

364. Richard Kuhn, Hans Helmut Baer und Adeline Gauhe: Kristallisation und Konstitutionsermittlung der Lacto-N-fucopentaose I

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

(Eingegangen am 30. Juli 1956)

Das Morgan-Elson-positive, L-Fucose enthaltende Pentasaccharid der Frauenmilch ließ sich in der abwärts mutarotierenden α -Form kristallisiert gewinnen. Es wurde katalytisch hydriert. Der permethylierte Pentait lieferte bei saurer Hydrolyse 1,2,3,5,6-Pentamethyl-D-sorbit, 2,4,6-Trimethyl-D-galaktose, 4,6-Dimethyl-D-glucosamin, 3,4,6-Trimethyl-D-galaktose und 2,3,4-Trimethyl-L-fucose. Daraus ergibt sich für das Pentasaccharid Formel I. Es handelt sich somit um Lacto-N-tetraose, deren endständiger Galaktoserest am Hydroxyl des C-Atoms 2 mit L-Fucopyranose α -glykosidisch verknüpft ist. In Übereinstimmung hiermit ließ sich durch partielle Säurehydrolyse unter Abspaltung von L-Fucose kristallisierte Lacto-N-tetraose gewinnen.

Das erste natürlich vorkommende L-Fucosid, das kristallisiert erhalten wurde, ist die Fucosido-lactose, die als α -L-Fucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -D-glucopyranose erkannt wurde¹⁾. Aus Frauenmilch konnten wir drei weitere fucosehaltige reduzierende Oligosaccharide isolieren, die überdies Stickstoff (*N*-Acetyl-glucosamin-Reste) enthalten^{1, 2, 3)}. Mit Hilfe quantitativer Bestimmungen des N- und des C-CH₃-Gehaltes sowie des Äquivalentgewichtes haben wir festgestellt, daß es sich um zwei isomere Pentasaccharide und ein Hexasaccharid handelt. Wir nennen sie daher Lacto-N-fucopentaose I, Lacto-N-fucopentaose II und Lacto-N-difucohexaose. Die vorläufigen Bezeichnungen³⁾ dieser Komponenten der Frauenmilch-Oligosaccharide waren IIIb, IIIa und IIc. Die Pentaose I ist Morgan-Elson-positiv, die Pentaose II und die Hexaose dagegen sind negativ. Unter den begleitenden Oligosacchariden, die bei der Reindarstellung der Pentaose II und der Hexaose abgetrennt werden mußten, fanden wir in sehr geringen Mengen solche, die bei der Hydrolyse auch Xylose (papierchromatographisch nachgewiesen) lieferten.

Die Lacto-N-fucopentaose I ($R_{\text{Lactose}} = 0.27$), welche etwa 8 % des Oligosaccharidgemisches der Frauenmilch ausmacht, konnte jetzt aus wasserhaltigem Methanol durch Zugabe von *n*-Butanol und geringer Mengen von *n*-Hexylalkohol kristallisiert erhalten werden. Es handelt sich um ein Hydrat der α -Form vom Schmp. 216° und der Drehung $[\alpha]_D^{25} : -11.0^\circ \rightarrow -16.3^\circ$ (Wasser).

Bei partieller Hydrolyse mit 0.2 *n* H₂SO₄ in der Wärme (98°) wird die L-Fucose bevorzugt abgespalten, und man erkennt papierchromatographisch neben kleineren Spaltstücken das Auftreten von Lacto-N-tetraose (Komponente IIIc, $R_{\text{Lactose}} = 0.36$). Durch Säulenchromatographie ließ sich die Lacto-

¹⁾ R. Kuhn, H. H. Baer u. A. Gauhe, Chem. Ber. 88, 1135 [1955]; 89, 2513 [1956], vorstehend.

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

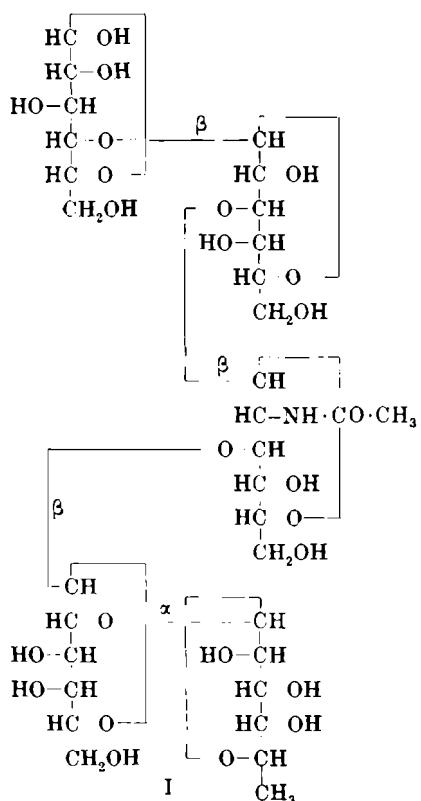
³⁾ A. Gauhe, P. György, J. R. E. Hoover, R. Kuhn, C. S. Rose, H. W. Ruelius u. F. Zilliken, Arch. Biochem. Biophysics 48, 214 [1954].

N-tetraose in einer Ausbeute von 27 % d. Th. kristallisiert gewinnen und mit dem nativen Tetrasaccharid der Frauenmilch^{2,4,5)} identifizieren (Schmp., $[\alpha]_D$, IR-Spektrum und Debye-Scherrer-Linien). Berücksichtigt man, daß

Tafel 1. Spaltstücke nach katalytischer Hydrierung, Permethylierung und Säurehydrolyse

Lacto-N-tetraose ^{b)}	Lacto-N-fucopentaose I
1.2.3.5.6-Pentamethyl-D-sorbit	1.2.3.5.6-Pentamethyl-D-sorbit
2.4.6-Trimethyl-D-galaktose	2.4.6-Trimethyl-D-galaktose
4.6-Dimethyl-D-glucosamin	4.6-Dimethyl-D-glucosamin
2.3.4.6-Tetramethyl-D-galaktose	3.4.6-Trimethyl-D-galaktose
	2.3.4-Trimethyl-L-fucose

ein Teil der Pentaose noch unangegriffen war und weitere Fraktionen noch Tetraose enthielten, so dürften 40 % d. Th. an Lacto-N-tetraose gebildet worden sein. Es ergibt sich daraus, daß die Lacto-N-fucopentaose I aus L-Fucose und Lacto-N-tetraose aufgebaut ist.



Lacto-N-fucopentaose I,

$O\text{-}\alpha\text{-L-Fucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)\text{-}O\text{-}\beta\text{-D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 3)\text{-}2\text{-desoxy-2-acetamino-}\beta\text{-D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)\text{-}O\text{-}\beta\text{-D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 4)\text{-}O\text{-}\alpha\text{-D-glucopyranose}}$

Nachdem die Konstitution und Konfiguration der Lacto-N-tetraose geklärt ist⁵⁾, war somit nur noch zu entscheiden, mit welchem ihrer Bausteine und in welcher Stellung die L-Fucose verknüpft ist. Zu diesem Zwecke haben wir in genau gleicher Weise, wie wir es für die Lacto-N-tetraose beschrieben haben, das Pentasaccharid I mit braunem Palladiumoxydhydrat-Bariumsulfat katalytisch hydriert, den Pentait mit Silberoxyd und Methyljodid in Dimethylformamid in die Hexadekamethyl-Verbindung (80 % d. Th.) verwandelt und diese durch Kochen mit $n\ H_2SO_4$ gespalten. Die chromatographisch-präparative Auf trennung der Spaltstücke (Tafel 1) ergab, daß – im Gegensatz zur Lacto-N-tetraose – keine 2.3.4.6-Tetramethyl-D-galaktose, sondern ein Gemisch von 2.4.6- und 3.4.6-Trimethyl-D-galaktose vorlag.

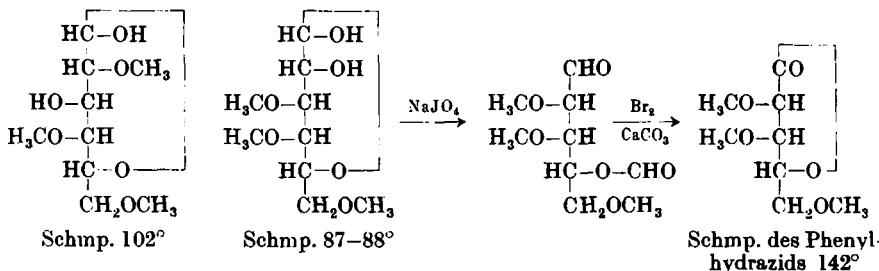
Die 2.3.4-Trimethyl-L-fucose wurde als Anilid (Schmp. 127°, $[\alpha]_D^{20}$: +70.5° → -58.7° in Äthanol) mit einem aus L-Fucose synthetisierten Präparat identifiziert. Die 3.4.6-Trimethyl-D-galaktose (Schmp. 85–87°) war auch nach IR-

^{a)} R. Kuhn, A. Gauhe u. H. H. Baer, Chem. Ber. 86, 827 [1953].

^{b)} R. Kuhn u. H. H. Baer, Chem. Ber. 89, 504 [1956].

Spektrum und Debye-Scherrer-Linien identisch mit dem von uns aus 3.4.6-Trimethyl-D-galaktal⁶⁾ sowie aus Dekamethyl-fucosido-lactose¹⁾ erhaltenen Zucker. Die Natur dieses wichtigen Spaltstückes wurde überdies durch Abbau zum 2.3.5-Trimethyl-D-lyxonsäure-lacton (Schmp. des Phenylhydrazids 142°) gesichert. Es ergibt sich somit, daß die L-Fucose als Pyranosid mit dem Hydroxyl am C-Atom 2 des endständigen D-Galaktoserestes der Lacto-N-tetraose verknüpft ist und der Lacto-N-fucopentaose I die vorstehende Formel zukommt. Die α-glykosidische Verknüpfung der L-Fucose ergibt sich aus der Linksdrehung des Pentasaccharids (Lacto-N-tetraose: $[\alpha]_D^{25} : +25.5^\circ$, Lacto-N-fucopentaose I: $[\alpha]_D^{25} : -16^\circ$ in Wasser).

Schwierigkeiten bereitete uns die Trennung der isomeren Trimethylgalaktose. Aus dem Hydrolysat wurde zunächst der Pentamethylsorbit mit Chloroform ausgeschüttelt, dann das Dimethylglucosamin mit Kationenaustauscher abgetrennt. Von den 3 verbleibenden Spaltstücken ließ sich die schnell laufende Trimethylfucose an einer Cellulose-Säule leicht abtrennen. Von den Trimethylgalakten lief jedoch die 2.4.6-Verbindung nur wenig schneller als die 3.4.6-Verbindung, so daß beide nahezu gleichzeitig im Eluat erschienenen und nur wenig kristallisierte 3.4.6-Trimethyl-D-galaktose aus den letzten Eluaten zu gewinnen war. Die Hauptmenge des Isomerengemisches wurde deshalb mit Natriumperjodat umgesetzt, wobei die 2.4.6-Verbindung unverändert blieb und anschließend kristallisiert erhalten werden konnte, während der 3.4.6-Trimethyläther in 2.3.5-Trimethyl-D-lyxose überging, die sich mit Chloroform leicht ausschütteln und danach mit Brom zum 2.3.5-Trimethyl-D-lyxonsäure-lacton oxydieren ließ.



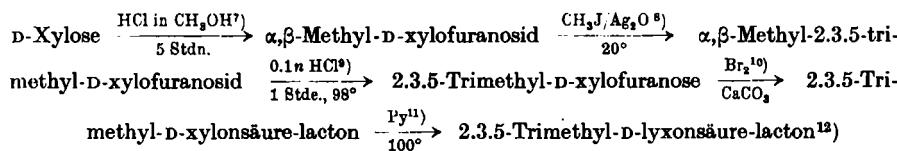
Das zum Vergleich dienende 2.3.5-Trimethyl-D-lyxonsäure-lacton haben wir nach W. N. Haworth und Mitarbb.^{7, 11)} aus D-Xylose hergestellt:

⁶⁾ R. Kuhn u. H. H. Baer, Chem. Ber. 88, 1537 [1955].

⁷⁾ W. N. Haworth u. G. C. Westgarth, J. chem. Soc. [London] 1926, 880. Die dort beschriebene Glykosidierung ergibt neben dem Furanosid beträchtliche Mengen Pyranosid. P. A. Levene, A. L. Raymond u. R. T. Dillon, J. biol. Chemistry 95, 699 [1932], zeigten, wie man nahezu reines Furanosid erhalten kann. Vergl. hierzu auch E. E. Percival u. R. Zobrist, J. chem. Soc. [London] 1952, 4306.

⁸⁾ An Stelle von Dimethylsulfat (Haworth, l. c.⁷) verwendeten wir vorteilhaft Methyljodid + Silberoxyd in Dimethylformamid nach R. Kuhn, H. Trischmann u. I. Löw, Angew. Chem. 67, 32 [1955]; s. auch l. c.^{5, 6}.

⁹⁾ Wir fanden in guter Übereinstimmung mit Haworth $[\alpha]_D : +31.3^\circ$ (Wasser) und $n_D^{25} : 1.4538$ für Trimethyl-D-xylofuranose.



Frl. A. Seeliger und Frl. D. Tschampel danken wir für eifrige präparative Unterstützung, Hrn. Dr. W. Otting für die IR-Spektren und Hrn. E. Röhm für die Röntgenogramme.

Beschreibung der Versuche

Isolierung der Pentasaccharide und des Hexasaccharids aus Frauenmilch: Die Isolierung der Fucosido-lactose und der Lacto-N-tetraose aus dem Oligosaccharidgemisch der Frauenmilch („Kohle-Eluat“^{13,14}) mit Hilfe der Chromatographie an Kohle-Celite-Säulen¹⁴) und an Cellulose-Säulen haben wir früher^{1,4}) beschrieben. Im Verlauf der gleichen Aufarbeitungen ließen sich auch die Pentaosen I und II und die Hexaose gewinnen. Als Beispiel beschreiben wir die Fraktionierung von 12 g (lactose-haltigem) Oligosaccharidgemisch an einer Säule (\varnothing 7 cm) aus 300 g Carboraffin-Celite-Gemisch 1:1. Die Zucker werden hierzu in 300 ccm 5-proz. Äthanol gelöst und unter intensivem Rühren (Vibromischer) an 50 g Carboraffin adsorbiert. Nun wird abgesaugt, wobei ein großer Teil der Oligosaccharide begleitenden Lactose ins Filtrat geht (etwa 2 g). Das Kohle-Adsorbat wird mit wenig 5-proz. Äthanol angerührt und auf die mit demselben Lösungsmittel vorgewaschene Säule gegeben. Der Verlauf der Elution geht aus Tafel 2 (s. S. 2518) hervor.

Die aus zahlreichen derartigen Säulen gewonnenen Fraktionen haben wir sinngemäß vereinigt. Zur weiteren Trennung wurden Cellulose-Säulen (\varnothing 5 cm, 350 g Celluloseulver Schleicher & Schüll 123a) verwendet¹⁵). Mit *n*-Butanol/Pyridin/Wasser 6:1:1 als Elutionsmittel erhielten wir z. B. aus 6.7 g einer Mischfraktion neben 2.73 g Fucosido-lactose 0.91 g Lacto-N-fucopentaose II und 0.79 g Lacto-N-difucosidhexose, sowie 0.73 g eines Gemisches aus etwa gleichen Teilen der beiden letzteren Saccharide. Zur-Auf trennung derartiger Gemische war eine nochmalige Chromatographie erforderlich. Sehr bewährt hat sich *n*-Butanol-Dimethylformamid-Wasser 6:1:1.5. Hiermit gewannen wir z. B. aus 5.6 g einer entsprechenden Mischfraktion 3.64 g Lacto-N-fucopentaose I, 0.16 g Lacto-N-fucopentaose II, 1.3 g höhere Saccharide und einige kleine Fraktionen (z. B. III d-f), von denen manche nach Hydrolyse Xylose lieferten. Die Pentaose I schied sich beim Einengen der betreffenden Eluate als kristallines weißes Pulver ab, welches bei 214–216° schmolz (Zers., einig Grade vorher Sintern).

Lacto-N-fucopentaose I (Kristallisation): Versuche zur Umkristallisation aus einfachen Lösungsmitteln wie Methanol, Äthanol, Butanol, Dimethylformamid oder Pyridin, mit und ohne Wasserzusatz, waren nicht erfolgreich. Jedoch gelang die Umkristallisation auf folgende Weise: 1 g Pentaose wurde auf dem Dampfbad in Methanol unter tropfenweisem Wasserzusatz gelöst. Sodann fügte man so viel *n*-Butanol hinzu, wie ohne Trübung aufgenommen wurde, und ließ einen Teil des Methanols weglassen. Als sich eine

¹⁰⁾ Zur Methodik der Bromoxydation vergl. l. c.^{1,6}). Wir fanden als Drehung des 2,3,5-Trimethyl-D-xylonsäure-lactons in Wasser $[\alpha]_D^{25}$: + 97.7° (Anfang) → + 61.5° (14 und 17 Tage). Haworth gibt an $[\alpha]_D$: + 74.1° (Anfang) → + 61.4° (21 Tage).

¹¹⁾ W. N. Haworth u. C. W. Long, J. chem. Soc. [London] 1929, 345.

¹²⁾ H. G. Bott, E. L. Hirst u. J. A. B. Smith, J. chem. Soc. [London] 1930, 658, geben für das Lacton die Anfangsdrehung $[\alpha]_D^{25}$: + 82.5° (Wasser) und für das Phenylhydrazid den Schmp. 140° an. Unsere entsprechenden Werte sind $[\alpha]_D^{25}$: + 82.2° und Schmp. 142°.

¹³⁾ R. Kuhn, Angew. Chem. 64, 493 [1952].

¹⁴⁾ R. L. Whistler u. D. F. Durso, J. Amer. chem. Soc. 72, 677 [1950].

¹⁵⁾ Methodik vergl. R. Kuhn u. H. H. Baer, Chem. Ber. 87, 1563 [1954].

Tafel 2. Fraktionierung eines Oligosaccharidgehäusches aus Frauenmilch an einer Kohle-Celite-Säule

Fraktion	% Äthanol	ccm	mg	Oligosaccharide ^{a)}
1	5–10	3500	verworfen	Lactose
2	10	300	99	(Lactose), (III d ^{b)}), Lacto- <i>N</i> -difucohexaose
3	10	400	196	Fucosido-lactose, (IIIId ^{b)}), Lacto- <i>N</i> -difucohexaose
4+5	10	900	395	Fucosido-lactose, (IIIId ^{b)}), Lacto- <i>N</i> -fucopentaose II, Lacto- <i>N</i> -difucohexaose
6–12	10	3400	934	Fucosido-lactose, (III d–f ^{b)}), Lacto- <i>N</i> -fucopentaose II, Lacto- <i>N</i> -difucohexaose
13–19	10 12.5	2000 700	395	(Fucosido-lactose), (III d–f ^{b)}), Lacto- <i>N</i> -fucopentaose I, Lacto- <i>N</i> -fucopentaose II, (höhere Saccharide ^{c)})
20–22	12.5	1200	442	(III d–f ^{b)}), Lacto- <i>N</i> -fucopentaose I, (Lacto- <i>N</i> -fucopentaose II), höhere Saccharide ^{c)}
23–29	12.5	2600	1235	Lacto- <i>N</i> -tetraose, Lacto- <i>N</i> -fucopentaose I, höhere Saccharide ^{c)}
30–34	15	2000	868	Lacto- <i>N</i> -tetraose, (Lacto- <i>N</i> -fucopentaose I), höhere Saccharide ^{c)}
35–40	17.5 20	1000 1200	824	Lacto- <i>N</i> -tetraose, höhere Saccharide ^{c)}
41–57	20 30	2800 4000	2372	(Lacto- <i>N</i> -tetraose), höhere Saccharide ^{c)}
58–60	d)	3000	877	höhere Saccharide ^{c)}

a) Die Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen wurde papierchromatographisch untersucht (absteigend, Pyridin/Essigester/Wasser 1:2:2, obere Schicht). Die nur in geringen Mengen nachgewiesenen Komponenten sind eingeklammert. Nur die Fraktionen 1 sowie 30–34 drehten rechts, in den anderen überwog die Linksdrehung der Fucoseide.

b) III d–f sind in geringen Mengen vorhandene Komponenten mit den R_{Lactose} -Werten 0.43, 0.55, 0.66.

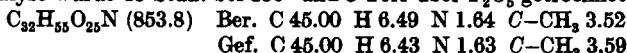
c) Komponenten I, IIa, IIb (vergl. Fußnote^{a)}), $R_{\text{Lactose}} < 0.11$. Es ist uns bisher noch nicht gelungen, diese Komponenten, deren Zahl überdies noch unsicher ist, in einheitlicher Form zu isolieren.

d) 20-proz. Essigsäure.

— zunächst ölige — Abscheidung zu bilden begann, gaben wir einige Tropfen *n*-Hexylalkohol zu und erhitzten noch einige Minuten unter stetem Verreiben des Niederschlaiges, der sich allmählich vermehrte und in eine kristalline, absaugbare Form verwandelte. Nach Aufbewahren über Nacht bei + 4° wurde abgesaugt und mit kaltem Methanol gewaschen. 780 mg, Schmp. 216°.

Die Lacto-*N*-fucopentaose I bildet ein weißes Kristallpulver, welches unter dem Polarisationsmikroskop Auslöschung zeigt und ein linienreiches Debye-Scherrer-Diagramm liefert. Der exsiccatortrockene Zucker enthält Kristallwasser, das auch bei erhöhter Temperatur nur langsam abgegeben wird. Eine Probe verlor durch mehrfaches Abdampfen mit absol. Äthanol + Benzol 14.2% ihres Gewichtes, was etwa 8 Moll. H₂O entspricht.

Zur Analyse wurde 48 Stdn. bei 130° und 3 Torr über P₂O₅ getrocknet.



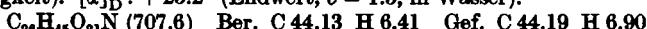
Das Äquiv.-Gew. wurde nach Willstätter-Schudel zu 857 und 856 gefunden; die Modifikation nach Macleod-Robison war in diesem Falle weniger geeignet, sie lieferte etwas zu hohe Werte.

$[\alpha]_D^{25} : -11.0^\circ$ (Anfang) $\rightarrow -16.3^\circ$ (Endwert nach 4 Stdn., c = 2, Wasser).

Partielle Säurehydrolyse zu Lacto-N-tetraose: Die Lösung von 1.00 g Pentaose I (exsiccatorgetrocknet, entsprechend 0.86 g wasserfreiem Zucker) in 2 l 0.2 n H₂SO₄ wurde 30 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach raschem Abkühlen wurde mit gesättigter Bariumhydroxyd-Lösung bis p_H 6.5 neutralisiert, anschließend zentrifugiert und i.Vak. auf etwa 20 ccm eingedampft.

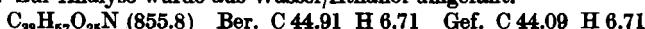
Im Papierchromatogramm erkannte man außer unveränderter Pentaose I Fucose und Lacto-N-tetraose, sowie alle Bausteine, die früher bei der Partialhydrolyse der letzteren²⁾ erhalten worden waren, nämlich Acetylglucosamin (Spuren), Glucose, Galaktose, Lactose, die Lacto-N-biosen I und II und die Lacto-N-triosen I und II.

Zur Isolierung der gebildeten Lacto-N-tetraose haben wir die konz. Lösung an etwas Papierpulver adsorbiert und auf eine Cellulose-Säule aufgebracht (Säule: 50 cm lang, ø 2.7 cm, 105 g Papierpulver, Elutionsmittel n-Butanol/Dimethylformamid/Wasser 6:1:1.5). Durch die ersten 600 ccm wurden die Monosaccharide eluiert, durch die folgenden 450 ccm die Disaccharide und durch weitere 1000 ccm die Triasaccharide. Die nächsten 1200 ccm Eluat, die neben geringen Mengen unveränderter Pentaose I hauptsächlich das Tetrasaccharid enthielten, engten wir auf etwa 450 ccm ein, wobei sich ein krist. Niederschlag abschied, der aus 80-proz. Äthanol umkristallisiert wurde. Wir erhielten so 215 mg chromatographisch nahezu reines Tetrasaccharid, das nur noch Spuren von Pentaose I enthielt. Ausbeute 27%, bezogen auf wasserfreie Zucker. Zur Analyse wurde nochmals, wie früher⁴⁾ angegeben, umkristallisiert und mehrfach mit Äthanol/Benzol abgedampft. Feine Nadeln vom Zersp. 205° ± 10° (abhängig von Kristallwassergehalt und Erhitzungsgeschwindigkeit). $[\alpha]_D^{25} : +25.2^\circ$ (Endwert, c = 1.5, in Wasser).



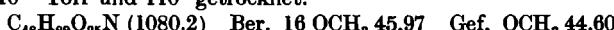
Das Debye-Scherrer-Diagramm und das IR-Spektrum⁴⁾ waren identisch mit denen des nativen Tetrasaccharids.

Hydrierung der Lacto-N-fucopentaose I: 2.50 g krist. Pentaose (Hydrat) wurden in 35 ccm Wasser mit 3 g braunem Palladiumhydroxyd-Bariumsulfat 19 Stdn. bei 100° ± 5° und 90–100 at hydriert. Da hiernach die Hydrierung nach Fehling- sowie Anilinphthalat-Probe noch nicht beendet war, wurde die Operation wiederholt, wobei der verbrauchte Katalysator durch frischen ersetzt wurde. Nach 14 Stdn. bei 90–100° und 90 at fügten wir noch 1 g Katalysator zu und setzten die Hydrierung weitere 17 Stdn. bei etwa 100° und 100 at sowie noch 1 Stde. bei 107° fort. Nun waren die oben genannten Proben praktisch negativ. Die vom Katalysator über Talkum abgesaugte Lösung zeigte eine spezif. Drehung von –30°. Sie wurde eingedampft und hinterließ den Lacto-N-fucopentait I – nach Entwässern durch mehrfaches Abdampfen mit absol. Alkohol – als weißes, amorphes, Morgan-Elson-negatives Pulver. Ausb. 2.2 g (ber. 2.15 g vom Oktahydrat ausgehend). Zur Analyse wurde aus Wasser/Äthanol umgefäßt.



Methylierung des Lacto-N-fucopentait I: Eine Lösung von 2.1 g Pentait in 60 ccm dest. trockenem Dimethylformamid wurde in einer braunen Pulverflasche mit 20 ccm Methyljodid vermischt und ungeachtet einer entstehenden geringen Trübung mit 20 g Silberoxyd unter gutem Umschwenken anteilsweise im Verlauf von 20 Min. versetzt. Anfänglich wurde das Reaktionsgefäß zum Ingangbringen der Reaktion kurz in warmes Wasser getaucht, dann sorgte man durch gelegentliches Kühlen dafür, daß die Temperatur nicht über 33° stieg. Nachdem sich die Mischung auf Zimmertemperatur abgekühlt hatte, wurde 17 Stdn. auf der Maschine geschüttelt. Dann fügten wir weitere 5 g Ag₂O + 5 ccm CH₃J zu und schüttelten noch 8 Stunden. Zur Aufarbeitung wurde der Bodensatz durch Dekantieren abgetrennt und mehrfach gut mit Chloroform gewaschen (Zentrifuge). Die

Dekantate wurden in 500 ccm überschüssiges Chloroform eingegossen. Die sich abscheidende krist. weiße Silberjodid-Tetramethylammoniumjodid-Komplexverbindung wurde nach Stehenlassen über Nacht im Kühlschrank abgesaugt und verworfen. Das Filtrat engten wir nach Trocknen mit Na_2SO_4 zuerst bei 12 Torr, dann bei 3 Torr ein; den zurückbleibenden Sirup dampften wir mehrfach mit Toluol i.Vak. ab. Die Substanz hatte 43.12% OCH_3 . Zur Nachmethylierung haben wir zweimal mit Methyljodid (20 und 30 ccm), Silberoxyd (5 g) und wasserfreiem Calciumsulfat (3 g) 4 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Wir erhielten die Hexadekamethyl-Verbindung als farblosen, zähen Lack, der beim Trocknen im Exsiccator spröde wurde. Ausb. 2.1 g (80% d.Th.). Zur Analyse wurde 12 Stdn. bei 10^{-3} Torr und 110° getrocknet.



Hydrolyse der Hexadekamethyl-Verbindung: Wir lösten 2.0 g in n H_2SO_4 und filtrierten wegen einer geringen Trübung mit etwas Tierkohle. Das farblose Filtrat (120 ccm) erhitzte man unter Rückfluß zum Sieden, wobei die Hydrolyse polarimetrisch verfolgt wurde; nach 6 Stdn. war sie beendet.

Zeit Stdn.	0	2.5	4.5	5	6
α_{2dm}	-1.18°	$+0.85^\circ$	$+0.90^\circ$	$+0.91^\circ$	$+0.91^\circ$
$[\alpha]_{D}^{25}$	-35.4°	$+25.5^\circ$	$+27.0^\circ$	$+27.2^\circ$	$+27.2^\circ$

Aus dem erkalteten Hydrolysat wurde die Schwefelsäure mit Bariumhydroxyd-Lösung entfernt. Filtrat + Waschwasser (zusammen 500 ccm) hatten p_H 5. Papierchromatographisch sah man Trimethylfucose (R_F 0.72), 2.4.6-Trimethyl-galaktose (R_F 0.58), 3.4.6-Trimethyl-galaktose (R_F 0.52, charakterist. gelbe Fluorescenz), Dimethylglucosamin (R_F 0.28 bis 0.30) sowie etwas N-Acetyl-dimethylglucosamin (R_F 0.39). Dimethylgalaktosen waren bestimmt abwesend, ebenso ergab sich kein Hinweis auf Tetramethylgalaktose. Chromatographie absteigend in n -Butanol-Äthanol-Wasser 4:1:5. Das gleiche Ergebnis wurde mit Pyridin/Essigester/Wasser/Eisessig 5:5:3:1¹⁶) erhalten.

1.2.3.5.6-Pentamethyl-D-sorbit: Die wäßrige Lösung wurde dreimal mit 50 ccm Chloroform ausgeschüttelt. Diese Chloroformextrakte drehten schwach links und hinterließen nach Trocknen und Eindampfen etwa 300 mg eines Sirups, der die Hauptmenge des Pentamethylsorbit, daneben aber nicht unbeträchtliche Mengen Trimethylfucose sowie Spuren Trimethylgalaktose enthielt. Die anwesenden reduzierenden Zucker wurden mit Hypojodit oxydiert und abgetrennt¹⁷⁾. Den so gereinigten Pentamethylsorbit destillierten wir zweimal bei 10^{-3} Torr und $78-85^\circ$ im Kugelrohr. Er stellte dann ein schwach gelbstichiges, ziemlich bewegliches Öl dar, welches keine Anilinphthalatreaktion gab. n_D^{25} 1.4428, $[\alpha]_D^{25} -7.8^\circ$ ($c = 2.5$, in absol. Äthanol). Durch nochmalige Destillation (10^{-3} Torr, $75-80^\circ$) erhielten wir das Öl farblos; der n_D^{25} -Wert war praktisch unverändert (1.4425). Lit. vergl. Fußnoten^{5, 17}).



4.6-Dimethyl-D-glucosamin: Die wäßrige Hydrolysenlösung wurde nach der Extraktion der Hauptmenge des Pentamethylsorbita i.Vak. auf ein kleines Volumen eingeengt und darauf mit feingemahlenem Anionenaustauscher Amberlite IR-45 behandelt, bis keine Sulfationen mehr nachweisbar waren. Das p_H stieg auf 7.4. Nach Abtrennen und Auswaschen des Anionenaustauschers betrug das Volumen der Lösung ~ 200 ccm. Die Ninhydrinreaktion war positiv.

Nun haben wir den in der Lösung vorhandenen Aminozucker an Kationenaustauscher Amberlite IR-120 adsorbiert. Hierzu rührten wir die Lösung mit 10 ccm Austauscher und filtrierten sie dann sehr langsam noch über eine kleine Säule, die weitere 20 ccm Austau-

¹⁶⁾ F. G. Fischer u. H. Dörfler, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 301, 224 [1955].

¹⁷⁾ P. A. Levene u. M. Kuna, J. biol. Chemistry 127, 49 [1939].

scher enthielt. Der Austauscher wurde mit 200 ccm dest. Wasser gewaschen. Die Filtrate waren ninhydrin-negativ. Sie enthielten nur Nicht-Aminozucker.

Zur Gewinnung des Aminozuckers haben wir sodann den Kationenaustauscher mit 125 ccm *n*-HCl eluiert. Die salzauren, ninhydrinpositiven Eluate wurden i.Vak. zur Trockne gedampft. Der saure, sirupöse Rückstand wurde längere Zeit im Exsiccator über KOH aufbewahrt, bis er gewichtskonstant geworden war. Er stellte dann einen spröden, farblosen, sehr hygroskopischen Lack dar. Nach Stickstoff- (ber. N 5.75, gef. 4.77) und Methoxylbestimmung (ber. OCH₃ 25.47, gef. 21.53) bestand dieser zu 82.5% bzw. 84.5% aus Dimethylglucosamin-hydrochlorid.

2.3.4-Trimethyl-L-fucose: Das bei der Abtrennung des Dimethylglucosamins mit Kationenaustauscher IR-120 erhaltene schwach saure Filtrat, welches die Trimethylhexosen enthielt, wurde i.Vak. eingedampft, zuletzt zur Vertreibung von Essigsäure unter mehrfachem Zusatz von *n*-Butanol. Der sirupöse Rückstand wurde an Papierpulver adsorbiert und an einer Cellulose-Säule chromatographiert (Länge 110 cm, Ø 2.6 cm, *n*-Butanol-Wasser-Benzin (Sdp. 110–120°) = 60:2:38). Die einzelnen Fraktionen (je 50 ccm) wurden papierchromatographisch auf ihre Zusammensetzung untersucht.

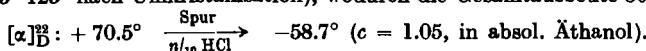
Die Fraktionen 1 bis 3 enthielten keine reduzierenden Zucker und drehten nicht; sie wurden verworfen. Fraktion 4 enthielt 84 mg einer anilinphthalat-negativen Substanz unbekannter Natur mit der spezif. Drehung $[\alpha]_D^{25} : \approx +40^\circ$ (in Wasser, nach Klärung in der Ultrazentrifuge). Die Fraktionen 5 bis 7 waren linksdrehend und enthielten die Hauptmenge der Trimethylfucose (290 mg), soweit sie nicht schon bei der Abtrennung des Penta-methylsorbitis diesen begleitet hatte. Die Fraktionen 8 und 9 lieferten zusammen 22 mg eines Gemisches aus Trimethylfucose und Trimethylgalaktose; sie wurden verworfen. Die Fraktionen 10 bis 37 enthielten die beiden Trimethylgalaktosen, deren Trennung nicht glücklich war. Lediglich eine kleine Menge der langsameren 3.4.6-Trimethyl-galaktose konnte aus den Fraktionen 38 bis 42 rein erhalten werden (s. unten).

Der Eindampfrückstand der vereinigten Fraktionen 5 bis 7 (290 mg) wurde zweimal bei etwa 10⁻³ Torr und 80–85° im Kugelrohr destilliert. Man erhielt einen farblosen, stark linksdrehenden Sirup, welcher nicht kristallisierte, dessen Analyse aber auf Trimethylfucose nahezu stimmte.

C₉H₁₈O₅ (206.2) Ber. C 52.41 H 8.80 OCH₃ 45.14 Gef. C 52.00 H 8.71 OCH₃ 44.25

2.3.4-Trimethyl-L-fucose-anilid: Zur Identifizierung haben wir das krist. Anilid dargestellt. Hierzu erhitzten wir 200 mg des Sirups mit 0.1 ccm dest. Anilin in 6 ccm absol. Äthanol vorsichtig 3 Std. unter Rückfluß. Danach verdampften wir unter Zusatz von 10 ccm Benzin (Sdp. 110–120°) i.Vak., lösten den Rückstand in 2 ccm absol. Äthanol, fügten 5 ccm Benzin (Sdp. 70–80°) hinzu und ließen im Schälchen über Paraffin, H₂SO₄ und KOH kristallisieren. Wir erhielten derbe, bis zu 1 cmm große würfelähnliche Kristalle, welche durch Digerieren mit Äther/Petroläther von Schmieren befreit wurden. 88 mg vom Schmp. 127°. Umkristallisation aus Äther ließ den Schmp. unverändert.

Die vereinigten Mutterlaugen wurden eingedampft, den Rückstand destillierten wir zweimal i. Hochvak. (10⁻³ Torr, schnelles Erhitzen auf 130–140°). Das schwach gelbliche Destillat begann alsbald spontan zu kristallisieren und war anderntags durchkristallisiert. Mit Äther/Petroläther verrieben, ergaben sich so noch 61 mg Anilid vom Schmp. ~ 123° (123–125° nach Umkristallisation), wodurch die Gesamtausbeute 50% d.Th. betrug.



C₁₅H₂₃O₄N (281.3) Ber. 3 OCH₃ 33.09 N 4.98 Gef. OCH₃ 33.02 N 5.35

In unserer früheren Arbeit¹⁾ fanden wir als Schmp. des 2.3.4-Trimethyl-L-fucose-anilids¹⁸⁾ 133–134°, in Übereinstimmung mit S. P. James und F. Smith¹⁹⁾. Wie die Durchsicht der Literatur²⁰⁾ lehrt, können jedoch die Schmelzpunkte von methylierten Hexose-aniliden zuweilen schwierig reproduzierbar sein; Differenzen von 10° und mehr sind nicht selten.

¹⁸⁾ Die l. c.¹⁾ auf S. 1144 angegebene Summenformel muß richtig heißen: C₁₅H₂₃O₄N (281.3). ¹⁹⁾ J. chem. Soc. [London] 1945, 746.

²⁰⁾ Vergl. z. B. G. G. Maher, Advances Carbohydrate Chem. 10, 273 [1955].

Wir haben daher 2,3,4-Trimethyl-L-fucose aus reiner L-Fucose (Hoffmann-La Roche) dargestellt und ins Anilid übergeführt¹⁹). Das synthetische Produkt wurde i. Hochvak. destilliert. Nachdem das Destillat weitgehend durchkristallisiert war, wurde es mit Äther/Petroläther verrieben. Die Hauptmenge schmolz dann bei 125–127°, während sich aus dem Äther/Petroläther-Gemisch beim Einengen derbe, kubische Prismen vom Schmp. 127–132° abschieden. Drehung²¹) in absol. Äthanol, $c = 1.1$, ohne Katalyse:

Stdn.	0	0.167	3	5	7	21.5	27	31
[α] _D ²¹	+80°	+77.8°	+56.3°	+41.2°	+28.2°	-22.5°	-27.2°	-33.8°
Stdn. 46 60 72 Gleichgewicht								
[α] _D ²¹	-49.8°	-54.4°	-56.8°		-57.7°			

Die gleiche Enddrehung stellt sich momentan ein, wenn man mit einer Spur $n/_{10}$ HCl katalysiert. Es handelt sich um eine echte Mutarotation, denn nach Eindunsten der Lösung erhält man das Anilid unzersetzt zurück.

Auch die Debye-Scherrer-Röntgenogramme und die IR-Spektren zeigten, daß das synthet. Präparat und das Trimethyl-L-fucose-anilid aus Lacto-N-fucopentaose I identisch waren.

3.4.6-Trimethyl-D-galaktose aus Säulenfrakt. 38–42: Der Eindampfrückstand wurde aus wenig Tetrachlorkohlenstoff unter Zusatz von etwas Äther und 2 Tropfen Butylacetat mühselig zur Kristallisation gebracht. Derbe, lanzettförmige Nadeln vom Schmp. 80–82°. Umkristallisation aus CCl₄ erhöhte den Schmp. auf 82–84°, nochmaliges Umkristallisieren auf 85–87°. Der Misch-Schmp. mit synthet. 3,4,6-Trimethyl-D-galaktose⁶) lag bei 83–84°, die Debye-Scherrer-Diagramme und IR-Spektren zeigten Identität. Ber. OCH₃ 41.89; gef. 41.59.

2,3,5-Trimethyl-D-lyxonsäure-phenylhydrazid: Der Abdampfrückstand der vereinigten Säulenfraktionen 10 bis 37, der zufolge der papierchromatographischen Prüfung aus 2 Trimethylhexosen bestand, wurde in 17 ccm Wasser gelöst, mit 8 ccm 0.25 m NaJO₄-Lösung versetzt und 4 Std. bei 22° im Dunkeln stehengelassen. Danach schüttelten wir mit 80 ccm reinem Chloroform in 6 Anteilen aus, wuschen die vereinigten Extrakte mit 10 ccm Wasser, trockneten mit Natriumsulfat und ließen das Lösungsmittel an der Luft eindunsten. Der Rückstand war teilweise kristallisiert und in kaltem Wasser nur mäßig löslich. Auf dem Papierchromatogramm ergab er mit Anilinphthalat einen neuen, nahezu mit der Front wandernden Fleck. Eine Probe von synthet. 3,4,6-Trimethyl-D-galaktose, die ebenso mit Perjodat oxydiert wurde, zeigte das gleiche Verhalten. Wir möchten vermuten, daß ein Gemisch aus 2,3,5-Trimethyl-D-lyxose und ihrem 4-Formylester vorlag. Wir lösten den Rückstand in 5 ccm warmem Wasser und fügten nach dem Erkalten etwas Calciumoxyd zu, zur Verseifung etwa vorhandenen Formiats. Nach 15 Min. leiteten wir CO₂ ein ($\rightarrow p_H 7$), versetzten mit 1 g CaCO₃ und 0.1 ccm Brom und ließen den Ansatz unter gelegentlichem Umschütteln 16 Std. bei 37° stehen. Nun wurde die gelbe Lösung abzentrifugiert, von überschüssigem Brom durch Belüftung befreit und mit Silbercarbonat behandelt, bis keine Br[–]-Ionen mehr nachweisbar waren. Nach Entfernung der Ag⁺- und Ca²⁺-Ionen mittels Austauschers IR-120 dampften wir die Lösung der Trimethyl-lyxonsäure ein und erhitzten den farblosen sauren Sirup 1 Std. bei 100° und 20 Torr, um die Lactonisierung zu vervollständigen. Danach versetzten wir das Lacton mit überschüssigem dest. Phenylhydrazin in wenig Äther, ließen den Äther größtenteils abdampfen und erhitzten 30 Min. auf dem Dampfbad. Beim Verreiben des ölichen Reaktionsproduktes mit überschüssigem Äther kristallisierte das Phenylhydrazid in weißen Prismen, welche mit Äther gewaschen und zweimal aus Benzol umkristallisiert wurden. Schmp. und Misch-Schmp. mit einer synthet. Probe 142°. Die Debye-Scherrer-Aufnahmen und IR-Spektren waren identisch.

²¹⁾ Die englischen Autoren (Fußnote¹⁹) geben [α]_D: -77° an, von einer Mutarotation berichten sie nichts.

2.4.6-Trimethyl-D-galaktose: Die wäßrige, mit Chloroform ausgeschüttelte Perjodat-Oxydationslösung wurde mit 300 mg Bariumacetat (in wenig Wasser gelöst) versetzt. Der entstehende Niederschlag wurde abzentrifugiert, zweimal mit Wasser gewaschen und verworfen. Sodann brachte man mit NaHCO_3 auf p_{H} 7.0 und trennte den hierbei ausfallenden Niederschlag ebenso ab. Nun entfernen wir die anwesenden Na^+ -Ionen (sowie noch Spuren Ba^{2+}) mit Amberlite IR-120, die restlichen JO_3^- - und JO_4^- -Ionen mit fein gemahlenem Amberlite IR-45. Das p_{H} betrug danach 4.5. Nach gutem Auswaschen des Austauschers wurde die wäßrige Lösung i.Vak. bei niedriger Temperatur zum Sirup eingeelegt und dieser zweimal mit Butanol niedergedampft. Hierbei bildeten sich bereits die ersten Kristalle. Nun wurde aus Äther + etwas Methanol (5 Tropfen auf 2 ccm) kristallisiert und noch zweimal umkristallisiert. Der Schmp. der farblosen Stäbchen stieg hierbei von anfänglich 85–90° auf 102°. Misch-Schmp. 101° mit der Trimethylgalaktose aus Lacto-N-tetraose. Die Debye-Scherrer-Aufnahmen sind identisch und deutlich verschieden von denjenigen der 3.4.6-Trimethyl-galaktose. Das gleiche gilt für die IR-Spektren. OCH_3 ber. 41.89; gef. 42.58.

$[\alpha]_D^{25} : +129^\circ (t = 0) \rightarrow +125^\circ (4 \text{ Min.}) \rightarrow +110^\circ (15 \text{ Min.}) \rightarrow +93^\circ (45 \text{ Min.}) \rightarrow +89^\circ (3 \text{ und } 5 \text{ Std.}; c = 0.5, \text{ in Wasser}).$

Schmelzpunkt und Drehung stimmen mit den Angaben der Literatur überein^{22).}

365. Wolfgang Graßmann, Gottfried Deffner*, Emmy Schuster und Wilhelm Pauckner: Über den Gerbstoff der Fichtenrinde

[Aus dem Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung Regensburg]

(Eingegangen am 22. Mai 1956)

Aus dem Bast der Fichtenrinde wurde eine Gerbstoffkomponente in Form eines kristallisierten Glucosids und des dazugehörigen Aglucons von der Formel $C_{18}H_{16}O_5$ oder $C_{18}H_{18}O_6$ isoliert und durch einige Derivate gekennzeichnet. Die Verbindung ist kein Catechin und enthält eine Doppelbindung. Beim oxydativen Abbau des Dinitrobenzoylderivates wird Dinitrobenzoyl-protocatechusäure abgespalten.

Der Gerbstoff der Fichtenrinde ist wohl der wirtschaftlich wichtigste, sicher aber der mengenmäßig bedeutsamste unserer einheimischen Pflanzen-gerbstoffe. Während der Kriegszeit hat er das Rückgrat der Gerbstoffversorgung gebildet, aber auch heute ist seine praktische Bedeutung beträchtlich.

Der Fichtenrindengerbstoff wird auf Grund verschiedener, meist nicht sehr eindeutiger qualitativer Reaktionen zu den Catechingerbstoffen gerechnet^{1).}

²²⁾ D. J. Bell u. S. Williamson, J. chem. Soc. [London] 1938, 1196; vergl. auch Fußnote^{5).}

*) Neue Adresse: Massachusetts Institute of Technology, Department of Biology bei Prof. F. O. Schmitt, Cambridge 39, Mass.

¹⁾ H. Gnamm, „Die Gerbstoffe und Gerbstoffe“, 3. Aufl. Stuttgart 1949; H. Gnamm, in W. Graßmann, „Handbuch der Gerbereichemie und Lederfabrikation“ Bd. 2/1; M. Nierenstein, „The natural organic tannins“, J. & A. Churchill Ltd., London 1934, S. 244ff.; E. H. W. Rottsieper, „Vegetable tannins“ (Printing for private circulation), W. Cartmel & Sons, Printers, St. Albans, London 1946, S. 57ff.; L. Reichel, Naturwissenschaften 18, 952 [1930]; Angew. Chem. 44, 590 [1931]; 52, 174, 512 [1939]; Collegium [Darmstadt] 1938, 655; Ber. Reichsamt f. Wirtschaftsausbau, Arbeitstg. Leder 1942, 776; O. Th. Schmidt, Angew. Chem. 68, 103 [1956], und zwar S. 114.