pentaacetyl-D-mannose werden mit 12 g *p*-Nitrophenol bei 120° zusammengeschmolzen und anschließend bei Gegenwart von 5 g frisch entwässertem und fein gepulvertem Zinkchlorid 1 Stde. lang i. Wasserstrahlvak. bei 115–125° gehalten. Nach Abkühlen auf ca. 50° wird die tiefdunkle Masse, wie bei Fucose angegeben, mit Chloroform durchgearbeitet und filtriert; nach Trocknen mit Calciumchlorid wird i. Vak. abgedampft, der Rückstand in 20 ccm heißem Äthanol mit etwas Tierkohle behandelt und heiß filtriert. Im Eisschrank kristallisieren 8.2 g (67% d. Th.) zu großen Aggregaten zusammengewachsene Balken aus. Nach nochmaligem Umkristallisieren aus Äthanol Schmp. 156–157°. $[\alpha]_D^{25}$: +103° (Chlf.).

$C_{20}H_{23}O_{12}N$ (469.4) Ber. C 51.17 H 4.94 N 2.99 Gef. C 51.27 H 5.08 N 3.05

p-Nitrophenyl- α -D-mannosid: 5.0 g des acetylierten Nitrophenylmannosids werden in 100 ccm trockenem Methanol gelöst, 5 ccm *n*/₁₀ Natriummethylat hinzugefügt und der Ansatz $\frac{1}{4}$ Stde. unter Rückfluß erhitzt. Danach wird zur Trockne eingedampft und der Rückstand in der eben ausreichenden Menge siedendem Methanol/Äthanol (1:1) aufgenommen. In der Kälte kristallisieren 2.8 g weiße, große Spieße vom Schmp. 181° aus (87% d. Th.). $[\alpha]_D^{25}$: +161° (Methanol).

$C_{12}H_{15}O_6N$ (301.3) Ber. C 47.84 H 5.02 N 4.65 Gef. C 47.31 H 5.31 N 4.83

p-Aminophenyl- α -D-mannosid: 1.8 g *p*-Nitrophenyl- α -D-mannosid werden in 15 ccm Methanol fein suspendiert und mit 0.8 g 10-proz. Pd/BaSO₄ bei Atmosphärendruck hydriert. Innerhalb von 85 Min. ist die Reaktion beendet. Nach Abfiltration des Katalysators wird i. Vak. zur Trockne verdampft und der Rückstand in der eben ausreichenden Menge heißem Äthanol aufgenommen. In der Kälte kristallisiert das *p*-Aminophenyl- α -D-mannosid in kleinen Nadeln vom Schmp. 164° aus. Ausb. 1.12 g (69% d.Th.). $[\alpha]_D^{20}$: +128° (Methanol).

C₁₂H₁₇O₆N (271.3) Ber. C 53.13 H 6.32 N 5.16 Gef. C 53.28 H 6.56 N 5.39

4. D-Galaktoside

Pentaacetyl-D-galaktose²⁷⁾ wurde in *p*-Nitrophenyl-tetraacetyl- α -D-galaktosid übergeführt^{19, 21)} und dieses nach Helferich und Jung⁸⁾ entacetyliert.

p-Aminophenyl- α -D-galaktosid: 0.6 g *p*-Nitrophenyl- α -D-galaktosid werden in 25 ccm Methanol mit 0.4 g 10-proz. Pd/BaSO₄ bei Normaldruck hydriert. Nach 1½ Stdn. ist die theoret. Menge Wasserstoff aufgenommen. Es wird heiß vom Katalysator abfiltriert, die Lösung i. Vak. zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 8 ccm heißem Äthanol aufgenommen. In der Kälte kristallisiert das *p*-Aminophenyl- α -D-galaktosid aus. Es wird aus wenig Äthanol umkristallisiert: weiße Nadeln vom Schmp. 178°, Ausb. 0.42 g (78% d.Th.). $[\alpha]_D^{20}$: +224° (Methanol).

C₁₂H₁₇O₆N (271.3) Ber. C 53.13 H 6.32 N 5.16 Gef. C 52.90 H 6.05 N 5.03

5. Darstellung der Zucker-phenylazo-proteine (vergl. l.c.¹⁾)

Nachstehend geben wir als Beispiel einer Diazotierung und Kupplung die Überführung von *p*-Aminophenyl- α -L-fucosid und Pferdeserumalbumin in das L-Fucose-phenylazo-Pferdeserumalbumin. Die Darstellung anderer Fucose-phenylazo-proteine erfolgte in gleicher Weise, ebenso die Herstellung der Antigene mit den *p*-Aminophenol-glykosiden von L-Rhamnose, D-Galaktose und D-Mannose.

Zu 150 mg *p*-Aminophenyl- α -L-fucosid in 5.2 ccm Wasser fügten wir 1.1 ccm *n* HCl, kühlten auf 1–2° und fügten die eiskalte Lösung von 40 mg Natriumnitrit in 1.6 ccm Wasser hinzu. Zu 1 g krist. Pferdeserumalbumin in 50 ccm kalter *n*/₂₅ NaOH ließen wir bei 1–2° die Fucose-phenyl-diazoniumsalz-Lösung unter gutem Umschütteln einfließen. Die tiefrot gefärbte Lösung blieb einige Stunden bei 1–2° stehen; dann wurde mit *n* HCl auf *p*_H 7–7.5 gebracht, mehrere Tage gogen dest. Wasser dialysiert, dann mit Eis-Kochsalzmischung eingefroren und i. Hochvak. lyophil getrocknet. Man erhielt auf diese Weise das Fucose-phenylazo-Antigen in Form eines rosa bis orangerot gefärbten, leichten Pulvers, welches 9–10% Fucose, an Protein gebunden, enthält. Dieses Fucose-Antigen diente, wie auch die weiteren nach gleichem Verfahren hergestellten Antigene von L-Rhamnose, D-Galaktose und D-Mannose, zur Immunisierung von Kaninchen und Gewinnung der entsprechenden Immunsereen.

© 1956 by Verlag Chemie, GmbH.

Verantwortlich für den Inhalt: Prof. Dr. Rudolf Criegee, Karlsruhe. Redaktion: Dr. Wilhelm Merz, Tübingen. Verantwortlich für den Anzeigenteil: W. Thiel, Verlag Chemie, GmbH. (Geschäftsführer Eduard Kreuzhage) Weinheim/Bergstr.; Druck: Druckerei Winter, Heidelberg.

Printed in Germany. Alle Rechte vorbehalten, insbesondere die der Übersetzung. Kein Teil dieser Zeitschrift darf in irgendeiner Form — durch Photokopie, Mikrofilm oder irgendein anderes Verfahren — ohne schriftliche Genehmigung des Verlages reproduziert werden. — All rights reserved (including those of translations into foreign languages). No part of this issue may be reproduced in any form, by photoprint, microfilm, or any other means, without written permission from the publishers. — Preis jährlich DM 100.—; Einzelheft DM 8.50. Abbestellungen nur bis spätestens 6 Wochen vor Ablauf eines Halbjahres. Gerichtsstand und Erfüllungsort Weinheim/Bergstr. Lieferung erfolgt auf Rechnung und Gefahr des Empfängers.