

*N*-Benzyl-imidazol: 1.277 g Natriumdraht wurden in 80 ccm wasserfreies Tetrahydrofuran gepreßt und durch Zugabe von 13.2 g Imidazol unter Ausschluß von Luftfeuchtigkeit und schwacher Erwärmung in Lösung gebracht. Man gab 4.8 ccm (46 mMol) Benzylalkohol hinzu und ließ dann bei Raumtemperatur unter Rühren mittels eines Magnetrührers innerhalb von 20 Min. die Lösung von 9.60 g (46 mMol) Benzolsulfonsäure-imidazolid in 60 ccm wasserfreiem Tetrahydrofuran zutropfen. Dabei bildete sich innerhalb weniger Minuten unter positiver Wärmetönung ein feinkristalliner Niederschlag von benzolsulfonsaurem Natrium. Man ließ noch 1 Stde. bei Raumtemperatur rühren und saugte dann den Niederschlag ab, den man noch einige Male mit Tetrahydrofuran auswusch. Das Filtrat wurde i. Vak. eingeeengt; der Rückstand wurde mit Wasser versetzt und mit Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroform-Lösung wurde mit kaltem Wasser bis zur neutralen Reaktion gewaschen und mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Abdampfen des Lösungsmittels wurden 6.55 g (90% d. Th.) *N*-Benzyl-imidazol vom Schmp. 70.5–72.5° erhalten. Der Misch-Schmp. mit einem nach O. WALLACH<sup>10)</sup> aus Benzylchlorid und Imidazol (in schlechter Ausbeute) erhaltenen Vergleichspräparat ergab keine Depression.

<sup>10)</sup> Ber. dtsch. chem. Ges. 16, 539 [1883].

## RUDOLF LAMBERT und FRIEDRICH ZILLIKEN

### Synthese von 3-*O*-Äthyl- und 3-*O*-[ $\alpha$ -Carboxy-äthyl]- D-glucosaminen

Aus dem Department of Biochemistry, School of Medicine, University Pennsylvania, Philadelphia und dem Biochemischen Laboratorium der R. K. Universiteit, Nijmegen

(Eingegangen am 6. Juli 1960)

*Herrn Professor Richard Kuhn zu seinem 60. Geburtstag gewidmet*

Krist.  $\beta$ -Äthyl- sowie  $\alpha$ -Methyl-*N*-acetyl-D-glucosaminid (I) wurden in ihre krist. 4.6-Benzylidenderivate verwandelt (II) und mittels  $\alpha$ -Brom-propionsäure-äthylesters in die diastereoisomere Mischung der Äthylester der 3-*O*-[ $\alpha$ -DL-Carboxy-äthyl]-4.6-benzyliden-*N*-acetyl-D-glucosaminide übergeführt (III + IV). Nach Verseifen des Esters und Entfernung der Benzylidengruppe lassen sich dieselben mit Hilfe von Ionenaustauschern leicht in ihre Diastereoisomeren auftrennen (V + VI). Aus der D-Reihe erhielten wir  $\beta$ -Äthyl-3-*O*-[ $\alpha$ -D-carboxy-äthyl]-4.6-benzyliden-*N*-acetyl-D-glucosaminid (VIIa) und daraus nach saurer Hydrolyse das 3-*O*-[ $\alpha$ -D-Carboxy-äthyl]-D-glucosamin (VIII) — die Muraminsäure — in krist. Form. Aus der unbeständigeren L-Serie faßten wir  $\alpha$ -Methyl-3-*O*-[ $\alpha$ -L-carboxy-äthyl]-*N*-acetyl-D-glucosaminid (VIb) sowie das krist. Lacton dieser Säure (XII). Ebenfalls beschreiben wir einige neue krist. Derivate des 3-*O*-Äthyl-D-glucosamins (IX–XI).

Der von PAUL GYÖRGY entdeckte<sup>1)</sup> und in einer Reihe klassischer Monographien näher beschriebene *Lactobacillus bifidus* var. *pennsylvanicus*<sup>2)</sup> besitzt ein absolutes

<sup>1)</sup> P. GYÖRGY, R. F. NORRIS und C. S. ROSE, Arch. Biochem. Biophysics 48, 193 [1954].

<sup>2)</sup> P. GYÖRGY, Pediatrics 11, 98 [1953]; P. GYÖRGY und C. S. ROSE, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 90, 219 [1955].

Wachstoffsbedarf für *N*-Acetyl-D-glucosamin sowie dessen N-haltige biosynthetische Vorstufen wie  $\text{NH}_4^+$  oder Glutamin. Einen viel größeren Wuchseffekt zeigen jedoch die  $\beta$ -Glykoside dieses D-Aminozuckers<sup>3)</sup> sowie das *N*-Acetyl-lactosamin<sup>4)</sup> und eine Vielzahl von N-haltigen Oligosacchariden der Frauenmilch<sup>5)</sup>, in denen das *N*-Acetyl-D-glucosamin ebenfalls in  $\beta$ -glykosidischer Verknüpfung vorliegt.  $\alpha$ -Glykoside dieses D-Aminozuckers besitzen keinerlei Wuchseffekt für diesen Mikroorganismus. Ebenso unwirksam sind *N*-Acetyl-L-glucosamin, *N*-Acetyl-D-galaktosamin und *N*-Acetyl-D-mannosamin<sup>6)</sup>.

Drückt man dieses Wuchstoffsbedarf in  $\gamma$  N pro Wuchseinheit aus, so ergibt man aus der Tabelle eine stetige Abnahme, die beim *N*-Acetyl-D-lactosamin nur  $1/1000$  von dem des  $\text{NH}_4\text{Cl}$  beträgt.

Beziehung zwischen  $\gamma$  N pro Wuchseinheit ( $\approx 50\%$  optimales Wachstum, 10 ccm Kultur) und verschiedenen Wuchsstoffen für *Lactobacillus bifidus* var. *pennsylvanicus*

Wuchsstoff	$\text{NH}_4\text{Cl}$	Glutamin	D-Glucosamin-HCl	<i>N</i> -Acetyl-D-glucosamin	$\beta$ -Äthyl- <i>N</i> -acetyl-D-glucosaminid	<i>N</i> -Acetyl-lactosamin
N/Einheit	2000	1500	400	140	7	2

Diese Tatsache stimmt mit dem Biosyntheseweg von Derivaten des *N*-Acetyl-D-glucosamins ausgezeichnet überein<sup>7)</sup>.

Die Mutante eröffnet daher gute Möglichkeiten für die Reindarstellung von Enzymen, die bei der Biosynthese von neuen Derivaten des *N*-Acetyl-D-glucosamins von Bedeutung sind. Über einige von diesen haben wir bereits jüngst berichtet<sup>8)</sup>.

Wie wir kürzlich zeigen konnten<sup>9)</sup>, wird aus  $[1-^{14}\text{C}]$ -markiertem  $\alpha$ - $\beta$ -Methyl-*N*-acetyl-D-glucosaminid die  $\beta$ -Komponente nahezu 100-proz. in die Zellwand des Bakteriums eingebaut, während die  $\alpha$ -Komponente unverändert im Medium verbleibt. Eine Analyse der Zellwände von *L. bifidus* var. *pennsylvanicus* ergab, daß neben radioaktivem *N*-Acetyl-D-glucosamin mehr als 60% des inkorporierten  $\beta$ -Methyl-*N*-acetyl-D-glucosaminids in  $[1-^{14}\text{C}]$ -markierte Muraminsäure übergeführt worden war. Muraminsäure, die ein wesentlicher und spezifischer Baustein aller bisher untersuchten Zellwände Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien darstellt<sup>10)</sup>, ist zuerst von STRANGE<sup>11)</sup> im Jahre 1954 aus 6 *n* mineral-sauren Hydrolysaten von Sporenpeptiden

<sup>3)</sup> F. ZILLIKEN, C. S. ROSE, G. A. BRAUN und P. GYÖRGY, Arch. Biochem. Biophysics **54**, 392 [1955].

<sup>4)</sup> R. M. TOMARELLI, J. B. HASSINEN und F. W. BERNHARDT, Arch. Biochem. Biophysics **48**, 225 [1954].

<sup>5)</sup> A. GAUHE, P. GYÖRGY, J. R. E. HOOVER, R. KUHN, C. S. ROSE, H. W. RUELIUS und F. ZILLIKEN, Arch. Biochem. Biophysics **48**, 214 [1955].

<sup>6)</sup> C. S. ROSE und F. ZILLIKEN, unveröffentlicht.

<sup>7)</sup> L. F. LELOIR, 3. Konferenz der Josiah Macy-Jr. Foundation New York über „Polysaccharides in Biology“, pp. 155 [1957].

<sup>8)</sup> P. J. O'BRIEN, M. C. GLICK und F. ZILLIKEN, Federation Proc. **19**, 85 [1960].

<sup>9)</sup> P. J. O'BRIEN, M. C. GLICK und F. ZILLIKEN, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **37**, 357 [1960].

<sup>10)</sup> C. S. CUMMINS und H. HARRIS, J. gen. Microbiol. **14**, 583 [1956].

<sup>11)</sup> R. E. STRANGE und J. F. POWELL, Biochem. J. **58**, 80 [1954].

in Form ihres Zwitterions kristallisiert erhalten worden. Die gleichen Autoren erkannten sie als ein 3-*O*-Carboxyäthyl-hexosamin<sup>12)</sup>.

Im Jahre 1959 haben STRANGE<sup>13)</sup> und wir<sup>14)</sup> über die Synthese von 3-*O*-[ $\alpha$ -Carboxy-äthyl]-D-glucosaminen und deren Trennung in ihre Diastereoisomeren kurz berichtet. Die englischen Autoren gelangten auf Grund der spezifischen Drehung und der  $R_F$ -Werte zur Auffassung, daß die natürlich vorkommende Muraminsäure mit 3-*O*-[ $\alpha$ -D-Carboxy-äthyl]-D-glucosamin identisch sei. Die spezif. Drehung wurde für beide Produkte mit  $[\alpha]_D: +109^\circ$  angegeben.

Nachfolgend möchten wir über unsere synthetischen Ergebnisse ausführlich berichten.

Als Ausgangsmaterial für die Synthese dienten reinstes  $\alpha$ -Methyl-<sup>15)</sup> oder  $\beta$ -Äthyl-*N*-acetyl-D-glucosaminid (I)<sup>15)</sup>, die auf übliche Weise in die krist. 4.6-Benzylidenverbindungen übergeführt wurden. Das schön kristallisierende  $\alpha$ -Benzyl-4.6-benzyliden-*N*-carbobenzoxy-D-glucosaminid hielt der Kondensationsreaktion nicht stand und schied daher für die Synthese aus. Wenn man auf wohl definierte Zwischenprodukte verzichtet, mag auch das leichter zugängliche Anomerengemisch des  $\alpha,\beta$ -Methyl-4.6-benzyliden-*N*-acetyl-D-glucosaminids als Ausgangsmaterial dienen. Wir überführten die krist. 4.6-Benzylidenverbindungen des  $\alpha$ -Methyl- sowie des  $\beta$ -Äthyl-*N*-acetyl-D-glucosaminids (II) mittels Natriumhydrids in absol. Dioxan in die entsprechenden Natriumsalze.

Ohne Isolierung letzterer kondensierten wir diese durch 16 stdg. Erhitzen bei  $101^\circ$  unter Ausschluß von Feuchtigkeit mit  $\alpha$ -Brom-propionsäure-äthylester. Die asymmetrische Kondensation lieferte in beiden Fällen in etwa 90-proz. Ausbeute die diastereoisomere Mischung des  $\alpha$ -Methyl- sowie des  $\beta$ -Äthyl-3-*O*-[ $\alpha$ -DL-carboxy-äthyl]-4.6-benzyliden-*N*-acetyl-D-glucosaminid-äthylesters (III + IV).

Da es mittels klassischer Verteilungschromatographie an Kieselsäure oder Aluminiumoxyd nicht gelang, diese Mischung in ihre Diastereoisomeren zu zerlegen, überführten wir das Gemisch der  $\beta$ -Äthylverbindungen IIIa + IVa durch Verseifung mit 0.1 *n* NaOH und anschließendes Kochen mit 60-proz. Essigsäure in  $\beta$ -Äthyl-3-*O*-[ $\alpha$ -DL-carboxy-äthyl]-*N*-acetyl-D-glucosaminid. Dieses ließ sich mittels Chromatographie an Dowex-I in der Formiat-Form und unter Anwendung der Gradienten-Elution mit großer Leichtigkeit in seine D- bzw. L-Komponente auftrennen. Man erhielt zwei wohlgetrennte Maxima, die gemäß papierchromatographischer und elektrophoretischer Analyse einheitliches  $\beta$ -Äthyl-3-*O*-[ $\alpha$ -L- bzw. -D-carboxy-äthyl]-*N*-acetyl-D-glucosaminid (Va bzw. VIa) darstellen. Leider gelang die Kristallisation dieser Verbindungen bisher noch nicht. Neigung zur Gelbildung konnten wir bei anderen Derivaten des  $\beta$ -Äthyl-*N*-acetyl-D-glucosaminids schon früher beobachten.

Die Benzylidierung des amorphen aber chromatographisch homogenen Va lieferte in guter Ausbeute das krist. 4.6-Benzylidenderivat VIIa. Identische Behandlung des entsprechenden Derivates der L-Säure lieferte in nur schlechter Ausbeute ein amorphes 4.6-Benzylidenderivat.

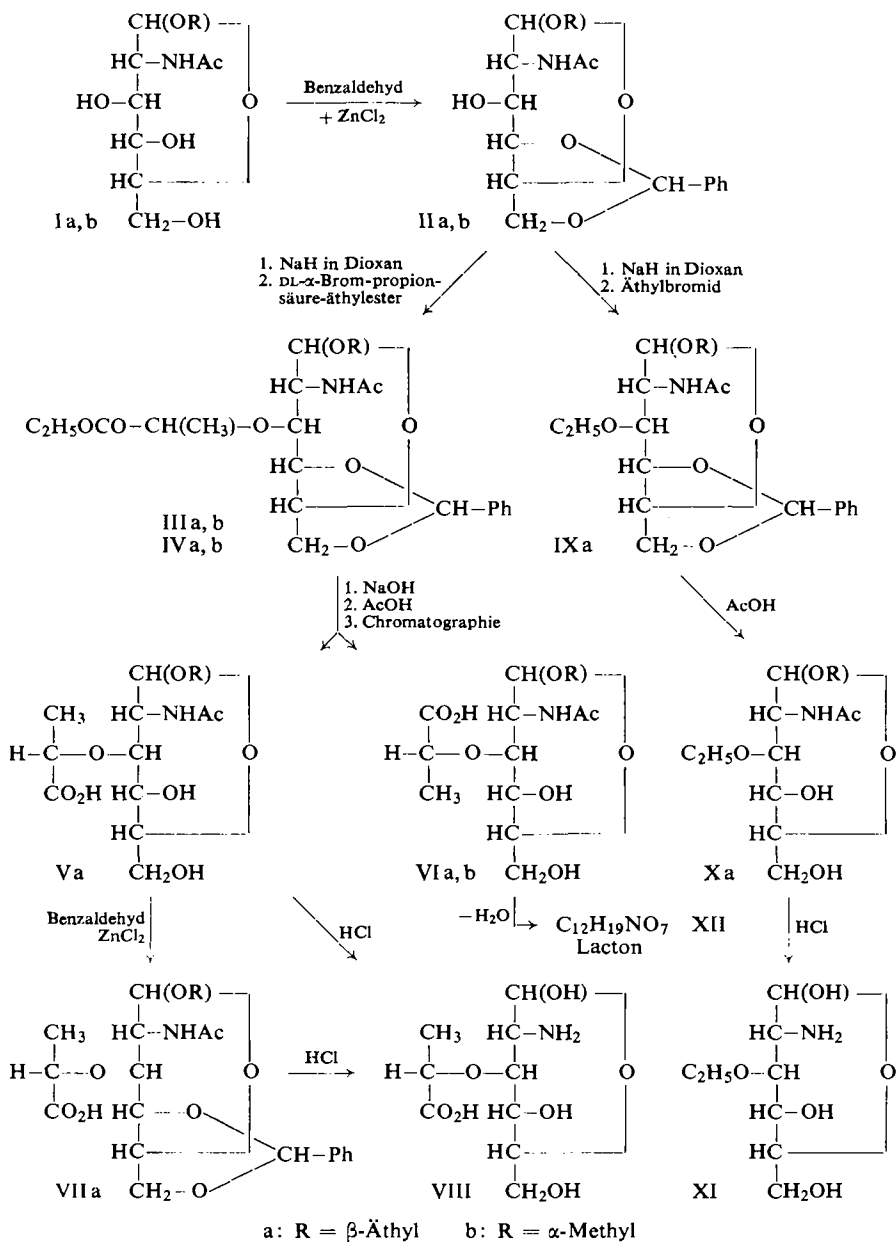
<sup>12)</sup> R. E. STRANGE und F. A. DARK, Nature [London] 177, 186 [1956].

<sup>13)</sup> R. E. STRANGE und L. H. KENT, Biochem. J. 71, 333 [1959].

<sup>14)</sup> F. ZILLIKEN, Federation Proc. 18, 966 [1959].

<sup>15)</sup> R. KUHN, F. ZILLIKEN und A. GAUHE, Chem. Ber. 86, 466 [1953].

Sowohl aus amorphem Va als auch aus seinem krist. 4.6-Benzylidenderivat VIIa erhielten wir nach Hydrolyse mit 2.5 *n* HCl und anschließender Entfernung der bei der



Hydrolyse entstandenen Nebenprodukte mit Austauscherharzen in guter Ausbeute die mit 1 Mol. Kristallwasser kristallisierende *Muraminsäure* (VIII). Identische

Behandlung des entsprechenden Derivates des Diastereoisomeren der L-Reihe führte zu einer chromatographisch einheitlichen, amorphen Substanz, deren Kristallisation bisher nicht gelang.

Zu prächtig kristallisierten Derivaten letzterer Säure gelangt man jedoch bei Verwendung der  $\alpha$ -Methylverbindungen (vgl. Formelübersicht b-Reihe) als Ausgangsmaterial für die Synthese. Setzte man IIb mit  $\alpha$ -Brom-propionsäure-äthylester zum Gemisch IIIb + IVb um, so lieferte bei der anschließenden partiellen Verseifung der alkalilösliche d. h. verseifte Anteil nach Abspaltung der 4.6-Benzylidengruppe und Chromatographie an Dowex I nur ein Maximum. Beim Einengen der vereinigten Lösungen kristallisierte das  *$\alpha$ -Methyl-3-O-[ $\alpha$ -L-carboxy-äthyl]-N-acetyl-D-glucosaminid* (VIb) aus. Beim Erhitzen im Schmelzpunktsröhrchen sublimiert dieses bei etwa 180° vollständig und geht unter Abspaltung von 1 Mol. Wasser in ein Lacton, C<sub>12</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>7</sub>, über (XII). Ob es sich um ein 6- oder 9-Ring-Lacton handelt, konnten wir bisher noch nicht mit Sicherheit entscheiden.

Bei 4 stdg. Hydrolyse der N-Acetyl-muraminsäuren mit 2.5 *n* HCl bei 100° fanden wir immer außer den freien Säuren in kleinen Mengen ein neutrales und mehrere basische Nebenprodukte. Unsere Vermutung<sup>14)</sup>, daß es sich bei einem der letzteren um das Decarboxylierungsprodukt der Muraminsäure, das 3-O-Äthyl-D-glucosamin, handle, konnten wir durch Vergleich mit einem synthetischen Präparat (XI) nicht bestätigen.

Die Synthese dieser noch unbekannten Substanz aus IXa (vgl. Versuchsteil) erschien uns auch im Zusammenhang mit dem Wirkungsmechanismus 3-substituierter Derivate des D-Glucosamins von Interesse, da wir eine mögliche Inhibierung der Muraminsäure-Biosynthese an Hand des Bifidus-Testes verfolgen können.

Den isoelektrischen Punkt des kristallisierten 3-O-[ $\alpha$ -D-Carboxy-äthyl]-D-glucosamins (VIII) haben wir zu  $p_I = 5.8$  und denjenigen der entsprechenden amorphen L-Verbindung zu  $p_I = 5.2$  bestimmt. Wir sind daher der Ansicht, daß die chromatographische Auftrennung der diastereoisomeren N-Acetyl-Verbindungen in die D- und L-Form auf Unterschieden in den  $p_K$ -Werten dieser Säuren beruht. Stärkere Wasserstoffbrücken zwischen dem Carboxyl und der N-Acetyl-Gruppe der D-Verbindung machen diese zu einer schwächeren Säure, aber zu einer kristallisationsfreudigeren Substanz. Zusätzlich läßt die Konstellationsanalyse eine höhere Instabilität der L-Verbindungen („eclipsed form“) gegenüber der D-Verbindung („staggered form“) erwarten. Beides, größere Kristallisationsfreudigkeit sowie relativ höhere Stabilität der Derivate des D-Diastereoisomeren, finden wir in der Tat bei den freien Säuren bestätigt.

Über den absoluten Konstitutionsbeweis aller hier beschriebenen Verbindungen sowie deren Beziehung zur natürlichen Muraminsäure möchten wir in einer folgenden Mitteilung berichten.

Vorliegende Arbeit wurde durch großzügige Unterstützung des NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH in Form eines USPHS E-2604-Grants und eines Senior fellowship Grants USPHS SF-344 ermöglicht.

Herrn Professor E. KLENK, Direktor des Physiologisch-Chemischen Instituts der Universität in Köln, danken wir herzlichst für die Gewährung eines Laboratoriums während unserer Übersiedlung von Philadelphia nach Nijmegen.

## BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

*β*-Äthyl-2-desoxy-2-acetamino-4.6-benzyliden-D-glucopyranosid (IIa): 21.8 g (0.087 Mol) *β*-Äthyl-2-desoxy-2-acetamino-D-glucopyranosid (Ia),  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-40.7^\circ$  ( $c = 1.0$ , in Wasser), werden unter Verwendung von frisch destilliertem Benzaldehyd und wasserfreiem  $\text{ZnCl}_2$  nach A. NEUBERGER<sup>16)</sup> benzylidiert. Nach einmaligem Umkristallisieren aus Methanol erhielten wir 20.5 g (70% d. Th.) farbloser Nadeln vom Schmp.  $289-290^\circ$ . Nach mehrfachem Umkristallisieren aus dem gleichen Lösungsmittel und Trocknen bei  $80^\circ/0.1$  Torr über  $\text{P}_2\text{O}_5$  bis zur Gewichtskonstanz, fanden wir die konstante spezif. Drehung zu  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-95.5^\circ$  ( $c = 0.5$ , in Methanol).

$\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{NO}_6$  (337.4) Ber. C 60.50 H 6.87 N 4.15 Gef. C 59.95 H 6.98 N 4.06

*β*-Äthyl-2-desoxy-2-acetamino-3-O-[ $\alpha$ -carboxy-äthyl]-4.6-benzyliden-D-glucopyranosid-äthylester (IIIa + IVa): Die Suspension von 4.94 g (0.0146 Mol) IIa in 200 ccm sorgfältig getrocknetem Dioxan wird unter Rühren und Ausschluß von Feuchtigkeit zum Sieden erhitzt und anteilweise mit 0.387 g (0.0161 Mol) Natriumhydrid versetzt. Nach Zugabe von etwa der Hälfte des NaH ist das Ausgangsmaterial in Lösung gegangen und die klare Lösung nimmt eine gelblich grüne Färbung an. Nach etwa 3 Stdn. ist die Bildung des Na-Salzes vollständig. Sodann werden 26.5 g (0.146 Mol) frisch destillierter  $\alpha$ -Brom-propionsäure-äthylester auf einmal zugesetzt, wobei Natriumbromid ausfällt. Zur Vervollständigung der Kondensation wird das Gemisch noch weitere 16 Stdn. unter Rühren bei Siedetemperatur des Lösungsmittels ( $101^\circ$ ) gehalten. Daraufhin werden das Dioxan sowie der überschüssige Ester abdestilliert, letzterer unter vermindertem Druck. Der farblose Rückstand wird zur Entfernung letzter Reste des  $\alpha$ -Brom-propionsäure-äthylesters mehrfach mit Petroläther ( $30-60^\circ$ ) im Mörser behandelt. Zur Entfernung des Natriumbromids wird der Rückstand bis zur negativen Reaktion des Waschwassers auf Bromid mit Wasser ausgezogen. Ausb. an Rohprodukt 6.0 g (94% d. Th.).

a) *Partielle Verseifung*: 5.0 g dieses Kondensationsproduktes werden in 200 ccm 0.1 *n* NaOH suspendiert und 1 Stde. auf dem Wasserbad unter Rühren erhitzt. Das Material löst sich während dieser Zeit nahezu vollständig. Die Lösung wird filtriert und unter vermindertem Druck auf 30 ccm eingengt. Sodann wird mit 50 ccm Eisessig versetzt. Dabei fällt sofort ein farbloser gelartiger Niederschlag aus, der nach 10 Min. langem Erhitzen auf dem Wasserbade in Lösung geht. Nach weiteren 20 Min. wird die Lösung i. Vak. zur Trockene gebracht und zweimal mit Wasser versetzt und wiederum i. Vak. eingedampft. Nun wird die Substanz mit 100 ccm Wasser versetzt, worin sich nicht alles löst. Daraufhin wird mehrmals mit Äther extrahiert, wobei der unlösliche Anteil nach und nach verschwindet.

b) *Austauscher-Chromatographie*: Die klare wäßr. Lösung wird i. Vak. auf 50 ccm eingengt und auf eine 450 ccm enthaltende Dowex-I-Austauschersäule (Formiat-Form) gebracht. Die Säule wird sodann mit 1 l Wasser gewaschen. Anschließend wird mittels Gradienten-Elution fraktioniert. Zu diesem Zwecke lassen wir 1 l 1.2 *n* Ameisensäure in ein Mischgefäß, das 2 l Wasser enthält, eintropfen (Tropfgeschwindigkeit: 0.7 ccm/Min.). Es werden 10-ccm-Fractionen aufgefangen und nach der Benzidinmethode von RYDON und SMITH<sup>17)</sup> für stickstoffhaltige Verbindungen, die aktiven Wasserstoff enthalten, getestet. Auf diese Weise erhält man zwei wohlgetrennte Maxima in den Fractionen 81–102 (A) und 144–171 (B). Die entsprechenden Fractionen werden vereinigt und unter vermindertem Druck zur Trockene gebracht. Ausb.: 0.9 g von Frakt. A und 1.7 g von Frakt. B. Die papierchromatographische

<sup>16)</sup> J. chem. Soc. [London] 1941, 50.

<sup>17)</sup> H. N. RYDON und P. W. G. SMITH, Nature [London] 169, 922 [1952].

Analyse ergibt (Lösungsmittel I) für A einen  $R_{\text{Glucosamin}} = 2.15$  und für B einen  $R_{\text{Glucosamin}} = 2.01$ . Beide Fraktionen geben keine Ninhydrin- und Morgan-Elson-Reaktion und reduzieren nicht.

Nach 4 stdg. Hydrolyse mit 2.5 *n* HCl liefert Fraktion A bei der papierchromatographischen Analyse einen einzigen reduzierenden ninhydrin-positiven Fleck vom  $R_{\text{Glucosamin}} = 1.10$ , Frakt. B einen ebensolchen vom  $R_{\text{Glucosamin}} = 0.89$ .

Diese Substanzen stimmen in ihren  $R_F$ -Werten und anderen Eigenschaften mit denjenigen der freien diastereoisomeren Muraminsäuren überein (s. unten).

Auf Grund der Vorbehandlung und im Zusammenhang mit den oben angeführten Eigenschaften muß es sich bei Fraktion A und B um die  $\beta$ -Äthylglykoside Va und VIa der diastereoisomeren *N*-Acetyl-muraminsäuren handeln. Beide Substanzen sind sehr leicht löslich in Wasser, Methanol und Äthanol, löslich in Aceton, wenig in Essigester und unlöslich in Äther. Leider gelang die Kristallisation dieser Verbindungen bisher noch nicht.

$\beta$ -Äthyl-2-desoxy-2-acetamino-3-*O*-[ $\alpha$ -D-carboxy-äthyl]-4.6-benzyliden-D-glucopyranosid (VIIa): 0.8 g Frakt. Va werden nach A. NEUBERGER<sup>16)</sup> in die 4.6-Benzylidenverbindung übergeführt. Rohausb. 0.55 g amorphes farbloses Pulver. Aus Chloroform/Äther farblose Nadeln vom Schmp. 254–255° (unkorr.). Nach zweimaligem Umkristallisieren blieben Drehung und Schmelzpunkt unverändert. Zur Analyse wurde über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> bei 80°/0.1 Torr bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Ausb. 258.7 mg (25.4% d. Th.).  $[\alpha]_D^{25} : +50.5^\circ$  ( $c = 2$ , in Methanol).

C<sub>20</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>8</sub> (409.4) Ber. C 58.67 H 6.65 N 3.42 Gef. C 58.37 H 6.68 N 3.12

Frakt. B ergab unter identischen Bedingungen in nur sehr schlechter Ausbeute ein amorphes 4.6-Benzylidenderivat, das nicht kristallisierte.

$\alpha$ -Methyl-2-desoxy-2-acetamino-3-*O*-[ $\alpha$ -L-carboxy-äthyl]-D-glucopyranosid (VIb): 5 g reines  $\alpha$ -Methyl-2-desoxy-2-acetamino-4.6-benzyliden-D-glucosaminid vom Schmp. 258–259° (IIb) werden, wie unter IIIa und IVa beschrieben, in das Natriumsalz verwandelt und mit  $\alpha$ -Brompropionsäure-äthylester kondensiert. Im Gegensatz zur entsprechenden  $\beta$ -Äthylverbindung löst sich das Na-Salz in heißem Dioxan nicht vollständig.

Bei der alkalischen Verseifung des Äthylesters unter den oben beschriebenen Bedingungen ist selbst nach 3 stdg. Behandlung nur ein Teil des eingesetzten Materials in Lösung gegangen d. h. verseift. Der lösliche Anteil wird eingengt und 1 Stde. mit 60-proz. Essigsäure auf dem Wasserbade erhitzt. Nach Abdestillieren der Essigsäure i. Vak. wird der Rückstand in Wasser aufgenommen, und wie oben beschrieben an einer Dowex-I-Säule fraktioniert.

Man erhält aus dieser Trennung nur ein Maximum in den Fraktionen 174–186. Beim Einengen der vereinigten Fraktionen kristallisiert die Substanz in farblosen Nadeln. Ausbeute nach zweimaligem Umkristallisieren aus Aceton: 420.6 mg,  $[\alpha]_D^{25} : +62.5^\circ$  ( $c = 4$ , in Wasser). VIb sublimiert bei 180° unter Bildung von XII. Zur Analyse wird VIb bei 80° über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>8</sub> (307.3) Ber. C 46.89 H 6.89 N 4.56 C(CH<sub>3</sub>) 9.78 OCH<sub>3</sub> 10.1  
Gef. C 46.59 H 6.74 N 4.69 C(CH<sub>3</sub>) 9.80 OCH<sub>3</sub> 9.3

Die krist. Substanz ist chromatographisch einheitlich,  $R_{\text{Glucosamin}} = 1.82$  (Lösungsmittel I). Sie gibt eine negative Reaktion mit Ninhydrin, *p*-Dimethylaminobenzaldehyd und Anilin-oxalat. Vierstündige Hydrolyse mit 2.5 *n* HCl liefert in chromatographisch einheitlicher Form das L-Diastereoisomere der Muraminsäure.  $R_{\text{Glucosamin}} = 0.89$  (Lösungsmittel I).

$\alpha$ -Methyl-2-desoxy-2-acetamino-3-*O*-[ $\alpha$ -L-carboxy-äthyl]-D-glucopyranosid-lacton (XII): 175 mg VIb werden bei 175–200°/1 Torr sublimiert. Zur Analyse wird über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> bei 80° und 1 Torr bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Ausb.: 75 mg schlanke, farblose Nadeln, Schmp.

236° (Zers.).  $[\alpha]_D^{25}$ : +131° (3-Min.-Wert), +84.0° (3 Stdn.), Endwert: +78.6° (nach 1 Woche) ( $c = 1.4$ , in Wasser).

Die Substanz liefert einen stark positiven Test mit Hydroxylamin und Eisenchlorid nach AVISON<sup>18)</sup>.

$C_{12}H_{19}NO_7$  (289.3) Ber. C 49.82 H 6.62 N 4.85 Gef. C 49.97 H 6.46 N 5.01

2-Desoxy-2-amino-3-O-[ $\alpha$ -D-carboxy- $\beta$ -thyl]-D-glucopyranose (Muraminsäure) (VIII): 2.2 g amorphes Material aus Frakt. A werden in 50 ccm 2.5  $n$  HCl gelöst und 4 Stdn. unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Das Hydrolysat wird mit Aktivkohle entfärbt und i. Vak. zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird mit etwa 20 ccm Wasser aufgenommen und unter Rühren bei 0° mit sorgfältig ausgewaschenem Dowex-I (OH-Form) versetzt, bis der mit der Glaselektrode bestimmte  $p_H$ -Wert 10.5 erreicht hat. Die Suspension wird in der Kälte filtriert und das Harz sorgfältig mit Wasser ausgewaschen. Sodann suspendiert man das Harz in 20 ccm Wasser und fügt 1  $n$  HCl bis  $p_H$  5.8 zu. Nach Abfiltrieren und Waschen des Harzes mit Wasser werden diese Filtrate und Waschwässer vereinigt und gefriergetrocknet. Ausb. 990 mg eines amorphen, schwach gelblichen und schwach hygroskopischen Pulvers.

Aus dem ersten Filtrat des Harzes erhielten wir nach Gefrier Trocknung 285 mg eines amorphen Rückstandes, der neben kleinen Mengen Muraminsäure und basischen Produkten im wesentlichen eine neutrale Substanz mit den nachfolgenden Eigenschaften enthält: Sie wandert weder bei  $p_H$  1.9 noch bei  $p_H$  6.5 im elektrischen Feld. Sie gibt eine negative Reaktion mit Ninhydrin und Anilinphthalat, reduziert jedoch ammoniakalische Silbernitratlösung, ist Morgan-Elson-positiv und gibt ebenfalls eine starke Blaufärbung mit dem Reagenz nach RYDON und SMITH<sup>17)</sup>. Der  $R_{Glucosamin}$  beträgt 1.85 (Lösungsmittel I).

990 mg der amorphen Muraminsäure werden in 2 ccm 50-proz. Äthanol unter vorsichtigem Erwärmen gelöst und filtriert. Nach dem Abkühlen scheiden sich nach Reiben mit dem Glasstab farblose Nadelchen ab. Die Kristallisation wird durch vorsichtige Zugabe von 2.5–3.0 ccm Äthanol vervollständigt. Ausb. 524.5 mg. VIII enthält 1 Mol. Kristallwasser, das beim Trocknen über  $P_2O_5$  bei 80°/0.1 Torr abgegeben wird (ber. 1  $H_2O$  6.69%, gef. 6.78, 7.02). Die wasserfreien Nadelchen schmelzen bei 155°,  $[\alpha]_D^{25}$ : +165.0° (extrapoliert zur Zeit 0)  $\rightarrow$  +123.0° (Gleichgewichtsdrehung, 3 Stdn.) ( $c = 3$ , in Wasser).

$C_9H_{17}NO_7$  (251.3) Ber. C 43.02 H 6.83 N 5.58 Gef. C 43.27 H 6.83 N 5.65

$\beta$ -Äthyl-2-desoxy-2-acetamino-3-O-äthyl-4,6-benzyliden-glucopyranosid (IXa): 2.5 g (0.07 Mol) IIa werden in 100 ccm scharf getrocknetem Dioxan suspendiert und unter Feuchtigkeitsausschluß und Rühren zum Sieden erhitzt. 192 mg (0.08 Mol) Natriumhydrid werden teilweise hinzugegeben, wobei IIa alsbald als Natriumsalz in Lösung geht. Nach etwa 2 Stdn. hat sich alles Natriumhydrid umgesetzt. Die gelbgrüne Lösung wird auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 11 ccm Äthylbromid (0.15 Mol) versetzt. Nach 15 Min. langem Erhitzen auf 38° unter Rückfluß beginnt sich Natriumbromid aus der Lösung abzuscheiden. Erhitzen und Rühren werden weitere 16 Stdn. fortgesetzt. Sodann wird i. Vak. zur Trockene eingedampft und der feste, kristalline Rückstand mehrmals im Mörser mit Wasser verrieben, bis alles Natriumbromid herausgelöst ist. Ausb. 2.7 g krist. Material. Nach einmaligem Umkristallisieren aus Methanol und Trocknen über  $P_2O_5$  bei 80°/0.1 Torr bis zur Gewichtskonstanz 2.3 g (85% d. Th.) Nadeln, Schmp. 297°.  $[\alpha]_D^{25}$ : -22° ( $c = 0.5$ , in Chloroform).

$C_{19}H_{27}NO_6$  (365.4) Ber. C 62.45 H 7.46 N 3.83 Gef. C 62.20 H 7.49 N 3.96

$\beta$ -Äthyl-2-desoxy-2-acetamino-3-O-äthyl-glucopyranosid (IXa): Zur Abspaltung der Benzylidengruppe nach A. NEUBERGER<sup>16)</sup> wird 1 g IXa 30 Min. in 20 ccm 60-proz. Essigsäure auf dem

<sup>18)</sup> A. W. D. AVISON, J. chem. Soc. [London] 1955, 735.



Wasserbade erhitzt, wobei die Substanz nach wenigen Minuten in Lösung geht. Die Lösung wird dann i. Vak. zur Trockene eingedampft, mit wenig Wasser aufgenommen und mit Äther ausgeschüttelt. Die Lösung wird erneut i. Vak. zur Trockene gebracht und der Rückstand aus Aceton zweimal umkristallisiert. Zur Analyse wurde über  $P_2O_5$  bei  $80^\circ$  und 0.1 Torr bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Ausb. 338.4 mg (44.5% d. Th.), Schmp.  $227-229^\circ$  (bei  $189^\circ$  tritt eine Umwandlung des Kristallhabitus von kleinen Stäbchen zu Nadeln auf).

Chromatographisches Verhalten:  $R_{\text{Glucosamin}} = 2.18$  in Lösungsmittel I. Reagiert nicht mit Ninhydrin, ist nicht reduzierend und Morgan-Elson-negativ. Nachweis mit dem Benzidin-Reagenz nach RYDON und SMITH<sup>17)</sup>.  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-45.5^\circ$  ( $c = 0.5$ , in Wasser).

$C_{12}H_{23}NO_6$  (277.3) Ber. C 51.95 H 8.37 N 5.05 Gef. C 51.69 H 8.49 N 5.32

*2-Desoxy-2-amino-3-O-äthyl-glucopyranose · HCl (XI)*: 349.4 mg *Xa* werden 4 Stdn. mit 20 ccm 2.5 *n* HCl unter Rückfluß gekocht. Nach Entfärbung mit Aktivkohle wird filtriert und i. Vak. zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird in wenig Methanol gelöst und die Lösung unter vorsichtigem Erwärmen tropfenweise mit Aceton versetzt. Die Kristallisation setzt alsbald ein. Sie wird durch weitere Zugabe von Aceton und Aufbewahren im Kühlschrank über Nacht vervollständigt. Ausb. 209.0 mg (68% d. Th.) derber leicht gelblicher Kristalle. Nach einer weiteren Kristallisation aus Methanol/Aceton: 149.0 mg. Schmp.  $190^\circ$  (Zers.).

Chromatographisches Verhalten:  $R_{\text{Glucosamin}} = 1.70$  in Lösungsmittel I. Reagiert positiv mit Ninhydrin, Anilinphthalat, Morgan-Elson-Reagenz und Benzidin-Reagenz.  $[\alpha]_D^{25}$ :  $+85.0^\circ$  ( $c = 2$ , in Wasser); Gleichgewichtsdrehung nach 4 Stdn.

$C_8H_{17}NO_5 \cdot HCl$  (243.7) Ber. C 39.45 H 7.44 N 5.75 Gef. C 39.68 H 7.64 N 5.82

Die Papierchromatographie wurde immer absteigend ausgeführt. Lösungsmittel I: Essigsäure-äthylester/Pyridin/Essigsäure/Wasser = 5 : 5 : 1 : 3.

Die Schmelzpunkte wurden mit dem Leitz Mikroskopheiztisch 350 bestimmt.