

Synthese des β -Menthollactosids und sein Verhalten im Organismus.

Von

Hans Fischer.

(Aus der II. Medizinischen Klinik zu München.)

(Der Redaktion zugegangen am 19. November 1910.)

E. Fischer und seine Schüler haben durch Einwirkung von Halogenzucker auf Körper mit OH- und SH-Gruppen zahlreiche Glukoside bzw. den Glukosiden analog konstruierte Körper aufgebaut.

Von Derivaten des Milchzuckers ist erst eines bekannt, das Thiophenollactosid, das durch Einwirkung von Acetobromlaktose auf Thiophenolnatrium erhalten wurde.¹⁾ Ich stellte nun analog dem von E. und H. Fischer²⁾ gewonnenen Menthalmaltosid das Menthollactosid dar. Die gut krystallisierende Acetylverbindung entsteht nur in sehr geringer Ausbeute: es scheint, als ob die Acetobromlaktose trotz ihres schönen Aussehens ein Gemisch von α - und β -Form wäre. Durch Verseifung der Acetylverbindung entsteht das freie krystallisierte Menthollactosid, das durch Emulsin glatt in Menthol und Milchzucker gespalten wird, sodaß man es wohl der β -Reihe zuzählen kann.

Das Menthollactosid stellte ich zu dem Zweck dar, sein Verhalten im Organismus zu prüfen; ich hoffte dadurch einen Einblick in den bis jetzt noch nicht geklärten Mechanismus der Glukuronsäurepaarung zu gewinnen.

Schmiedeberg und Meyer nahmen an, daß der Traubenzucker zu Glukuronsäure oxydiert werde und diese, ein intermediäres Stoffwechselprodukt, durch Paarung mit den fraglichen Körpern vor weiterer Verbrennung geschützt werde.

¹⁾ E. Fischer und K. Delbrück, Ber. d. d. chem. Ges., Bd. XLII, S. 1476.

²⁾ E. und H. Fischer, Ber. d. d. chem. Ges., Bd. XLIII, S. 2521.

Gegen diese Auffassung wandten sich E. Fischer¹⁾ und Piloty, indem sie darauf hinwiesen, wie unwahrscheinlich es sei, daß die endständige Alkoholgruppe des Traubenzuckers zur Carboxylgruppe oxydiert werde, während die so leicht oxydable Aldehydgruppe intakt bliebe. Sie vertreten die Ansicht, daß der Traubenzucker sich zunächst mit dem fraglichen Körper zum Glukosid paart unter Festlegung der Aldehydgruppe und jetzt erst die CH_2OH -Gruppe zur Säure oxydiert wird. Die Versuche von Hildebrandt,²⁾ besonders die Gewinnung von Borneolglukuronsäure nach subcutaner Zufuhr von Borneolglukosid stimmen zwar mit der von E. Fischer und Piloty vertretenen Ansicht, jedoch besteht auch beim Versuch Hildebrandts noch immer die Möglichkeit, daß das Borneolglukosid erst in seine Komponenten gespalten und dann mit Glukuronsäure gepaart wurde.

Beim Menthollactosid lagen die Verhältnisse insofern günstig, als außer der Entstehung der Mentholglukuronsäure durch vorausgegangene Spaltung in Mentholglukosid und Galaktose auch die Oxydation der endständigen primären Alkoholgruppe zur Carboxylgruppe, also die Bildung einer «Menthollacturonsäure» denkbar war. Eine Spaltung in Menthol und Milchzucker mußte sich durch Ausscheidung des letzteren kund geben, der ja nach den Untersuchungen von F. Voit³⁾ bei subcutaner Zufuhr quantitativ im Urin erscheint. Leider zeigte sich jedoch, daß das Menthollactosid unverändert ausgeschieden wird. Es war also zur Entscheidung der vorliegenden Frage nicht geeignet.

Anhangsweise führe ich noch einige bis jetzt nicht festgestellte Konstanten der Mentholglukuronsäure an.

Heptacetyl- β -menthollactosid.

Zur Erzielung einer relativ guten Ausbeute ist ein großer Überschuß von Menthol nötig. 10 g Acetobrommilchzucker, 5 g Silbercarbonat, 25 g Menthol und 100 ccm Chloroform werden

¹⁾ E. Fischer und O. Piloty, Ber. d. d. chem. Ges., Bd. XXIV, S. 521.

²⁾ H. Hildebrandt, Biochem. Zeitschr., Bd. XXI, S. 1.

³⁾ F. Voit, Deutsches Archiv f. klin. Med., Bd. LVIII, S. 523.

in einer Stöpselflasche geschüttelt. Bald beginnt Kohlensäureentwicklung und nach ca. 30 Minuten ist die Umsetzung vollendet. Bei einigen Versuchen dauerte die Umsetzung auch länger, bis zu 12 Stunden. Man läßt den Silberrückstand absetzen, dekantiert die klare Flüssigkeit durch ein Faltenfilter, nimmt den Rückstand noch mehrmals mit Chloroform auf und filtriert ab. Die vereinigten Filtrate werden auf dem Wasserbad eingeeengt, sodann wird das überschüssige Menthol durch einen starken Dampfstrom schnell abgetrieben, was unter den angegebenen Mengenverhältnissen in 40 Minuten erreicht ist. Der ölige Rückstand erstarrt über Nacht zu einer harten Masse. (Gewicht 10 g.) Um den Körper krystallisiert zu erhalten, löst man den Rückstand in Alkohol und versetzt mit heißem Wasser, jedoch so, daß die Temperatur 50° nicht übersteigt. Sobald die erste Trübung entsteht, läßt man langsam erkalten. Waren die Ausgangsmaterialien rein, so krystallisiert nun in der Regel der Körper in langen Prismen. Durch zweimal wiederholtes Umkrystallisieren in der gleichen Weise erhält man das Acetyl-lactosid rein. Die Ausbeute beträgt nur 4 g. Aus den Mutterlaugen ist durch erneuten Zusatz von Wasser nur noch wenig krystallisiertes Material zu gewinnen. Als Nebenprodukt entsteht ein reduzierender Körper und vielleicht das isomere α -Acetyl-lactosid.

Der Schmelzpunkt des Acetyl-lactosids liegt bei 125—130° und ist etwas abhängig von der Art des Erhitzens. Der Körper ist geruchlos und reduziert Fehlingsche Lösung auch beim längeren Kochen nicht. Wohl wegen seiner Schwerlöslichkeit in Wasser ist er geschmacklos. Er ist in Benzol, Eisessig, Alkohol, Äther, Essigäther, Chloroform, Acetylentetrachlorid leicht, in Wasser, Petroläther und Ligroin schwer löslich. Aus verdünntem Eisessig kann man ihn ebenfalls schön krystallisiert erhalten in tyrosinähnlichen Büscheln. Das Acetyl-lactosid ist äußerst widerstandsfähig gegen Einwirkung von verdünnten Mineralsäuren. Er gleicht in dieser Hinsicht dem von E. Fischer und Raske ¹⁾ beschriebenen Tetraacetylmentholglukosid. Die an der Luft getrocknete Substanz verlor im Vakuum über

¹⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XLII, S. 1470.

Phosphorpentoxyd bei 20 mm Druck kaum an Gewicht und gab bei der Analyse folgende Zahlen:

0,1409 g Substanz gaben 0,2863 g Kohlensäure und 0,0880 g Wasser.

$C_{36}H_{54}O_{18}$ (774,44): Ber.: C 55,78% H 7,03%

Gef.: C 55,41% H 6,98%.

Das Drehungsvermögen wurde in Acetylentetrachlorid bestimmt.

0,3312 g Substanz. Gesamtgewicht 3,0585 g. $d = 1,56$.

Drehung im 1 dm-Rohr bei Natriumlicht = $5,01^\circ$ nach links.

Mithin $[\alpha]_{19}^D = -29,65 (+0,2)$.

Eine zweite Bestimmung von einem Produkt einer anderen Darstellung hatte folgendes Ergebnis:

0,2535 g Substanz. Gesamtgewicht 2,2645 g. $d = 1,56$.

Drehung im 1 dm-Rohr bei Natriumlicht = $5,18^\circ$ nach links.

Mithin $[\alpha]_{19}^D = -29,66 (+0,2)$.

β -Menthollactosid.

8,8 g reine Heptacetylverbindung in 150 ccm heißem Alkohol gelöst, werden in eine kochende Lösung von 30 g reinem krystallwasserhaltigem Barythydrat in 600 ccm Wasser langsam innerhalb einer Viertelstunde eingegossen. Es wird dann $1\frac{1}{2}$ Stunden über freier Flamme gekocht, wobei bis auf einen geringfügigen Rest alles in Lösung geht. Jetzt kühlt man ab, fällt mit 9,32 g reiner konzentrierter Schwefelsäure, die vorher mit Wasser verdünnt wird, den Baryt quantitativ als Sulfat und verdampft das Filtrat unter 15–20 mm Druck zur Trockene. Das Lactosid blieb bei der ersten Darstellung in amorphem Zustand zurück und wurde aus konzentrierter wässrig alkoholischer Lösung mit Hilfe einer Kältemischung krystallisiert erhalten. Bei späteren Darstellungen krystallisierte es sofort beim Eindampfen, obwohl bei diesen Darstellungen nur einmal umkrystallisiertes Ausgangsmaterial angewandt wurde. Die Ausbeute an reinem Präparat beträgt etwa 90% der Theorie. Der Körper krystallisiert in konzentrisch angeordneten, nadelförmigen Prismen.

Die bei gewöhnlicher Temperatur an der Luft getrock-

neten Krystalle enthalten 4 Moleküle Krystallwasser. Die zu den Analysen verwandte Substanz war noch dreimal aus Wasser umkrystallisiert. Der Körper schmilzt ab 110° unscharf. 0,8430 g lufttrockene Substanz verloren bei 100° und 15 mm über Phosphor-pentoxyd 0,1080 g Wasser.

$C_{22}H_{40}O_{11} + 4 H_2O$ (552,39): Ber.: H_2O 13,04%

Gef.: H_2O 12,81%.

Für die Elementaranalyse, optische Bestimmung und Löslichkeitsproben wurde die bei 100° und 15 mm getrocknete Substanz benutzt.

0,1800 g gaben 0,3610 g CO_2 und 0,1369 g H_2O .

$C_{22}H_{40}O_{11}$ (480,32): Ber.: C 54,96% H 8,39%

Gef.: C 54,70% H 8,51%.

0,1630 g Substanz. Gesamtgewicht der wässrigen Lösung 12,5520 g. $d = 1,01$. Drehung im 2 dm-Rohr bei 16° und Natriumlicht 1° nach links.

$$[\alpha]_{16}^D = -38,11 (\pm 0,3).$$

Ein Präparat anderer Darstellung, das viermal umkrystallisiert war, ergab: 0,1950 g Substanz. Gesamtgewicht 15,5850 g. $d = 1,01$. Drehung im 2 dm-Rohr bei 16° und Natriumlicht $0,96^{\circ}$ nach links. Mithin

$$[\alpha]_{16}^D = -37,97 (\pm 0,3).$$

Der wasserfreie Körper zeigt ebenfalls keinen konstanten Schmelzpunkt. Wahrscheinlich, weil er stark hygroskopisch ist. Er zersetzt sich gegen 170° im Kapillarrohr, jedoch tritt bei längerem Erhitzen bei 120° bereits vollkommene Zersetzung ein, die sich durch Mentholabspaltung kund gibt.

Ebenso wird durch einstündige Einwirkung von 1%iger Schwefelsäure das Menthollactosid vollkommen in Menthol und reduzierenden Zucker zerlegt.

In heißem Alkohol ist der Körper löslich, in kaltem Alkohol, Aceton, Chloroform, Äther, Benzol, Ligroin löst er sich schwer, in Eisessig in der Hitze leicht. In Wasser ist die Substanz, wie schon aus den optischen Bestimmungen hervorgeht, ziemlich schwer löslich, jedoch bildet sie leicht übersättigte

Lösungen, die besonders bei Gegenwart von Verunreinigungen sehr haltbar sind. Hiedurch erklärt es sich, daß zu den unten angeführten Fermentversuchen eine viel höhere Konzentration angewandt werden konnte, obwohl zu diesen Versuchen selbstverständlich analysiertes Material verwandt wurde. Der Geschmack ist derselbe wie der des Mentholmaltosids. Das Lactosid reduziert die Fehlingsche Lösung nicht. Durch Bleiessig und Ammoniak wird es gefällt.

Spaltung durch Emulsin. Eine Lösung von 0,2 g lufttrockenem Lactosid in 6 ccm Wasser wurden mit 0,2 g käuflichem Emulsin (E. Merk, Darmstadt) und wenig Toluol 40 Stunden bei 37° aufbewahrt. Es entstand hiebei starker Geruch nach Menthol und nach der Titration mit Fehlingscher Lösung waren 85% des Lactosids gespalten, wenn die Reduktion auf entstandenen Milchzucker berechnet wird. Der Milchzucker wurde nachgewiesen durch das Osazon, das identifiziert wurde durch seine Leichtlöslichkeit in heißem Wasser und seinen Schmelzpunkt. (Gegen 200° unter Zersetzung.) Allerdings war auch etwas Phenylglukosazon vorhanden, das an seiner Unlöslichkeit in heißem Wasser und typischen Krystallform erkannt wurde. Zu einer Schmelzpunktbestimmung reichte die erhaltene Menge nicht aus.

Durch Hefenextrakt, der vorher auf seine Wirksamkeit geprüft war, wurde das Lactosid nicht angegriffen. Durch Kefirlactase erfolgte eine schwache Spaltung. Mentholgeruch war nicht wahrnehmbar.

Verhalten im Organismus bei subcutaner Zufuhr. Das Menthollactosid wurde 3 Kaninchen unter die Rückenhaut eingespritzt und zwar jedem Kaninchen je 1 g, in zwei Portionen à 0,5 g gelöst in 20 ccm Wasser, innerhalb 8 Stunden. Der während 48 Stunden abgeschiedene linksdrehende Urin, der mittels Katheter entnommen war und Fehlingsche Lösung nicht reduzierte, wurde mit Bleizucker geklärt, dann mit Bleiessig gefällt. Das Filtrat vom Bleiessigniederschlag wurde mit Ammoniak und Bleiessig erschöpfend gefällt. In beiden Fraktionen konnte nach Entfernung des Bleis keine Mentholglukuronsäure nachgewiesen werden, dagegen wurden

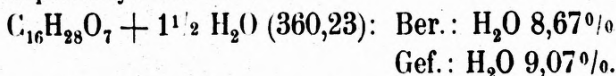
nach 2stündiger Hydrolyse mit 5%iger Salzsäure reichliche Mengen von Phenylglukosazon neben freiem Menthol isoliert.

Das Menthollactosid bewirkt bei Kaninchen Blasenlähmung. Entleert man den Urin nicht mittels Katheter, so gehen die Tiere innerhalb 8 Tagen ein.

Mentholglukuronsäure.

Die Mentholglukuronsäure wurde aus dem Harn von Kaninchen, denen täglich 2—3 g Menthol mit der Schlundsonde gegeben war, gewonnen. Ich folgte zunächst der Vorschrift von E. Fromm und P. Clemens,¹⁾ indem ich die Glukuronsäure mit basischem Bleiacetat fällte. Das Filtrat von dem mit Schwefelwasserstoff zerlegten Niederschlag behandelte ich nach der Vorschrift von C. Neuberg und S. Lachmann,²⁾ jedoch führte ich das schön krystallisierende Ammonsalz nicht in die Bleiverbindung über, sondern entzog der mit Schwefelsäure versetzten Lösung die Glukuronsäure durch wenig Äther. Nach Verdunsten des letzteren und Versetzen mit Wasser krystallisierte die Mentholglukuronsäure in sechseckigen bis zu 1½ cm breiten Platten. Aus heißem Wasser läßt sich die Substanz ebenfalls umkrystallisieren, jedoch tritt dabei leicht Zersetzung ein, erkennbar am Mentholgeruch.

Von Fromm und Clemens ist angegeben, daß die Verbindung 1½ Moleküle Krystallwasser enthält. Da jedoch keine Krystallwasserbestimmung, ebenso keine optische Bestimmung ausgeführt wurde, so habe ich diese Konstanten bestimmt. Es verloren 0,5620 g an der Luft zur Konstanz getrocknete Substanz 0,0510 g Wasser beim Trocknen im Vakuum über Phosphorpentoxyd bei 80°.



Der Schmelzpunkt der trockenen Substanz ist schwer zu bestimmen, da sie ungemein hygroskopisch ist. Ab 92° tritt Sinterung ein und gegen 110° ist der Körper geschmolzen.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXIV, S. 385.

²⁾ Biochem. Zeitschr., Bd. XXIV, S. 418.

Das Drehungsvermögen wurde in absolutem Alkohol bestimmt. 0,1951 g Substanz. Gesamtgewicht 2,5153 d = 0,815. Drehung im 1 dm-Rohr bei Natriumlicht = 6,58 nach links. Mithin

$$[\alpha]_{20}^D = -104,10 (\pm 0,2).$$

Eine zweite Bestimmung mit einem Präparat anderer Darstellung ergab: 0,1300 g Substanz. Gesamtgewicht 1,4200 d = 0,8155. Drehung im 1 dm-Rohr bei Natriumlicht = 7,81° nach links. Mithin

$$[\alpha]_{20}^D = -104,6 (\pm 0,2).$$