

Bestimmung von Nicotinsäure-amid in Rindsleber.

500 g Rindsleber wurden fein gehackt, mit 2 Liter Wasser ausgekocht und die wässerigen Auszüge eingedampft. Von dem Trockenrückstand, der 22 g wog, haben wir 17 g eine Stunde mit 300 cm³ 0,1-n. Kalilauge erhitzt, hierauf die Flüssigkeit mit Salzsäure genau neutralisiert und im Vakuum zur Trockene gebracht. Den getrockneten Rückstand zogen wir wiederholt mit kochendem Benzol aus. Der nach dem Abdestillieren des Benzols verbleibende Rückstand wurde mit Dinitro-chlorbenzol in bekannter Weise verschmolzen und die Schmelze in oben beschriebener Weise aufgearbeitet und kolorimetriert.

Die Messung im Leifophotometer ergab den Extinktionsmodul 0,60, was einer Konzentration von 0,035 mg Nicotinsäure-amid pro cm³ entspricht. Da die gesamte wässrige Flüssigkeit des Reaktionsproduktes 50 cm³ betrug, berechnen sich für die angewandten 17 g Leberextrakt 1,75 mg Nicotinsäure-amid, oder 2,26 mg in 500 g Frischleber.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

62. Isolierung von *d*-Galaktose und *l*-Rhamnose aus dem Hydrolysat des spezifischen Polysaccharids von *Bact. dysenteriae* (*Shiga*)¹⁾

von W. Th. J. Morgan.

(31. III. 38.)

Durch ausgedehnte Arbeiten der letzten Jahrzehnte ist es bekannt geworden, dass für die immunologische Spezifität von vielen Bakterien-Antigenen ihr Gehalt an spezifischen Polysacchariden von grundlegender Bedeutung ist²⁾. Solche Polysaccharide spielen in diesen Fällen die Rolle von Haptenen, d. h. Bausteinen, die für die Spezifität des Vollantigens verantwortlich sind.

Auch für die glatten Stämme von *Bact. dysenteriae* (*Shiga*) ist ein ähnlicher Tatbestand durch frühere Arbeiten sichergestellt worden. Es lässt sich auch hier ein spez. Polysaccharid isolieren³⁾, das an sich nicht antigen wirksam ist, jedoch für die Spezifität des Vollantigens⁴⁾ verantwortlich ist.

Vorliegende Untersuchung befasst sich mit Versuchen zur Aufklärung der chemischen Zusammensetzung dieses Polysaccharids.

¹⁾ Diese Arbeit wurde mit Unterstützung der *Rockefeller Foundation* ausgeführt.

²⁾ Vgl. K. Landsteiner, *The Specificity of Serological Reactions*, Baltimore (1936).

³⁾ W. Th. J. Morgan, *Brit. J. Exptl. Path.*, **12**, 62 (1931), *Biochem. J.* **30**, 909 (1936).

⁴⁾ W. Th. J. Morgan, *Biochem. J.* **31**, 2003 (1937).

Infolge der sehr beschränkten Materialmengen ist es leider nur möglich, einiges über die Komponenten anzugeben, die bei der vollständigen Hydrolyse erhalten werden.

Das wie früher beschrieben¹⁾ isolierte Polysaccharid lässt sich durch Erwärmen mit wässriger Säure zu einem Gemisch von Zuckern aufspalten. Dabei war folgendes bekannt: Die Hydrolyse kann so ausgeführt werden, dass die Ausbeute an reduzierten Zuckern als Glucose berechnet 97% beträgt. Im Hydrolysat ist ein Stoff enthalten, der die Farbreaktionen von Aminohexosen gibt. Bei der quantitativen kolorimetrischen Bestimmung²⁾ wird ein Gehalt von ungefähr 20% als Glucosamin berechnet gefunden. Das Polysaccharid enthält ferner 5% Acetyl, das relativ fest haftet und daher wahrscheinlich am Stickstoff gebunden ist. Dem entspricht, dass nach vorsichtiger Hydrolyse mit 0,01-n. Salzsäure bei der kolorimetrischen Bestimmung von N-Acetyl-hexosamin³⁾ eine dem totalen Stickstoffgehalt äquivalente Menge von ca. 25% N-Acetyl-hexosamin gefunden wird. Der N-Gehalt des Polysaccharids beträgt 1,7%, was dafür spricht, dass der gesamte Stickstoff als Aminozucker vorliegt. Es ist demnach sehr wahrscheinlich, dass ein am Stickstoff acetylierter Aminozucker als Baustein des Polysaccharids in einer Menge von etwa 20—25% enthalten ist. Hingegen ist es wenig wahrscheinlich, dass es sich dabei um *d*-Glucosamin handelt. Ferner ist in einer Notiz⁴⁾ erwähnt worden, dass sich aus dem Hydrolysat etwas *d*-Galaktose isolieren lässt. Die Isolierung wird hier im experimentellen Teil genau beschrieben. Es konnten ca. 15% reiner Galaktose abgetrennt werden. Ferner war bekannt, dass die Farbreaktionen mit Phloroglucin und Salzsäure (nach *Wheeler* und *Tollens*)⁵⁾ sowie mit Orcin und Salzsäure (nach *Bial*)⁶⁾ negativ verlaufen, dass somit grössere Mengen von Pentosen und Hexuronsäuren nicht anwesend sein können. Ebenso ist der Test auf Glucuronsäure mit Naphtoresorcin (nach *Tollens*)⁷⁾ negativ. Auch der Test nach *Seliwanoff* mit Resorcin-Salzsäure verlief praktisch negativ, sodass auch keine nennenswerten Mengen von Ketohexosen vorhanden sein können.

Bei der vorliegenden Untersuchung wurde versucht festzustellen, was für andere Zucker-Komponenten am Aufbau des Polysaccharids beteiligt sind. Aus dem Hydrolysat wurde zunächst die Galaktose vollständig entfernt, und zwar entweder durch direkte

¹⁾ *W. Th. J. Morgan*, Brit. J. Exptl. Path. **12**, 62 (1931), Biochem. J. **30**, 909 (1936).

²⁾ *L. A. Elson* und *W. Th. J. Morgan*, Biochem. J. **27**, 1824 (1933).

³⁾ *W. Th. J. Morgan* und *L. A. Elson*, Biochem. J. **28**, 988 (1934).

⁴⁾ *W. Th. J. Morgan*, Brit. J. Exptl. Path. **13**, 324 (1932).

⁵⁾ *A. 254*, 329 (1889). ⁶⁾ *Bioch. Z.* **3**, 323 (1907).

⁷⁾ Vgl. *A. W. van der Haar*, Anleitung zum Nachweis, zur Trennung und Bestimmung etc. (1920).

Vergärung mit Hefe, oder es wurde erst die Hauptmenge der Galaktose mit *o*-Tolyl-hydrazin¹⁾ abgeschieden und der verbleibende Rest durch Gärung entfernt. Dabei fiel es auf, dass bei der Gärung beträchtlich mehr Kohlendioxyd entwickelt wurde als der isolierten Menge von *d*-Galaktose entspricht. Es wurde geprüft, ob ausser Galaktose noch andere vergärbare Zucker, insbesondere *d*-Glucose, *d*-Mannose und *d*-Fructose anwesend sind. Keiner derselben konnte jedoch einwandfrei nachgewiesen werden. Es ist natürlich nicht ausgeschlossen, dass trotzdem kleine Mengen davon vorhanden sind.

Aus den mit Hefe nicht vergärbaren Anteilen konnte mit Phenylhydrazin das Osazon der *l*-Rhamnose erhalten werden. Anschliessend liess sich auch *l*-Rhamnose als β -Naphthyl-hydrazon²⁾ abtrennen. Durch Spaltung dieses Derivats nach *Herzfeld*³⁾ mit Benzaldehyd liess sich krystallisierte *l*-Rhamnose in Substanz gewinnen, so dass dieser Zucker als Baustein des Polysaccharids mit Sicherheit nachgewiesen ist. Die Ausbeute an reinem *l*-Rhamnose-hydrat betrug 7,5%. Dies stellt natürlich nur eine untere Grenze für den wirklichen Gehalt dar.

Das Polysaccharid enthält demnach mindestens 15% *d*-Galaktose, 7,5% *l*-Rhamnose, sowie ca. 25% N-Acetyl-aminozucker.

Herrn Prof. Dr. *Reichstein* danke ich für sein Interesse und seine Hilfe.

Experimenteller Teil.

Reinigung des Polysaccharids.

Das Polysaccharid wurde im Lister Institute, London, nach den genannten Angaben⁴⁾ hergestellt und gereinigt. Zur Kontrolle wurde es einer weiteren fraktionierten Fällung aus wässriger Lösung mit Aceton unterworfen. Bis zu einer Konzentration von 50 Volumenprozent Aceton fiel nichts aus. Bei einem Gehalt von 56 Volumenprozent Aceton bildete sich eine kleine Fällung, die verworfen wurde. Bei 60, 66 und 75 Volumenprozent Aceton wurden drei Hauptfraktionen durch Zentrifugieren abgetrennt, mit Aceton gewaschen und im Exsikkator über Schwefelsäure getrocknet. Weiterer Zusatz von Aceton gab nur eine sehr geringe Nachfällung, die ebenfalls verworfen wurde. Über die Ausbeuten und einige Kennzahlen orientiert die folgende Tabelle, Seite 472.

Der Stickstoff wurde nach *Kjeldahl* bestimmt, das Reduktionsvermögen nach *Hagedorn-Jensen*⁵⁾, sowie nach *Willstätter-Schudl* in der Ausführungsform von *Macleod* und *Robison*⁶⁾. Dabei ist das Reduktionsvermögen von Glucose = 100 gesetzt.

¹⁾ A. W. van der Haar, R. **37**, 108 (1917).

²⁾ A. van Ekenstein, C. A. Lobry de Bruyn, R. **15**, 225 (1896).

³⁾ B. **28**, 442 (1895).

⁴⁾ W. Th. Morgan, Biochem. J. **30**, 909 (1936).

⁵⁾ H. C. Hagedorn, B. N. Jensen, Biochem. Z. **135**, 46 (1923); **137**, 92 (1923).

⁶⁾ M. Macleod, R. Robison, Biochem. J. **23**, 517 (1929).

Fraktionierung des Polysaccharids.

Fraktion	Aceton-Konzentration	Gewicht	$[\alpha]_D^{18}$ in Wasser	Stickstoff in %	Reduktionsvermögen	
					nach H. J.	gegen Jod
I . . .	50 → 56%	0,1 g	—	—	—	—
II . . .	56 → 60	2,7	98,0	1,72	2,2	2,5
III . .	60 → 66	2,5	98,1	1,75	2,3	2,3
IV . .	66 → 75	1,1	98,7	1,65	3,3	3,0
V . . .	über 75	0,1	72,0	—	—	—

Die Fraktionen II—IV, die fast identische Kennzahlen ergaben, wurden vereinigt. Eine im Hochvakuum gut getrocknete Probe gab die folgenden Werte:

Gef. C 43,6; H 7,0; N (*Dumas*), 1,7; $-\text{COCH}_3$ 5,0; Asche 0,8%.

Da die Substanz hygroskopisch ist, so ist auf den C-Wert kein zu grosses Gewicht zu legen.

Saure Hydrolyse.

2 g des trockenen Polysaccharids wurden frisch gepulvert in n. Schwefelsäure gelöst und damit auf ein Volumen von genau 100 cm³ aufgefüllt. Die Lösung wurde so lange auf 98—100° erhitzt, bis das Reduktionsvermögen (nach *Hagedorn-Jensen*) ein Maximum erreichte, was nach 5 Stunden der Fall war. Das Reduktionsvermögen entsprach dann insgesamt 1,94 g Glucose. Die ursprüngliche Drehung der Lösung von $\alpha_D^{18} = +2,05^\circ$ fiel dabei auf $+1,40^\circ$ (1 dm-Rohr). Die Lösung wurde gekühlt, mit Barytlösung bis zur eben alkalischen Reaktion versetzt, filtriert, mit 1 Tropfen verdünnter Schwefelsäure angesäuert und mit einer Spur Sodalösung genau neutralisiert. Dann wurde über wenig gewaschene Kohle filtriert und auf 150 cm³ aufgefüllt.

Isolierung von *d*-Galaktose durch direkte Krystallisation.

Diese wurde früher wie folgt durchgeführt: Ein, wie oben, aber aus 2,7 g Polysaccharid gewonnenes Hydrolysat wurde im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 5 cm³ 90-proz. Essigsäure gelöst und einige Tage bei 5° stehen gelassen. Es schied sich ein farbloses Krystallpulver ab, das abgenutscht, mit Eisessig gewaschen und im Exsikkator getrocknet wurde. Ausbeute 0,41 g. Es wurde aus 90-proz. Essigsäure umkrystallisiert. Das Produkt zeigte dann einen Smp. 166—167° korr. Eine Probe authentischer *d*-Galaktose, sowie die Mischprobe schmolzen genau gleich. Die spez. Drehung betrug

$$[\alpha]_D^{18} = +139^\circ \text{ (nach 5 Minuten)} \longrightarrow +80,5^\circ \pm 2^\circ \text{ (nach 24 Stunden)}$$

($c = 1$ in Wasser). Für α -*d*-Galaktose findet man in der Literatur¹⁾ $[\alpha]_D^{20} = +140^\circ \rightarrow +81,2^\circ$.

Ferner wurde das α -Methyl-phenyl-hydrason bereitet, das sofort den richtigen Smp. 180—182° (abgekürztes Thermometer) zeigte.

Versuche zur Isolierung der Aminohexose und Isolierung von *l*-Rhamnosazon.

Vorversuche mit reinem Glucosamin und Chondrosamin. Während sich *d*-Glucosamin recht leicht nachweisen lässt, da viele seiner Derivate gut krystallisieren²⁾, lässt sich *d*-Chondrosamin relativ schwer aus Gemischen abscheiden. Auf der Suche nach einem Derivat, das sich auch zur Abscheidung von *d*-Chondrosamin eignet, wurde zunächst sein *N*-Carbobenzoxo-Derivat hergestellt und, da dieses in Wasser relativ leicht löslich ist, wurden noch die Kondensationsprodukte des *d*-Chondrosamins mit Salicyl-aldehyd, Anis-aldehyd, Zimmt-aldehyd sowie *o*-, *m*-, und *p*-Nitro-benzaldehyd bereitet. Von diesen war das Kondensationsprodukt mit Zimmtaldehyd brauchbar, da es sich aus wässriger Lösung abscheidet, noch etwas besser war das Produkt mit *p*-Nitro-benzaldehyd. Es lässt sich auch zur Abscheidung von *d*-Glucosamin benützen.

p-Nitro-benzal-*d*-chondrosamin. 100 mg Chondrosamin-chlorhydrat³⁾ wurden in 3—5 cm³ Methanol gelöst, mit 200 mg reinem *p*-Nitro-benzaldehyd und nach dessen Lösung mit der Lösung von 80 mg Kaliumbicarbonat in 1 cm³ Wasser versetzt. Es wurde $\frac{1}{2}$ Stunde bei Zimmertemperatur stehen gelassen, dann im Vakuum eingedampft. Der Rückstand krystallisierte bald. Es wurde mit etwas mehr Wasser versetzt, abgenutscht, mit wenig Eiswasser, dann gut mit Chloroform und Äther gewaschen und im Vakuum getrocknet. Erhalten wurden 83 mg Derivat vom Smp. 172° korr. Beim Umkrystallisieren treten relativ grosse Verluste ein. Durch Erwärmen mit verdünnter Salzsäure tritt Spaltung ein; wird der entstehende *p*-Nitro-benzaldehyd mit Chloroform und Äther mehrmals ausgeschüttelt und die saure Lösung im Vakuum eingedampft, so krystallisiert nach Zusatz von Alkohol das Chondrosamin-chlorhydrat aus.

p-Nitro-benzal-*d*-glucosamin. 100 mg *d*-Glucosamin-chlorhydrat wurden wie oben behandelt. Erhalten wurden 135 mg Derivat, das roh bei etwa 170° korr. schmolz. Aus Methanol durch Einengen im Vakuum und Zugabe von Aceton wurden Krystalle erhalten, die bei 182° korr. schmolzen, sie beginnen sich jedoch schon gegen 170° unter Verfärbung zu zersetzen.

Trennung von *d*-Glucosamin und *d*-Galaktose durch Gärung. Es ist zwar bekannt, dass *d*-Glucosamin und Chondrosamin von Hefe nicht vergoren werden. Um zu prüfen, ob Glucosamin nach der Vergärung einer relativ grossen Menge gleichzeitig anwesenden Zuckers noch unverändert isoliert werden kann, wurden 400 mg *d*-Galaktose und 100 mg *d*-Glucosamin-chlorhydrat in 5 cm³ Leitungswasser und 5 cm³ Hefe-Bouillon (1 Teil Bäckerhefe und 10 Teile Leitungswasser), sowie mit lebender Bäckerhefe, die zweimal über *d*-Galaktose passiert worden war und diese vollständig vergor, angesetzt. Nach 4 Tagen waren insgesamt 120 cm³ Gas entwickelt worden. Die Lösung wurde über Kohle filtriert und nach Zusatz von wenig verdünnter Salzsäure im Vakuum auf ein ganz kleines Volumen eingeeengt. Beim Stehen krystallisierten 83 mg Glucosamin-chlorhydrat aus.

¹⁾ C. Tanret, Bl. [3] 33, 348 (1905); A. Fernau, Z. physiol. Ch. 60, 287 (1909).

²⁾ Vgl. beispielsweise die Literaturangaben bei Chargaff und Bovarnick, J. Biol. Chem. 118, 421 (1937). Danach scheint das *N*-Carbobenzoxo-Derivat für die Abscheidung von *d*-Glucosamin aus Gemischen sehr geeignet zu sein. Das analoge Derivat von *d*-Chondrosamin ist jedoch in Wasser viel zu löslich, um für diesen Zweck benützt werden zu können.

³⁾ Das Präparat wurde aus Chondroitinsulfosäure nach E. Jorpes und S. Bergström, Z. physiol. Ch. 244, 253 (1936) bereitet. Es enthielt noch etwas Asche.

Erster Hauptversuch. 50 cm³ Hydrolysat (entsprechend 670 mg Polysaccharid) wurden zweimal über gewaschene Kohle filtriert, im Vakuum auf 10 cm³ eingengt, mit 10 cm³ Hefebouillon (aus 1 Teil Bäckerhefe und 10 Teil Leitungswasser durch 5 Minuten langes Kochen und Filtration hergestellt) versetzt, einmal aufgekocht und auf 20° abgekühlt. Dann wurde die Suspension einer Bäckerhefe zugesetzt, die zweimal frisch über *d*-Galaktose passiert war und diese jeweils in 3—4 Tagen bei 18° vollständig vergor. Nach vier Tagen waren etwa 92 cm³ Gas entwickelt worden, was ca. 360 mg Hexose entsprechen würde. Die Gärung war hierauf beendet. Es wurde über frisch gewaschene Kohle filtriert und bei lackmussaurer Reaktion im Vakuum bei 40° Badtemperatur zum Syrup eingedampft. Dieser wurde in Methanol aufgenommen, wobei etwas gummiartiges Material unlöslich zurückblieb, das noch mehrmals mit Methanol ausgezogen wurde. (Es gab die Farbreaktion auf Aminosucker¹⁾). Die Methanol-Lösungen wurden eingedampft und der Rückstand mit absolutem Alkohol mehrmals ausgezogen, wobei etwas unlösliches Pulver zurückblieb, das die Farbreaktion auf Aminosucker²⁾ stark gab. Die alkoholische Lösung wurde im Vakuum eingedampft. Der verbleibende hellgelbliche Syrup gab die Farbreaktion auf Aminosucker; bei einer semiquantitativen kolorimetrischen Bestimmung zeigte es sich aber, dass ein recht grosser Verlust eingetreten war. Der genannte Syrup wurde wie beim Vorversuch beschrieben mit 200 mg p-Nitro-benzaldehyd in 5 cm³ Methanol und 80 mg Kaliumbicarbonat in 1 cm³ Wasser versetzt. Bei der Aufarbeitung wurde als einziges, in Wasser schwer lösliches Produkt unveränderter p-Nitro-benzaldehyd zurückerhalten.

Zur Entfernung des Reagens-Überschusses wurde daher die wässrige Lösung mit verdünnter Salzsäure eben kongosauer gemacht und mehrmals mit Chloroform, dann mit Äther ausgeschüttelt. (Aus den Auszügen wurde 36 mg p-Nitro-benzaldehyd erhalten, dies ist also die maximale Menge, die in Reaktion getreten sein konnte.) Die wässrige saure Lösung wurde im Vakuum von Chloroform und Äther völlig befreit, ihr Volumen betrug dann 5 cm³. Dann wurde 1 g Natriumacetat, 2 Tropfen Eisessig sowie 0,6 g Phenylhydrazin zugegeben und die Mischung unter Kohlendioxyd-Verschluss zwei Stunden auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Erkalten wurde mit etwas Toluol gedeckt, welches das schmierige, dunkelbraune Osazon grösstenteils löste. Beim Stehen über Nacht hatten sich an der Zwischenschicht Krystalle abgeschieden, die abgenutscht, mit Wasser und Toluol, dann mit etwas Äther gewaschen wurden. Zur Reinigung wurden sie in einer Spur Methanol gelöst und die

¹⁾ L. A. Elson, W. Th. J. Morgan, Biochem. J. **27**, 1824 (1933).

²⁾ L. A. Elson, W. Th. J. Morgan, Biochem. J. **27**, 1824 (1933).

Lösung mit viel Äther versetzt. Die klare Lösung wurde abgessen und der Niederschlag noch zweimal aus einer Spur Methanol mit Äther umgefällt. Die vereinigten ziemlich hellgelben Ätherlösungen wurden auf ein kleines Volum eingedampft, worauf sich das Osazon in gelben Kryställchen abschied, die bei 178—180° korr. schmolzen. Die Ausbeute betrug 20 mg. Zur Reinigung wurde nochmals aus sehr viel Äther durch Einengen umkrystallisiert. Es wurden 11 mg rein gelbe Kryställchen vom Smp. 180—182° korr. erhalten. Eine Probe *l*-Rhamnosazon¹⁾ zeigte den Smp. 183—184° korr., die Mischprobe schmolz bei 182—183°. Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei 50° getrocknet.

3,351 mg Subst. gaben 7,75 mg CO₂ und 1,98 mg H₂O

C₁₈H₂₂O₃N₄ (342,40) Ber. C 63,14 H 6,48%

Gef. „ 63,07 „ 6,61%

Das Osazon zeigte in Methanol Rechtsdrehung, für eine genaue Bestimmung war die vorhandene Menge unzureichend. Gefunden wurde 24 Stunden nach der Lösung $[\alpha]_D^{20} = +42^\circ \pm 10^\circ$ (in Methanol). Für reines *l*-Rhamnosazon wurde 24 Stunden nach der Lösung $[\alpha]_D^{20} = +53^\circ$ ($c = 1$ in Methanol) gefunden.

Blindversuch mit Hefe und Galaktose allein. Um sicher zu sein, dass die Rhamnose nicht aus der Hefe stammen konnte, wurden 1,5 g *d*-Galaktose in 30 cm³ Wasser und 20 cm³ Hefebouillon sowie dreimal so viel der Hefeaufschlemmung als zum Vergären des Polysaccharid-Hydrolysates verwendet worden war, vergoren. Nach vier Tagen, als die Gärung beendet war, wurde über Kohle filtriert und das Filtrat im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde mit Methanol, dann mit absolutem Alkohol ausgezogen. Aus den Alkohollösungen wurden 130 mg Syrup erhalten, der *Fehling'sche* Lösung nicht reduzierte.

Zweiter Hauptversuch. 50 cm³ Hydrolysat, entsprechend 670 mg Polysaccharid, wurden im Vakuum zum dünnen Syrup eingedampft, mit einer Lösung von 600 mg reinstem *o*-Tolyl-hydrazin in 5 cm³ Methanol 10 Minuten unter Rückfluss gekocht und hierauf 16 Stunden bei 0° stehen gelassen. Es hatte sich eine reichliche Menge von feinen Krystallen abgeschieden, die abgenutscht, mit absolutem Alkohol, etwas Wasser, dann mit Äther gewaschen und im Vakuum getrocknet wurden. Es wurden 129 mg erhalten. Sie wurden einmal aus absolutem Alkohol krystallisiert, wobei farblose Kryställchen vom Smp. 180—182° korr. erhalten wurden. Das zum Vergleich aus *d*-Galaktose bereitete *o*-Tolyl-hydrazon²⁾, sowie die Mischprobe schmolzen genau gleich.

Die Lösung, aus der die 129 mg Galaktose-Derivat abfiltriert worden waren, wurde im Vakuum vom Methanol befreit, mit Wasser auf 15 cm³ verdünnt, mit 800 mg frisch destilliertem Benzaldehyd, sowie 20 mg Benzoesäure versetzt und unter Kohlendioxydverschluss

¹⁾ E. Fischer, K. Zach, B. 45, 3770 (1912).

²⁾ A. W. van der Haar, R. 37, 108 (1917). Dieses Derivat ist für die Abscheidung von *d*-Galaktose besonders geeignet.

1 Stunde auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Dann wurde auf 0° abgekühlt, filtriert und das Filtrat sofort mehrmals mit Äther ausgeschüttelt und im Vakuum auf 7 cm³ eingengt. Es wurde hierauf mit Kohle (die vorher mit Salzsäure und Wasser gewaschen worden war) entfärbt und die Lösung im Vakuum zur Trockne gedampft.

Jetzt wurde versucht, eventuell vorhandene *d*-Glucose als *p*-Nitro-phenylhydrazon¹⁾ abzuscheiden. Zu diesem Zweck wurde der Syrup mit der Lösung von 600 mg reinstem *p*-Nitro-phenylhydrazin in 5 cm³ Methanol 10 Minuten unter Rückfluss gekocht und dann über Nacht bei 0° stehen gelassen. Es fiel kein Glucose-derivat aus. Auch nach starkem Einengen, Impfen mit dem *p*-Nitro-phenylhydrazon von *d*-Glucose und weiterem Stehen konnte kein solches Derivat erhalten werden. Daher wurde die Lösung zunächst im Vakuum von Methanol, dann genau wie oben mit Benzaldehyd vom Nitro-phenylhydrazin befreit. Die zuletzt verbleibende wässrige Lösung musste zweimal mit gewaschener Kohle behandelt werden, um sie ganz farblos und frei von Nitroverbindungen zu erhalten.

Es wurde mit Leitungswasser auf 20 cm³ aufgefüllt, mit 2 cm³ Hefebouillon versetzt, aufgekocht, abgekühlt und mit Bäckerhefe, die zweimal über *d*-Galaktose passiert war, beimpft. Nach 4 Tagen waren etwa 31 cm³ Gas entwickelt (entsprechend ca. 124 mg Hexose). Die Lösung wurde mit 30 mg Kohle (die vorher mit Salzsäure und heissem destilliertem Wasser gewaschen worden war) behandelt und filtriert. Das Filtrat wurde im Vakuum vollständig eingedampft, der Rückstand mehrmals mit Methanol ausgezogen, wobei etwas unlöslicher Gummi zurückblieb. Die Methanollösung wurde im Vakuum eingedampft und der Rückstand mit absolutem Alkohol ausgezogen, wobei noch etwas unlösliches Material zurückblieb. Die alkoholische Lösung hinterliess beim Eindampfen im Vakuum 220 mg Syrup.

Dieser wurde mit 220 mg reinstem β -Naphthylhydrazin in 4 cm³ Methanol 5 Minuten gekocht und dann unter öfterem Durchkratzen bei 0° stehen gelassen, wobei bald reichliche Krystallisation einsetzte, die durch Stehen über Nacht bei 0° möglichst vervollständigt wurde. Hierauf wurde abgenutscht, mit etwas Alkohol, dann mit Wasser, Toluol und Äther gewaschen und im Vakuum getrocknet. Erhalten wurden 116 mg vom Smp. 189—190° korr. unter Zersetzung. Ein aus *l*-Rhamnose bereitetes Vergleichspräparat²⁾ schmolz bei 192—193° korr., die Mischprobe bei 191—193° korr. *d*-Galaktose gibt ein β -Naphthylhydrazon, das ebenfalls bei 189—190° korr.

¹⁾ W. A. van Ekenstein, J. J. Blanksma, R. 24, 33 (1905); A. Reclaire, B. 41, 3665 (1908).

²⁾ Das β -Naphthylhydrazon ist nach Van der Haar (Nachweis etc., S. 174) für den Nachweis von *l*-Rhamnose am besten geeignet.

schmilzt, die Mischprobe mit dem Derivat der *l*-Rhamnose schmolz aber schon bei 180—182° korr., gab also eine deutliche Depression.

Krystallisierte l-Rhamnose. Die 116 mg β -Naphthyl-hydrazon wurden in 5 cm³ Wasser mit 0,2 g Benzaldehyd und 10 mg Benzoesäure genau wie oben beschrieben gespalten. Die schliesslich resultierende, mit einer Spur gewaschener Kohle geklärte wässrige Lösung wurde im Vakuum zu einem farblosen Syrup eingedampft. Dieser wurde mehrmals mit frisch destilliertem Aceton warm ausgezogen, wobei eine sehr geringe Menge unlösliches Material zurückblieb. Die Acetonlösung wurde auf 2 cm³ eingengt, wobei sie sich leicht trübte. Durch Zusatz von 15 mg Wasser wurde die Trübung zum Verschwinden gebracht. Nach Impfen mit einer kaum sichtbaren Spur *l*-Rhamnose begann sofort die Abscheidung grosser, glasklarer Krystalle. Nach 2 Stunden wurde durch Dekantieren mit Aceton gewaschen. Die Mutterlaugen gaben nach Einengen in derselben Weise noch eine weitere Menge von Krystallen. Zur Reinigung wurden die Krystalle nochmals in heissem Aceton gelöst, eingengt und mit einer Spur Wasser versetzt. Es wurden 48 mg reiner Krystalle erhalten, die bei starkem Verreiben und langsamem Erhitzen bei 72—76° schmolzen. Eine Probe authentische *l*-Rhamnose schmolz unter denselben Bedingungen genau gleich, ebenso die Mischprobe. Die spez. Drehung betrug $[\alpha]_D^{18} = -3,5^{\circ}$ (nach 4 Minuten) $\rightarrow +9,0^{\circ} \pm 1^{\circ}$ (nach 2 Stunden ($c = 2$ in Wasser)). *l*-Rhamnose-hydrat gab unter denselben Bedingungen ganz dieselben Werte.

Die nach Abtrennung des *l*-Rhamnose- β -naphthyl-hydrazons verbleibende Methanollösung wurde wieder von Methanol befreit und dann wie oben mit Benzaldehyd behandelt. Die fertig gereinigte Lösung hinterliess nach dem Eindampfen und völligem Trocknen im Vakuum 118 mg Syrup. Dieser gab bei der Prüfung auf Aminozucker ein völlig negatives Resultat, der letztere ist also im Verlauf der zahlreichen Operationen verloren gegangen oder ist dabei zerstört worden. Der Syrup gab jedoch eine positive purpurrote Reaktion mit Skatol-Salzsäure bei 38—40° nach *Jordan* und *Pryde*¹⁾, wie sie besonders von Ketosen gegeben wird. (Rhamnose und Fucose geben unter denselben Bedingungen nur eine leicht rötliche Färbung.) Da die Reaktion nach *Seliwanoff* mit Resorcin-Salzsäure jedoch praktisch negativ war, so ist das Vorhandensein einer grösseren Menge unvergärbarer Ketohexose praktisch ausgeschlossen. Diese Reaktion war auch vor der Vergärung mit Hefe negativ, sodass auch grössere Mengen von *d*-Fructose kaum anwesend sein dürften.

Die Mikroanalyse wurde im mikroanalytischen Laboratorium des Instituts (Leitung Priv.-Doz. Dr. M. Furter) ausgeführt.

Organisch-chemisches Laboratorium
Eidg. Techn. Hochschule Zürich.

¹⁾ R. C. Jordan, J. Pryde, Biochem. J. **32**, 279 (1938).