

CHEMISCHE BERICHTE

Fortsetzung der

BERICHTE DER DEUTSCHEN CHEMISCHEN GESELLSCHAFT

88. Jahrg. Nr. 8

S. 1135 – 1346

161. Richard Kuhn, Hans Helmut Baer und Adeline Gauhe: Fucosido-lactose, das Trisaccharid der Frauenmilch

[Aus dem Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung Heidelberg,
Institut für Chemie]

(Eingegangen am 4. April 1955)

Herrn Prof. Dr. Otto Th. Schmidt zum 60. Geburtstag gewidmet

Die Anordnung der Bausteine ist > D-Glucose > D-Galaktose > L-Fucose. Nach partieller Säurehydrolyse ließ sich Lactose isolieren. Die Spaltung des permethylierten Trisaccharids lieferte 2,3,6-Tri-methyl-D-glucose, 3,4,6-Trimethyl-D-galaktose und 2,3,4-Trimethyl-L-fucose. Die L-Fucose ist α -glykosidisch mit dem Hydroxyl am C-Atom 2 des Galaktose-Restes im Milchzucker verknüpft.

Die von M. Polonovski und A. Lespagnol¹⁾ beschriebene „Gynolactose“ der Frauenmilch stellt ein Gemisch von reduzierenden Oligosacchariden dar. Die papierchromatographisch nachgewiesenen Komponenten haben wir zunächst durch römische Ziffern gekennzeichnet. Die Komponente IV^{2, 3)}, über deren Isolierung und Konstitutionsaufklärung diese Arbeit berichtet, hat sich als N-freies Trisaccharid erwiesen. Es liefert bei durchgreifender Hydrolyse 1 Mol. D-Glucose + 1 Mol. D-Galaktose + 1 Mol. L-Fucose. In Kuhmilch, auch in Kuh-Colostrum, konnten wir das fucosehaltige Trisaccharid mit seinem charakteristischen R_F -Wert nicht finden. Die Fucosido-lactose ist ein regelmäßiger Bestandteil der Frauenmilch, welche etwa 150–300 mg davon im Liter enthält. Sie macht etwa 10 % der gesamten Oligosaccharide (ohne Lactose) aus. Sie findet sich in der Milch, unabhängig davon, ob die stillende Mutter der Blutgruppe A, B oder 0 angehört. Da auch die Blutgruppensubstanzen L-Fucoside sind, schien uns die Prüfung dieser Frage wichtig. Die Feststellung, daß es auf die Blutgruppe der Frau, von der die Milch stammt, nicht ankommt, bezieht sich auch auf das fucose-freie Tetrasaccharid (Lacto-N-tetraose) sowie auf die fucosehaltigen Komponenten IIIa, IIIb und IIc. Wie wir noch zeigen werden, sind IIIa und IIIb Pentasaccharide, nämlich isomere L-Fucoside der Lacto-N-tetraose. IIc ist ein Hexasaccharid, in dem 2 L-Fucosen mit Lacto-N-tetraose verknüpft sind^{3a}).

¹⁾ Bull. Soc. Chim. biol. **12**, 1170 [1930]; C. R. hebdo. Acad. Sci. **192**, 1319 [1931]; M. Polonovski u. J. Montreuil, ebenda **238**, 2263 [1954]; J. Montreuil, ebenda **239**, 510 [1954].

²⁾ A. Gauhe, P. György, J. R. E. Hoover, R. Kuhn, C. S. Rose, H. W. Ruelius u. F. Zilliken, Arch. Biochem. Biophysics **48**, 214 [1954].

³⁾ R. Kuhn, A. Gauhe u. H. H. Baer, Chem. Ber. **87**, 289 [1954]; **86**, 827 [1953].

^{3a)} Vergl. Vortragsreferat R. Kuhn, Angew. Chem. **67**, 184 [1955].

In der von uns normalerweise verarbeiteten Frauenmilch, die ohne Rücksicht auf die Blutgruppenzugehörigkeit der Mütter gesammelt wurde, beträgt der Gehalt an Oligosacchariden (ohne Lactose) durchschnittlich etwa 3.0–3.3 g pro Liter. Hiervon sind nach den Ergebnissen der säulenchromatographischen Trennungen etwa

10%	Trisaccharid (Komponente IV)	R_{Lactose}	= 0.73
15%	Tetrasaccharid (Komp. IIIc)		0.36
8%	Pentasaccharid I (Komp. IIIb)		0.27
4%	Pentasaccharid II (Komp. IIIa)		0.19
7%	Hexasaccharid (Komp. IIc)		0.11
56%	höhere Saccharide		< 0.10

Die Zahl der Komponenten, deren $R_{\text{Lactose}} < 0.10$ ist, läßt sich vorerst nicht angeben. Unter den schneller wandernden Oligosacchariden finden wir regelmäßig in sehr geringen Mengen Komponenten mit den R_{Lactose} -Werten 0.66, 0.55 und 0.43. Diesbezüglich stimmen unsere Ergebnisse mit denjenigen von M. Polonovski und J. Montreuil¹⁾ weitgehend überein. Eine Zerlegung der Fucosido-lactose (2A und 2B der französischen Autoren) in 2 Komponenten ist uns jedoch chromatographisch, auch unter Verwendung von Lösungsmittelgemischen, die Phenol oder Dimethylformamid enthielten, noch nicht gelungen. Die Komponente 6 von M. Polonovski und J. Montreuil¹⁾ ist offenbar mit unserer Komponente IIIc (Lacto-N-tetraose³⁾) identisch.

Mit Hilfe von Kohle-Celite-Säulen⁴⁾ und von Cellulose-Säulen⁵⁾ haben wir die Fucosido-lactose³⁾ in chromatographisch einheitlicher Form gewonnen. Sie stellt ein weißes, kaum hygroskopisches Pulver dar, das schwach süß schmeckt und sich in Wasser sehr leicht löst. Die Lösung ist linksdrehend: $[\alpha]_D: -57^\circ$ (Wasser, ohne Mutarotation). Fehlingsche Lösung wird reduziert. Schön kristallisierende Derivate sind das Phenylosazon (Schmp. 217–218°) und das *p*-Toluolsulfonylhydrazon (Schmp. 205–206°). Das Absorptionsspektrum des Phenylosazons, dessen molare Extinktionen mit denen von Glucose-phenylosazon übereinstimmen (Abbild. 1), bestätigt das Vorliegen eines Trisaccharids durch spektralphotometrische Bestimmung des Molekulargewichts³⁾.

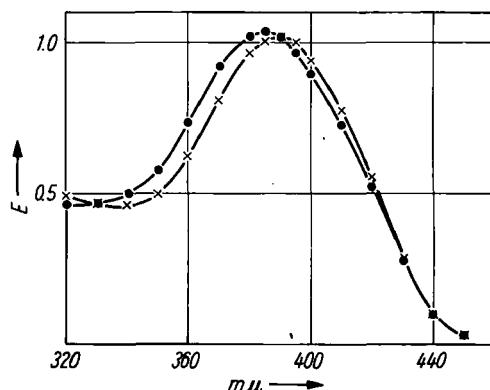
Oxydiert man mit Hypojodit, so findet man nach anschließender Säurehydrolyse keine Glucose mehr, sondern nur Galaktose und Fucose. Daraus folgt, daß die Glucose reduzierender Baustein des Trisaccharids ist. Nimmt man eine partielle Hydrolyse der Fucosido-lactose mit *n/l* Essigsäure bei 98° vor, so läßt sich durch anschließende Säulenchromatographie kristallisierte Lactose gewinnen, die nach Schmp., Misch-Schmp. und Debye-Scherrer-Aufnahmen mit gewöhnlichem Milchzucker identisch ist.

Durch verd. Säure wird die Fucose leichter abgelöst als die Bindung zwischen Glucose und Galaktose gespalten wird. Der Unterschied ist jedoch nicht so groß, daß man daraus auf das Vorliegen eines Furanosids der L-Fucose

⁴⁾ R. L. Whistler u. D. F. Durso, J. Amer. chem. Soc. **72**, 677 [1950].

⁵⁾ L. Hough, J. K. N. Jones u. W. H. Wadman, J. chem. Soc. [London] 1949, 2511.

schließen dürfte; daß es sich um ein Pyranosid handelt, wird weiter unten bewiesen. Zum Vergleich der Hydrolysengeschwindigkeiten haben wir



Abbild. 1. Äquimolare Lösungen von Fucosido-lactosazon und von Glucosazon zeigen praktisch gleich starke Extinktion (spektralphotometrische Bestimmung des Molekulargewichts der Fucosido-lactose)

Abszissen: Wellenlängen in $m\mu$

Ordinaten: Extinktionen E im Beckman DU (10-mm-Küvetten)

$\times \times \times$ 3.33 mg Fucosido-lactosazon (Mol.-Gew. 666) } je 100 ccm
 $\bullet \bullet \bullet$ 1.79 mg Glucosazon (Mol.-Gew. 358) } 98-proz. Äthanol

α -Äthyl-L-fucopyranosid synthetisiert. Schmp. 146°, $[\alpha]_D^{22} = -191^\circ$ (Wasser). Die Pyranose-Struktur wurde durch Abbau mit Perjodsäure (Verbrauch von 2 Moll.) bewiesen.

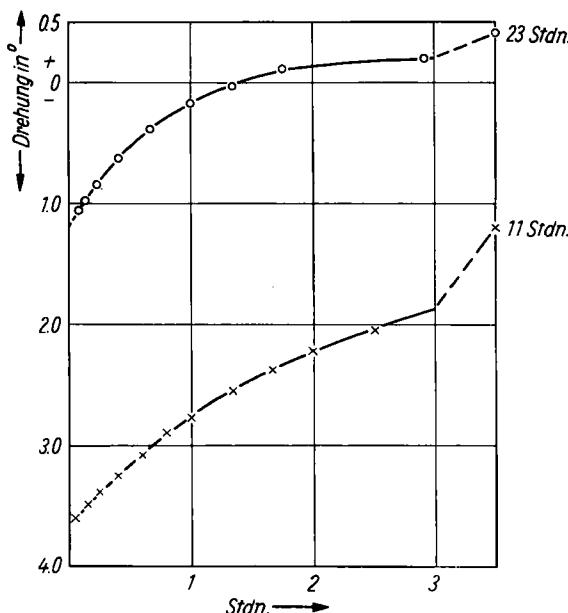
Aus den Mutterlaugen des α -Fucosids haben wir das β -Äthyl-L-fucosid in Form seiner Molekülverbindung mit Kaliumacetat⁶⁾ gewonnen.

In Abbild. 2 sind nach polarimetrischen Messungen die Spaltungsgeschwindigkeiten der Fucosido-lactose aus Frauenmilch und des α -Äthyl-L-fucopyranosids vergleichend dargestellt.

Es ergibt sich, daß unter den eingehaltenen Bedingungen die Halbwertszeit der gesamten Drehungsänderung für die Fucosido-lactose 40 Min. und für das synthetische Äthylfucosid 100 Min. beträgt.

Zerstört man den Glucoserest durch Erhitzen der Fucosido-lactose mit 0.025 n Na_2CO_3 (5 Min., 98°), so findet man papierchromatographisch ein Disaccharid, dessen Hydrolyse Galaktose + Fucose liefert. Dies war der erste Hinweis dafür, daß die Fucose mit dem Galaktoserest des Milchzuckers verknüpft ist. Den Ort der Verknüpfung haben wir durch Permethylierung des Trisaccharids und anschließende Spaltung ermittelt. Als Spaltstücke erhielten wir: 2.3.4-Trimethyl-L-fucose, die mit einem Vergleichspräparat von O. Th. Schmidt⁷⁾ im R_F -Wert übereinstimmte bzw. α -Methyl-2.3.4-tri-

⁶⁾ A. J. Watters, R. C. Hockett u. C. S. Hudson, J. Amer. chem. Soc. 56, 2199 [1934]; R. C. Hockett, F. P. Phelps u. C. S. Hudson, ebenda 61, 1658 [1939].



Abbild. 2. Drehungsänderung bei der Hydrolyse von
 o—o—o 100.3 mg Fucosido-lactose (Mol.-Gew. 488)
 x—x—x 99.6 mg α -Äthyl-L-fucopyranosid (Mol.-Gew. 192)
 in je 5 ccm $n/1\text{ H}_2\text{SO}_4$ bei 70° .
 Abszissen: Zeit in Std.
 Ordinaten: Drehungswinkel im 1-dm-Rohr

methyl-L-fucopyranosid, das mit einem synthetischen Präparat⁷⁾ identifiziert wurde:

Substanz	$[\alpha]_D$	Schmp.	Mischprobe
synthetisch	$-209^\circ \pm 1^\circ$	99°	
aus Frauenmilch	-209°	99°	99°

Die erhaltene 2.3.6-Trimethyl-D-glucose war nach Schmp. und Misch-Schmp., röntgenographisch und papierchromatographisch sowie nach dem Drehungsvermögen identisch mit einem aus reiner Oktamethyl-lactose hergestellten Vergleichspräparat⁸⁾.

Auch die erwartete Trimethyl-galaktose haben wir kristallisiert (Schmp. 88–89°) erhalten: $[\alpha]_D^{25} : +154^\circ \rightarrow +110^\circ (\text{H}_2\text{O})$. Diese Daten paßten auf keine der in der Literatur⁹⁾ beschriebenen Trimethyl-galaktosen. Papierchromatographische Vergleiche erwiesen die Verschiedenheit von 2.3.4-, 2.3.6- und 2.4.6-Trimethyl-galaktose. Da wir Lactose aus dem Trisaccharid kristallisiert erhalten hatten und somit Furanose-Struktur des Galaktoserestes ausschließen konnten, blieb nur 3.4.6-Trimethyl-D-galaktose übrig. In Übereinstim-

⁷⁾ O. Th. Schmidt, W. Mayer u. A. Distelmaier, Liebigs Ann. Chem. 555, 26 [1943]. ⁸⁾ E. J. Bourne u. S. Peat, Advances Carbohydrate Chem. 5, 176 [1950].

⁹⁾ D. J. Bell, Advances Carbohydrate Chem. 6, 11 [1951].

mung mit dieser Schlußfolgerung gab die aus Frauenmilch gewonnene Substanz ein schön kristallisierendes Osazon (Schmp. 130–131°), das noch 3 Methylgruppen enthält. Aber der Trimethylzucker und das daraus gewonnene Lacton differierten in ihren Konstanten außerordentlich von den Angaben, die P. A. Levene und G. M. Meyer¹⁰⁾ für 3.4.6-Trimethyl-galaktose gemacht haben.

Substanz	Levene u. Meyer	Eigene $[\alpha]_D$ -Werte
3.4.6-Trimethyl-galaktose	– 4.3°	+110°
3.4.6-Trimethyl-galaktonsäure-lacton	+46.8°	+151°
3.4.6-Trimethyl-galaktonsäure	+ 2.5°	+ 1°
Säure-Lacton-Gleichgewicht	+20°	+ 7°

Unser Trimethylzucker gab mit Brom und Calciumcarbonat eine schön kristallisierende, sehr beständige Trimethyl-galaktonsäure (Schmp. 129°). Das daraus erst bei hoher Temperatur erhältliche Lacton ging in wässriger Lösung rasch und nahezu vollständig, wie es für δ-Lactone charakteristisch ist¹¹⁾, wieder in die Säure über (Abbild. 3).

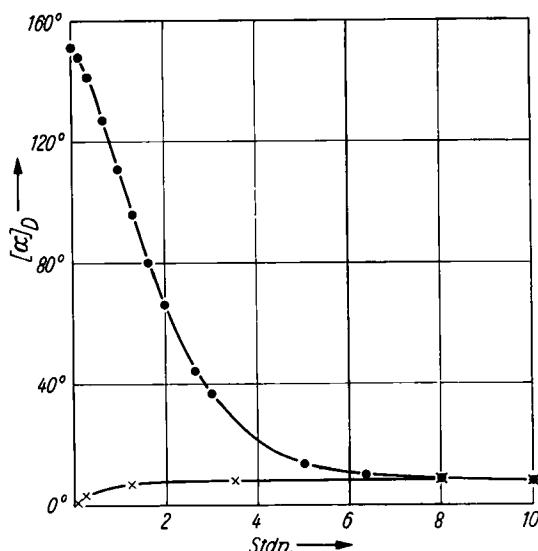


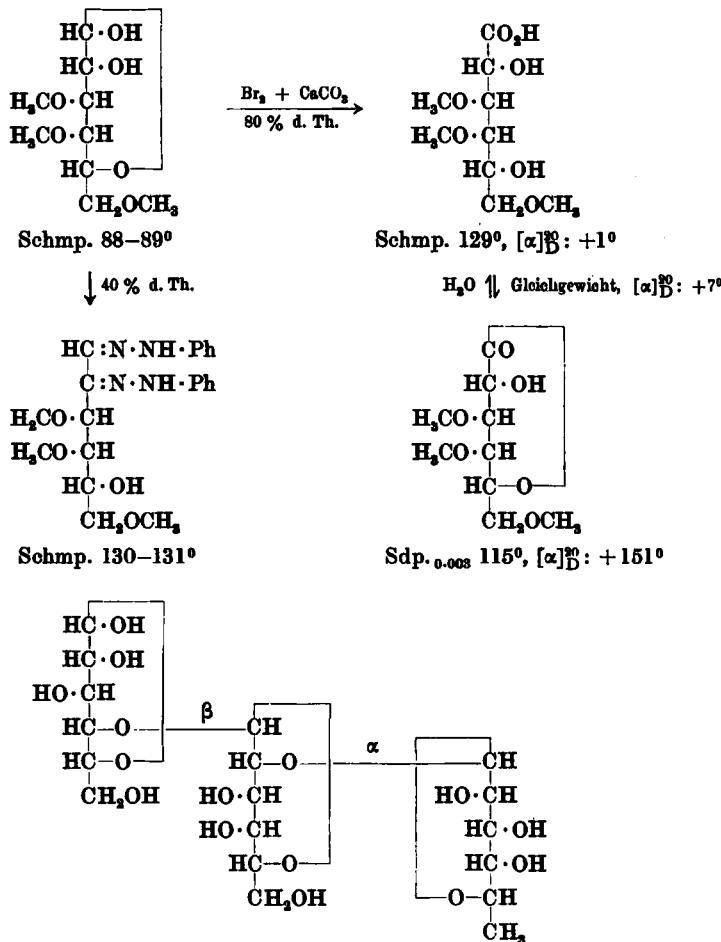
Abbildung. 3. Gleichgewichtseinstellung zwischen 3.4.6-Trimethyl-D-galaktonsäure (x-x-x) und ihrem Lacton (δ-Lacton, ••••) in wässriger Lösung bei 20°

Diese Beobachtungen, zusammen mit der Osazonbildung, ließen keinen Zweifel mehr, daß wir 3.4.6-Trimethyl-D-galaktose in Händen hatten. Die

¹⁰⁾ J. biol. Chemistry 92, 257 [1931].

¹¹⁾ W. N. Haworth, Die Konstitution der Kohlenhydrate, S. 25, T. Steinkopf, Leipzig 1932.

Synthese der 3,4,6-Trimethyl-D-galaktose aus Trimethyl-D-galaktal¹²⁾ hat den hier erbrachten Konstitutionsbeweis bestätigt. Dieser stellt sich wie folgt dar:



Die Fucosido-lactose hat somit die vorstehende Konstitution. Sie ist als α -L-Fucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glucopyranose zu bezeichnen.

Beziffert man im Milchzucker die C-Atome der Glucose mit 1 bis 6 und diejenigen der Galaktose mit 1' bis 6', dann kann das aus Frauenmilch isolierte Trisaccharid auch 2'- α -L-Fucopyranosyl-lactose benannt werden.

Die starke Linksdrehung ($[\alpha]_D^{20} : -570^\circ$), verglichen mit der etwa gleich starken Rechtsdrehung der α,β -Lactose ($[\alpha]_D^{20} : +54.3^\circ$) zeigt eindeutig¹³⁾, daß die L-Fucose α -glykosidisch verknüpft ist. Hierzu muß bemerkt werden,

¹²⁾ Vergl. eine folgende Mitteilung.

¹³⁾ α -Methyl-L-fucosid: $[\alpha]_D = -197.5^\circ$ (H_2O), β -Methyl-L-fucosid: $[\alpha]_D = +16.4^\circ$ (H_2O). J. Minas. Recueil Trav. chim. Pays-Bas 51, 475 [1932].

daß definitionsgemäß¹⁴⁾ die α -L-Glucose ($[\alpha]_D^{20} : -113^\circ \rightarrow -52.5^\circ$) das Spiegelbild der α -D-Glucose ($[\alpha]_D^{20} : +113^\circ \rightarrow +52.5^\circ$) ist. Diese Feststellung ist notwendig, weil immer wieder, auch in Lehrbüchern, eine andere Benützung der Präfixe α - und β - für die Zucker der L-Reihe zu finden ist. Die im Sinne der gegebenen Definition gemachte Feststellung, daß das Trisaccharid der Frauenmilch ein α -L-Fucosid der Lactose ist, fügt sich anderweitigen Erfahrungen über natürlich vorkommende Glykoside, an deren Aufbau Zucker der L-Reihe beteiligt sind, bemerkenswert gut an. So ist auch die L-Rhamnose im Solanin α -glykosidisch gebunden¹⁵⁾, und dasselbe gilt für das N-Methyl-L-glucosamin im Streptomycin¹⁶⁾. Daß im Fucoidin die Reste der L-Fucose α -glykosidisch verknüpft sind, haben J. Conchie und E. G. V. Percival¹⁷⁾ sowie A. N. O'Neill¹⁸⁾ gezeigt. Offenbar handelt es sich um ein mehrfach zu erkennendes Aufbauprinzip der Natur. Eine Betrachtung der Atommodelle bzw. Strukturformeln ergibt, daß α -L- und β -D-glykosidische Bindungen – hinsichtlich der sterischen Verhältnisse am C-Atom 1 – gleichgerichtet sind¹⁴⁾.

Hrn. Prof. Dr. Otto Th. Schmidt haben wir für die freundliche Überlassung von methylierten Derivaten der D- und L-Fucose, den Herren Prof. Dr. E. L. Hirst, Edinburgh, und Prof. Dr. J. K. N. Jones, Ottawa, für Proben von methylierten Galaktosen zu danken. Den Fr. A. Seeliger und D. Tschampel sowie Hrn. W. Dafeldecker danken wir für eifrige präparative Unterstützung und Hrn. E. Röhm für die Debye-Scherrer-Aufnahmen.

Beschreibung der Versuche

Fucosido-lactose: Die Anreicherung der Fucosido-lactose aus dem Oligosaccharidgemisch der Frauenmilch erfolgte mit Hilfe von Kohle-Celite-Säulen. Dabei folgte das Trisaccharid auf die Lactose bei 10% Äthanol. Es wurde vor allem vom Hexasaccharid (Lacto-N-difucohexaose, Komponente IIc) und von dem Morgan-Elson-negativen Penta-saccharid (Lacto-N-fucopentaose II, Komponente IIIa) begleitet. Zur Abtrennung dieser Begleiter dienten Cellulose-Säulen, die mit n-Butanol : Pyridin : Wasser = 6:1:1¹⁹⁾ entwickelt wurden. Hierbei erscheint zuerst nur das Trisaccharid im Eluat, von dem wir eingengte Proben laufend papierchromatographisch kontrollierten. Nach Beendigung der Elution des Trisaccharids zerlegten wir zur Gewinnung der höheren Oligosaccharide die vorsichtig aus dem Rohr gepreßte und getrocknete Cellulose-Säule in kleinere Teile, die wir gesondert mit Wasser extrahierten.

Auf Schleicher & Schüll-Papier Nr. 2043b beträgt der R_{Lactose} -Wert der Fucosido-lactose 0.73. (Essigester : Pyridin : Wasser = 2:1:2, obere Schicht²⁰⁾).

Zur Analyse wurde das chromatographisch einheitliche Trisaccharid 6 Stdn. bei 78° getrocknet.

$[\alpha]_D^{20} : -57^\circ$ ($c = 1.6$ in Wasser, ohne Mutarotation) für Präparate verschiedener Herstellung.

$C_{18}H_{32}O_{15}$ (488.4) Ber. C 44.25 H 6.60 (C)CH₃ 3.07 Gef. C 44.38 H 6.93 (C)CH₃ 3.25

Fucosido-lactose-phenylosazon: 1 g Trisaccharid + 3 g Phenylhydrazin-hydrochlorid + 7.5 g Natriumacetat · 3H₂O + 35 ccm Wasser lieferten nach 2stdg. Erhitzen im Dampfbad – die heiße Lösung wurde mit etwas Carboraffin geklärt – ein Osazon, das

¹⁴⁾ C. S. Hudson, J. Amer. chem. Soc. **31**, 66 [1909]; Advances Carbohydrate Chem. **3**, 15 [1948]. ¹⁵⁾ R. Kuhn u. I. Löw, Angew. Chem. **66**, 639 [1954].

¹⁶⁾ M. L. Wolfrom, M. J. Cron, C. W. De Walt u. R. M. Husband, J. Amer. chem. Soc. **76**, 3675 [1954]. ¹⁷⁾ J. chem. Soc. [London] 1950, 827.

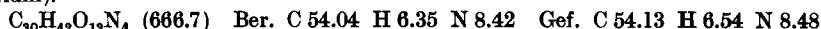
¹⁸⁾ J. Amer. chem. Soc. **76**, 5074 [1954].

¹⁹⁾ P. Bächli u. E. G. V. Percival, J. chem. Soc. [London] 1952, 1243.

²⁰⁾ M. A. Jermyn u. F. A. Isherwood, Biochem. J. **44**, 402 [1949].

sich erst beim Erkalten in feinen gelben Nadeln abschied. Die mit Eiswasser, kaltem Alkohol und wenig Äther gewaschene Substanz wog 541 mg (40% d.Th.). Zur Analyse wurde bei 100° (1 Torr) getrocknet. Schmp. 217–218° (Zers.).

$[\alpha]_D^{25} : -13.3^\circ$ (5 Min.) → -18° (150 Min.) → -27° (30 Stdn.) → -29° (48 Stdn., $c = 1$, Pyridin).



Das Osazon ist ziemlich leicht in heißem Wasser, aber nur sehr wenig in heißem absolutem Äthanol löslich. Aus 94-proz. Äthanol lässt es sich leicht umkristallisieren.

Fucosido-lactose-tosylhydrazone: 1 g Trisaccharid wurde in 1 ccm warmem Wasser gelöst und mit 20 ccm warmem Methanol versetzt. Dazu gaben wir eine Lösung von 0.40 g *p*-Toluolsulfonsäure-hydrazen²¹⁾ in 20 ccm Acetonitril²²⁾. Im verschlossenen Rohr wurde 45 Min. auf 95° erhitzt. Bei 4° schieden sich 0.49 g farblose Rosetten feiner Nadeln ab, die mit kaltem Methanol/Acetonitril-Gemisch gewaschen wurden. Auf Zusatz von Äther lieferte die Mutterlauge weitere 0.17 g (insgesamt 50% d.Th.). Zur Analyse haben wir zuerst aus 80-proz., danach noch 1- bis 2 mal aus 90-proz. *n*-Propanol umkristallisiert. Bei langsamem Abkühlen erhält man lange Nadeln vom Schmp. 205 bis 206° (Zers.), während sich bei raschem Abkühlen gelegentlich ein Gel bildet. Das Hydrazone ist schwer löslich in kaltem Wasser und in heißen Alkoholen. Trockenes Dimethylformamid und trockenes Pyridin lösen nur in der Hitze gut, im Gemisch mit Wasser schon in der Kälte.

$[\alpha]_D^{25} : -74^\circ$ (10 Min.) → -73° (1 und 20 Stdn., $c = 0.93$, in Pyridin/Wasser = 1:1).
 $\text{C}_{25}\text{H}_{40}\text{O}_{16}\text{N}_2\text{S} \quad (656.7) \quad \text{Ber. C } 45.72 \text{ H } 6.14 \text{ N } 4.27 \quad \text{Gef. C } 45.89 \text{ H } 6.08 \text{ N } 4.50$

Saure Totalhydrolyse der Fucosido-lactose

1. Papierchromatographische Untersuchung: 10 mg Fucosido-lactose wurden mit 2 ccm *n*/1 H₂SO₄ in verschlossener Ampulle 4 Stdn. bei 98° hydrolysiert. Nach Neutralisation mit Barytwasser verdampften wir die abzentrifugierte Lösung i. Vak. und nahmen den Rückstand zur Papierchromatographie in 0.2 ccm Wasser auf. Man sah mit Anilin-hydrogenphthalat gleich starke Flecken von Fucose, Glucose und Galaktose.

2. Polarimetrische Untersuchung (Abbild. 2): Wir lösten 100.3 mg Fucosido-lactose in 5 ccm *n*/1 H₂SO₄ und verfolgten die Drehungsänderung bei 70° in einem 1-dm-Rohr mit Heizmantel. Der nach 23 Stdn. erreichte konstante Endwert war $[\alpha]_D : +0.40^\circ$ (bei 70°) bzw. $+0.45^\circ$ (nach Abkühlen auf 20°). Für ein aus der Lösung des Trisaccharids durch Totalhydrolyse entstandenes Gemisch aus L-Fucose, D-Glucose und D-Galaktose ergibt sich theoretisch eine Gleichgewichtsdrehung von $[\alpha]_D : +0.47^\circ$ (in Wasser bei 20°). Die Halbwertszeit der Hydrolyse betrug etwa 40 Minuten.

Lactose aus Fucosido-lactose

250 mg Fucosido-lactose wurden in 25 ccm *n*/1 Essigsäure gelöst und 2 Stdn. bei 98° hydrolysiert. Anschließend wurde die Essigsäure i. Vak. unter mehrfachem Zusatz von Toluol entfernt (Badtemperatur 30–35°). Das so erhaltene Zuckergemisch trennten wir auf einer 50 cm langen Säule aus 120 g Cellulose-Pulver, die mit *n*-Butanol-Pyridin-Wasser = 6:1:1 vorgewaschen war. Entwickelt wurde mit 2000 ccm desselben Lösungsmittelgemisches. Diese genügten zur Elution der abgespaltenen L-Fucose, während Lactose und unveränderte Fucosido-lactose in gut getrennten Zonen auf der Säule verblieben. Durch Zerlegung der Säule in 25 Abschnitte und gesonderte Extraktion derselben mit Wasser erhielten wir aus den unteren Abschnitten lactose-haltige Extrakte, die beim Eindampfen 54 mg rohe Lactose lieferten. Aus den oberen Teilen der Säule konnten wir 125 mg unverändertes Trisaccharid zurückgewinnen. Die Lactose reinigten wir durch Behandeln ihrer wäßr. Lösung mit Tierkohle und Talkum und Umkristallisieren unter Zusatz von Äthanol. Sie bildete derbe Prismen, die das gleiche Röntgenogramm wie authent. α -Lactose-hydrat gaben. Schmp. und Misch-Schmp. 201° (zugeschmolzenes Röhrchen).

²¹⁾ K. Freudenberg u. F. Blümmel, Liebigs Ann. Chem. 440, 24 [1924].

²²⁾ Vergl. die Arbeitsweise von O. Westphal u. Mitarbb., Biochem. Z. 326, 139 [1954].

Alkalischer Abbau der Fucosido-lactose

50 mg Fucosido-lactose in 9.5 ccm Wasser wurden bei 98° mit 0.5 ccm 0.5 n Na₂CO₃ versetzt. Nach 5 Min. wurde die Lösung abgekühlt und mit Amberlite IR-120 und IR-45 entsalzt. Filtrat und Waschwasser wurden vereinigt i. Vak. auf ein kleines Volumen gebracht. Ein Probechromatogramm²⁰⁾ zeigte 4 Komponenten A, B, C und D (Tafel). Die Hauptmenge chromatographierten wir auf einem großen Bogen. Die ausgeschnittenen Zonen der Komponenten A, B und C wurden einzeln mit warmem Wasser eluiert. Nach Eindampfen i. Vak. hydrolysierten wir die Komponenten A und B 4 Stdn., C nur 1 Stde. bei 98° mit je 6 ccm n/1 H₂SO₄. Danach entfernten wir die Schwefelsäure mit der ber. Menge Bariumhydroxyd-Lösung und chromatographierten die eingeeengten Hydrolysate. Auf Grund der gefundenen Hydrolysenprodukte ergab sich, daß A als unveränderte Fucosido-lactose, B als Fucosido-lactulose und C als Fucosido-galaktose anzusehen sind. D wurde der geringen Menge wegen nicht weiter untersucht.

Tafel

Komponente	R _{Lactose}	Anilin-phthalat	Naphtho-resorcin	Hydrolysenprodukte
A	0.73	+	blau	Fucose, Galaktose, Glucose
B	0.94	+	rot	Fucose, Galaktose, Fructose
C	1.53	+	blau	Fucose, Galaktose
D	1.88	Spur	(blau)	

Hypoioditoxydation²³⁾ der Fucosido-lactose

Eine Lösung von 30 mg Fucosido-lactose in 0.30 ccm Wasser + 0.70 ccm Methanol (p. a.) versetzten wir mit 0.30 ccm einer Lösung von 0.57 g Jod + 0.50 g BaJ₂·2H₂O in 10 ccm Methanol. Im Verlauf von 15 Min. wurden unter kräftigem Umschwenken 1.20 ccm 4-proz. methanolische KOH zugetropft. Nach weiteren 20 Min. zentrifugierten wir den gebildeten Niederschlag des Bariumsalzes ab und wuschen ihn 6mal mit je 5 ccm Methanol. Er wog trocken 33 mg und war frei von reduzierendem Zucker. Nach Hydrolyse mit n/1 H₂SO₄ (vgl. oben) fanden wir auf dem Papierchromatogramm Fucose und Galaktose, aber keine Spur von Glucose.

Die Spaltstücke der Dekamethyl-Verbindung

Permethylierung der Fucosido-lactose: 3 g Trisaccharid (chromatographisch einheitlich) wurden in 45 ccm Wasser gelöst und mit 45 ccm Dimethylsulfat versetzt. Dazu gaben wir bei 0° im Laufe von 8 Stdn. tropfenweise 67 ccm Natronlauge (40-gew.-proz.) unter kräftigem Röhren. Anschließend wurde weitere 15 Stdn. bei 0° gerührt. Dann gaben wir 75 g Natriumhydroxyd zu und ließen im Laufe von 8 Stdn. bei 0° 110 ccm Dimethylsulfat zutropfen²⁴⁾. Im Laufe dieser Zeit schieden sich soviel Salze aus, daß allmählich mit insgesamt 50 ccm Wasser verdünnt werden mußte, um das Röhren wirksam zu erhalten. Dieses ging nach Beendigung des Zutropfens 15 Stdn. bei 0° weiter.

5maliges Ausschütteln mit je 200 ccm Chloroform lieferte, nach Trocknung der Chloroformauszüge mit Kaliumcarbonat, einen Sirup (4.0 g exsiccator-trocken) mit 47.31% (ber. 49.30%) Methoxyl. Diesen haben wir 2 mal mit je 45 ccm Methyljodid und 17 g Silberoxyd durch 5stdg. Kochen unter Rückfluß nachmethyliert. Der abzentri-fugierte silberjodidhaltige Schlamm wurde jeweils mit Aceton ausgezogen. Nach dem Verjagen von Methyljodid und Aceton i. Vak. wurde in Wasser aufgenommen, mit etwas

²³⁾ Vergl. die Arbeitsweise von S. Moore u. K. P. Link, J. biol. Chemistry 188, 293 [1940].

²⁴⁾ Vergl. die Arbeitsweise von R. L. Whistler u. H. E. Conrad, J. Amer. chem. Soc. 76, 1673 [1954].

Tierkohle geklärt und unter mehrfacher Zugabe von absol. Methanol wiederholt zur Trockne gebracht. Eine Probe des so gewonnenen, nahezu farblosen, sirupartigen permethylierten Trisaccharids zeigte nach saurer Hydrolyse bei papierchromatographischer Prüfung nur 3 Flecken mit den R_F -Werten 0.52 (3.4.6-Trimethyl-galaktose), 0.65 (2.3.6-Trimethyl-glucose) und 0.69 (2.3.4-Trimethyl-fucose) in *n*-Butanol: Äthanol: Wasser = 4:1:5²⁵⁾ ohne NH₃.

Methanolyse und Identifizierung des α -Methyl-2.3.4-trimethyl-L-fucopyranosids: Die permethylierte Fucosido-lactose haben wir mit 150 ccm trockenem Methanol, das 4% HCl enthielt, 6 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Nach Neutralisation mit Silbercarbonat wurde verdampft und der Rückstand (4.0 g) unter 1 Torr destilliert. Dabei ging zwischen 100° und 110° (Badtemp. 150–165°) ein größtenteils schnell kristallisierendes, schwach gelbstichiges Öl über. Durch Lösen in sehr wenig Benzol und Zugabe von Benzin (Sdp. 70–80°) ließ sich die Substanz von öligen Anteilen befreien und durch zweimalige Kristallisation aus Petroläther (Sdp. 40–50°) in derben farblosen rhombenförmigen Prismen vom Schmp. 98° gewinnen (250 mg; bei sehr langsamem Ein-dunsten der Petrolätherlösung erhielten wir zentimeterlange Prismen). Nach Sublimation i. Hochvak. lag der Schmp. bei 99°. $[\alpha]_D^{21} : -209^\circ$ ($c = 1$ in Wasser). Auch ein aus L-Fucose nach O. Th. Schmidt gewonnenes Präparat schmolz nach Sublimation i. Hochvak. bei 99°. Mischprobe ohne Depression. Die Debye-Scherrer-Aufnahmen stimmten überein.



Hydrolyse und Trennung der methylierten Zucker: Bei der Destillation des durch Methanolyse gewonnenen Gemisches von Methylglykosiden folgte unter 1 Torr auf das eben beschriebene Methylfucosid (100–110°, Badtemp. 150–165°) die Hauptfraktion (Badtemp. bis 200°), die noch fucosidhaltig war. Der dunkle Destillationsrückstand erwies sich als frei von Fucosiden, enthielt aber noch geringe Mengen methylierter Glu-cose und Galaktose. Er wurde mit 20 ccm heißem Wasser ausgelaugt. Dieser Auszug wurde mit der in 50 ccm Wasser gelösten Hauptfraktion vereinigt, mit soviel Schwefelsäure versetzt, daß die Lösung *n*/1 war und 3 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Die mit Barytwasser neutralisierte Lösung haben wir auf wenige ccm eingeeengt und mit soviel Cellulose-Pulver²⁴⁾ angerührt, daß eine krümelige Masse entstand, die im Exsiccator getrocknet wurde. Die zur Trennung benützte Cellulose-Säule^{25, 26)} war 115 cm lang und hatte einen Durchmesser von 28 mm. Sie wurde mit *n*-Butanol: Benzin (Sdp. 100–120°): Wasser = 38:60:2 vorgewaschen. Dann brachte man das Cellulose-Adsorbat der methylierten Zucker auf und entwickelte mit demselben Lösungsmittelgemisch.

Fraktion	ccm	Gewicht (mg)	Substanz
A	740	~0	
	230	200	2.3.4-Trimethyl-fucose
	115	~0	
B	500	481	2.3.6-Trimethyl-glucose
	350	~0	
C	1750	625	3.4.6-Trimethyl-galaktose

Die aus der Säule gewonnene 2.3.4-Trimethyl-fucose (Fraktion A, gef. OCH₃ = 44.10%, ber. 45.10%) ließ sich unter etwa 10⁻³ Torr destillieren (Badtemp. 50–55°) und lieferte ein Anilid in derben Prismen vom Schmp. 133–134°. Lit.²⁷⁾: 133–134°.



²⁵⁾ E. L. Hirst, L. Hough u. J. K. N. Jones, J. chem. Soc. [London] 1949, 928.

²⁶⁾ Schleicher & Schüll Nr. 123a, mit Wasser, *n*-Butanol und Aceton gewaschen und an der Luft getrocknet.

²⁷⁾ S. P. James u. F. Smith, J. chem. Soc. [London] 1944, 746.

2.3.6-Trimethyl-glucose: Die Fraktion B (R_F 0.65) kristallisierte sofort beim Eindampfen der Lösung i. Vak. (481 mg). Zweimalige Kristallisation aus Chloroform-Petroläther lieferte farblose Nadeln vom Schmp. 114–115°. Ein aus Oktamethyl-lactose²⁸⁾ hergestelltes Präparat schmolz gleichfalls bei 114–115°. Die Mischprobe zeigte keine Depression. Die Debye-Scherrer-Aufnahmen waren identisch.

$[\alpha]_D^{21}$: +96.8° (4 Min.) → +68.4° (16 Std., Endwert, $c = 1$, in Wasser). Lit.²⁸⁾: $[\alpha]_D$: +70.5° (Endwert in Wasser).



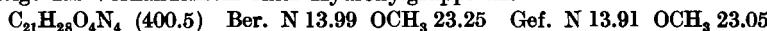
3.4.6-Trimethyl-galaktose: Die Fraktion C (R_F 0.52) lieferte nach dem Ver dampfen i. Vak. einen farblosen Sirup (626 mg). Wir nahmen in 10 ccm Wasser auf, filtrierten durch Talkum und ließen im Exsiccator über $\text{P}_2\text{O}_5/\text{KOH}$ eindunsten. Dabei trat nach einigen Wochen Kristallisation ein. Umkristallisiert wird am besten aus wenig heißem Tetrachlorkohlenstoff. Aus *n*-Butanol/*n*-Butylacetat erhält man die 3.4.6-Trimethyl-galaktose in mm-langen Nadeln. Schmp. 88–89°. In Wasser und in den meisten organischen Lösungsmitteln, mit Ausnahme von Petroläther, ist die Substanz sehr leicht löslich. Zur Analyse wurde 36 Std. bei 56°/2 Torr über Diphosphorpentoxid getrocknet.

$[\alpha]_D^{21}$: +154° (3 Min.) → +110° (Endwert nach 4 Std., $c = 1$, in Wasser).



3.4.6-Trimethyl-galaktose-phenylosazon: 150 mg Trimethyl-galaktose in 6 ccm Wasser gaben nach 1½ stdg. Erhitzen im Dampfbad mit 750 mg Phenylhydrazinhydrochlorid + 750 mg Natriumacetat · 3 H_2O 128 mg Osazon, das sich schon in der Hitze abzuscheiden begann. Aus 50-proz. Äthanol erhielten wir hellgelbe büschelig angeordnete feine Nadeln vom Schmp. 130–131°. Zur Analyse wurde 12 Std. bei 80° unter 0.3 Torr über Diphosphorpentoxid getrocknet.

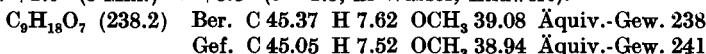
$[\alpha]_D^{21}$: +85° ($c = 0.5$ in Pyridin), ohne Mutarotation. Das Infrarot-Spektrum des Ossazons zeigt das Vorhandensein einer Hydroxylgruppe an.



3.4.6-Trimethyl-galaktosäure: 250 mg Trimethyl-galaktose wurden in 9 ccm Wasser gelöst und mit 1 g Calciumcarbonat (gefällt) + 0.07 ccm Brom (1.2 Moll.) versetzt. Unter gelegentlichem Umschwenken ließen wir 20 Std. bei etwa 20° im Dunkeln stehen. Das Calciumcarbonat wurde abzentrifugiert und 2 mal mit Wasser gewaschen. Fehlingsche Lösung wurde kaum mehr reduziert.

Die in Lösung befindlichen Calcium- und Brom-Ionen haben wir durch Schütteln mit Silbercarbonat (Abscheidung von CaCO_3 und von AgBr) entfernt und die neutral reagierende Lösung, die nunmehr das Silbersalz der 3.4.6-Trimethyl-galaktosäure enthielt, mit dem Kationenaustauscher Amberlite IR 120 (H^+) geschüttelt. Dabei wurde die Lösung sauer ($p_{\text{H}} 3$). Durch Eindampfen i. Vak. erhielten wir einen in derben Prismen kristallisierenden Rückstand (212 mg, 80% d.Th.). Die Substanz – wir hatten damit gerechnet, ein Lacton zu erhalten – erwies sich entgegen der Erwartung als schwer löslich in Äther. Aus viel siedendem Äther erhielten wir farblose Prismen vom Schmp. 128°. Nach Sublimation i. Hochvak. (10^{-3} Torr) lag der Schmp. bei 129°.

$[\alpha]_D^{20}$: +1.0° (5 Min.) → +8.3° ($c = 1.5$, in Wasser, Endwert).

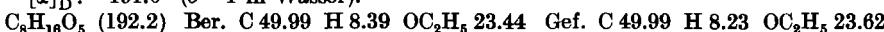


3.4.6-Trimethyl-galaktosäure-lacton: 70 mg Trimethyl-galaktosäure wurden im Kugelrohr auf 130° erhitzt (2° über den Schmp.). Nach Evakuierung auf 0.5 Torr ging ein farbloses Öl über, das wir unter 10^{-3} Torr 2 mal redestilliert haben (Badtemperatur 115°). $[\alpha]_D^{20}$: +151° ($t = 0$) → +7.2° ($c = 2$ in Wasser, Endwert nach 11 Std.). Die frisch bereitete Lösung des Lactons in Wasser reagiert auf Indikatorpapier neutral. Schon nach wenigen Minuten reagiert die Lösung sauer.

²⁸⁾ J. C. Irvine u. E. L. Hirst, J. chem. Soc. [London] 121, 1213 [1922].

α -Äthyl-L-fucopyranosid: 2.000 g L-Fucose wurden mit 100 ccm heißen absoluten Äthanol, welches 1% Chlorwasserstoff enthielt, übergossen und 2 Stdn. unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Von Zeit zu Zeit entnahmen wir Proben zur Drehungsmessung. Die Drehung sank von -0.68° (5 Min.) auf den Endwert -3.37° (1.5 Stdn., 2-dm-Rohr). Die mit Silbercarbonat neutralisierte Lösung ergab beim Verdampfen i. Vak. ein kristallines α,β -Fucosid-Gemisch, welches in der eben notwendigen Menge heißen Essigesters aufgenommen wurde. Hieraus schieden sich beim Erkalten lange Nadeln ab, welche nach mehrstündigem Stehenlassen (0°) abgesaugt und mit wenig kaltem Essigester gewaschen wurden; 960 mg, etwa 90-proz. an α -Verbindung. Durch 3 maliges Umkristallisieren aus Essigester erhielten wir das reine α -Fucosid vom Schmp. 146° .

$$[\alpha]_D^{25} = -191.0^\circ \quad (c = 1 \text{ in Wasser}).$$



Aus einem 15-g-Ansatz, bei dem wir die Neutralisation statt mit Ag_2CO_3 mit Ionenaustauscher Amberlite IR-45 vornahmen, erhielten wir 5.60 g 3 mal umkristallisiertes α -Fucosid vom Schmp. 145° .

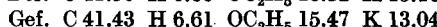
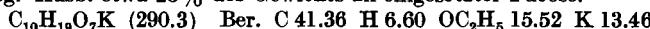
38.5 mg Substanz (0.2 mMol) wurden in der früher beschriebenen Weise³⁾ mit Natriumperjodat oxydiert. Die Titration ergab einen molaren Verbrauch von 1.60 (0.5 Stdn.), 1.77 (4 Stdn.) und 2.05 (20, 45 und 90 Stdn.).

Zur Hydrolyse lösten wir 59.8 mg α -Äthyl-L-fucopyranosid in 3 ccm $n/1 H_2SO_4$ und verfolgten die Drehungsänderung im 1-dm-Rohr bei 70° (Abbild. 2). Der nach 11 Stdn. erreichte konstante Endwert war $[\alpha]_D$: -1.20° (bei 70°) bzw. -1.29° (nach Abkühlen auf 20°).

$$\text{Berechneter Endwert: } \frac{-75.9 \cdot 59.8 \cdot 164}{3 \cdot 192} = -1.29^\circ.$$

Die Halbwertzeit betrug etwa 100 Min. (70°).

β -Äthyl-L-fucopyranosid-Kaliumacetat-Verbindung: Die Essigester-Mutterlauge des α -Fucosids, die man, ausgehend von 2 Tln. L-Fucose, erhalten hatte, wurde i. Vak. zum Sirup eingedampft. Man löste in 6 Tln. absoluten Äthanol und versetzte mit einer heißen Lösung von 1 Tl. Kaliumacetat in ebenfalls 6 Tln. absoluten Äthanol. Beim Abkühlen erfolgte rasche Kristallisation der Kaliumacetat-Verbindung in seidigen Nadeln vom Schmp. 219° (Zers.), der nach Umkristallisation aus wenig absolutem Äthanol auf 220 bis 221° stieg. Ausb. etwa 25% des Gewichts an eingesetzter Fucose.



Die spezif. Drehung beträgt $[\alpha]_D^{25}$: $+13.9^\circ$ ($c = 2.5$ in Wasser). Wegen der Übereinstimmung der molekularen Drehungen der β -Glykoside und ihrer Molekülverbindungen mit Kaliumacetat⁴⁾ lässt sich hieraus die spezif. Drehung des freien β -Äthyl-L-fucopyranosids zu

$$[\alpha]_D = + \frac{13.9^\circ \cdot 290.3}{192.2} = +21^\circ \text{ berechnen.}$$