

92. Burckhardt Helferich und Johanna Werner: Über Anhydride von Glykol-glykosiden, III. Mitteilung*).

[Aus d. Chem. Laborat. d. Universität Leipzig.]
(Eingegangen am 10. Mai 1943.)

Das in der letzten Arbeit beschriebene Glykol- β -*d*-galaktosid-anhydrid wurde durch Überführung in eine Triacetylverbindung (I) und in eine Tritylverbindung (II) noch näher charakterisiert und seine Struktur: 3 freie Hydroxyle, davon eines primär und endständig (6-Hydroxyl), sichergestellt.

Weiterhin wurde zum ersten Male ein Disaccharid herangezogen, indem Acetobromlactose mit Äthylenchlorhydrin zur Reaktion gebracht wurde. Auch aus dem dabei entstehenden Hepta-acetyl- β -*d*-lactosido-äthylenchlorhydrin (III) werden bei kräftiger Behandlung mit Alkali (in Alkohol) nicht nur die Acetylgruppen abgespalten, sondern ebenso 1 Mol. HCl, und es entsteht das Anhydrid des Glykol- β -*d*-lactosids (IV). Die Substanz krystallisiert, auch aus Alkohol, mit etwa 2 Mol. Krystallwasser, das zum Teil sehr festgehalten wird. Dieser Umstand machte den Beweis, daß es sich wirklich um ein — krystallwasserhaltiges — Anhydrid des Glykol- β -*d*-lactosids handelt und nicht etwa um das Glykol- β -*d*-lactosid selbst, besonders notwendig: Die lufttrockne Substanz schmilzt erst nach starkem Sintern um 120° bei 207—208°. Auch nach dem Trocknen im Exsiccator und nach dem Trocknen bei 100°/2 mm ist manchmal trotz des eingetretenen Verlustes die Erscheinung im Schmelzpunktröhrchen nicht wesentlich anders, nur daß das Sintern später eintritt. Erst wenn bei 1—2 mm über P₂O₅ bei 140° getrocknet worden ist, ist die Substanz sicher wasserfrei; sie schmilzt dann ohne Sintern bei 207—208° und zeigt die auf ein Glykol- β -*d*-lactosid-anhydrid stimmenden Analysenzahlen. Die Hydroxylgruppenbestimmungen mit Pyridin-Essigsäureanhydrid geben aber auch mit dem krystallwasserhaltigen Material einwandfreie Werte für 6 Hydroxyle, nicht für 8, wie es ein Glykol-lactosid verlangen würde. Ebenso liefert die Acetylierung ein Hexa-acetyl-Derivat (V), dessen Entacetylierung zum Glykol- β -*d*-lactosid-anhydrid mit allen seinen Eigenschaften, insbesondere dem Krystallwassergehalt, zurückführt. Schließlich liefert die Säurehydrolyse — mehrstündiges Erhitzen mit *n*-H₂SO₄ — unter Abspaltung von Galaktose das früher beschriebene Glykol- β -*d*-glucosid-anhydrid*).

Das Glykol-lactosid-anhydrid bietet für die Frage fermentativer Spaltungen von Disacchariden und ihren Derivaten, speziell für die Lactose, ein neuartiges Material. Durch die Anhydridbildung zwischen Glykol und dem 2-Hydroxyl des Glucoseanteiles in der Lactose ist, jedenfalls nach den bisherigen Erfahrungen, die Glucosidbindung nicht nur sehr säurewiderstandsfähig, sondern auch „fermentfest“ geworden. Es bleibt also in dem Glykol- β -*d*-lactosid-anhydrid nur die β -*d*-Galaktosidbindung zwischen Galaktose und Glucose fermentativ spaltbar. Man wird an dem Material prüfen können, ob und wie die milchzuckerspaltenden Fermente einerseits, die β -*d*-galaktosidspaltenden Fermente andererseits auf das neue Substrat einwirken. Damit ist eine neue Möglichkeit gegeben, in diesem Fall — und ebenso auch bei anderen Disacchariden — die Frage zu prüfen, ob es wirklich disaccharidspaltende Fermente (reduzierender Disaccharide) gibt, die nicht vom glucosidisch gebundenen Zucker her — im Falle der Lactose also von der Galaktose

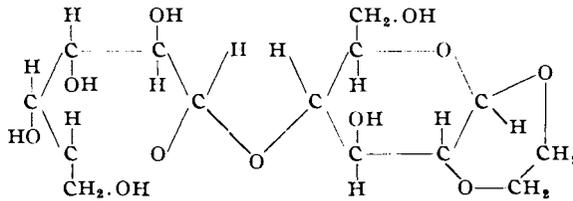
*) II. Mitteil.: B. 75, 1446 [1942]; I. Mitteil.: B. 75, 949 [1942].

her — sondern von dem reduzierenden Anteil — im Falle der Lactose von der Glucose her — die fermentative Spaltung bewirken.

Zur Verfolgung dieser Gedankengänge sind in der vorliegenden Arbeit zunächst einmal Süßmandel-Emulsin, Luzerne-Emulsin und Kefir-Emulsin herangezogen worden. Alle 3 Fermente sind als β -*d*-galaktosidspaltende Fermente bekannt. In allen 3 Fällen wurde festgestellt, daß Glykol- β -*d*-lactosid-anhydrid fermentativ gespalten wird und zwar, wie die Tafel ergibt, bei jedem Ferment, in der Größenordnung, etwa ebenso schnell wie Milchzucker. Es besteht also bei diesen Fermenten wie zu erwarten kein Grund, für die Spaltung der Lactose etwas anderes als die β -*d*-galaktosidatische Wirkung dieser Fermentpräparate verantwortlich zu machen.

Tafel.

Emulsin aus	Wertigkeit gegen	
	Lactose	Glykol-lactosid-anhydrid
Süßmandeln	0.007	0.007
Luzerne	0.002	0.009
Kefir	0.07	0.03



β -*d*-Galaktosido- β -*d*-glucosido-glykol-anhydrid
(Lactosido-)
Glykol- β -*d*-lactosid-anhydrid.

IV.

Beschreibung der Versuche.

Triacetyl-glykol- β -*d*-galaktosid-anhydrid (I): 0.5 g Glykol- β -*d*-galaktosid*) werden in einem Gemisch von 3 ccm absol. Pyridin mit 3 ccm Essigsäureanhydrid durch kurzes Erwärmen gelöst, etwa 15 Stdn. bei Zimmertemperatur aufbewahrt, die Lösung mit 2 ccm Wasser versetzt, im Exsiccator über KOH und H₂SO₄ eingedunstet und der Rückstand mehrmals mit Wasser verrieben und im Exsiccator getrocknet. Ausb. an Rohprodukt 0.72 g. Durch Umkrystallisieren aus 10 ccm gewöhnl. Alkohol erhält man 0.5 g der Triacetylverbindung vom Schmelzpunkt 159°. $[\alpha]_D^{20}$: $+1.02^\circ \times 1.3032/0.0344 \times 1 \times 1.469 = +26.3^\circ$ (in Chloroform).

C₁₄H₂₀O₉ (332.30). Ber. C 50.60, H 6.07. Gef. C 50.98, H 6.12.

Die Verbindung zeigt die Löslichkeit der Acetylzucker.

6-Triethyl-glykol- β -*d*-galaktosid-anhydrid (II): 0.5 g Glykol- β -*d*-galaktosid-anhydrid*) werden in 5 ccm absol. Pyridin mit 0.6 g Triphenylmethylchlorid auf dem Wasserbad im verschlossenen Kölbchen 3 Stdn. erhitzt, die Lösung nach dem Versetzen mit etwa 5 ccm Wasser

mit 80 ccm Äther aufgenommen, diese Lösung mit KHSO_4 -Lösung, dann mit KHCO_3 -Lösung und zuletzt mit Wasser gewaschen, so daß alles Pyridin und alle Salzsäure entfernt sind, und schließlich eingedampft. Der Rückstand wird aus etwa 12 Vol.-Tln. Methanol umkrystallisiert. Zur Analyse wurde bei 78° über P_2O_5 im Vak. bis zur Konstanz getrocknet.

$\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{O}_6$ (448.50). Ber. C 72.30, H 6.29. Gef. C 72.23, H 6.09.

$[\alpha]_D^{25}$: $+0.41^\circ \times 1.3740/0.0483 \times 0.5 \times 1.472 = +15.8^\circ$ (in Chloroform). Mit Eisessig und konz. H_2SO_4 zeigt die Verbindung die Gelbfärbung des Triphenylcarbinols.

Hepta-acetyl- β -*d*-lactosido-äthylchlorhydrin (III): Eine Lösung von 18 g frisch hergestellter Acetobromlactose¹⁾ in 30 ccm Äthylchlorhydrin wird unter Umschütteln in kleinen Portionen mit 11.5 g Silbercarbonat versetzt, wenn die CO_2 -Entwicklung nachläßt, nach Zugabe der ganzen Menge Ag_2CO_3 , 16 Stdn. geschüttelt und die Lösung durch ein mit Kohle gedichtetes Filter von den Silbersalzen abgesaugt. Der Rückstand wird mit im ganzen 80 ccm Aceton nachgewaschen und die vereinigten Filtrate werden mit 900 ccm Wasser versetzt. Bei längerem Aufbewahren im Eisschrank fällt die Substanz in filtrierbarer, äußerlich nicht krystalliner Form aus. Die Fällung aus Aceton wird noch zweimal wiederholt. Die so gewonnene Substanz, Ausb. 6 g, d. s. 33% d. Th., läßt sich leicht pulverisieren, schmilzt aber unscharf bei 95 – 99° und ist äußerlich nicht erkennbar krystallin. Trotzdem ergibt sie brauchbare Analysenzahlen.

$\text{C}_{23}\text{H}_{39}\text{O}_{18}\text{Cl}$ (698.76). Ber. C 48.09, H 5.63, Cl 5.08. Gef. C 47.97, H 5.28, Cl 5.86.

Das Chlor wird beim Kochen mit verd. Natronlauge quantitativ abgespalten. $[\alpha]_D^{25}$: $-0.25^\circ \times 1.7340/0.0895 \times 1 \times 1.466 = -3.3^\circ$. Die Substanz zeigt die Löslichkeit der Acetylzucker.

Glykol- β -*d*-lactosid-anhydrid (IV): Eine genau gewogene Menge Hepta-acetyl- β -*d*-lactosido-äthylchlorhydrin (4.0246 g) wird in 60 ccm absol. Alkohol heiß gelöst. Es werden 60.00 ccm einer 2-n. NaOH zugegeben und die Mischung 7.5 Stdn. rückgekocht. Die blaßgelbe Lösung wird mit der genau berechneten Menge 2-n. HCl versetzt, unter Berücksichtigung der bei der Reaktion abgespaltenen Menge HCl (aus dem Ausgangsmaterial berechnet), so daß keine freie Salzsäure, aber möglichst auch keine durch HCl nicht neutralisierte Natronlauge vorhanden ist. Die in Freiheit gesetzte Essigsäure bleibt dabei außer Betracht. Nach dem Eindampfen im Vak. und Trocknen des Rückstandes im Exsiccator über P_2O_5 wird dieser mit 300 ccm Alkohol portionsweise ausgekocht, die vereinigten Auszüge heiß durch Kohle filtriert und abgekühlt. Das Anhydrid krystallisiert in feinen Nadeln. Ausb. 1.7 g (lufttrocken). Durch Umkrystallisieren aus 170 ccm Methanol wird es gereinigt.

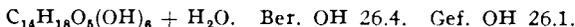
Die lufttrockene Substanz enthält sehr annähernd 2 Mol. Krystallwasser, dessen letzte Anteile erst bei höherer Temperatur abgegeben werden.

0.3282 g Sbst., an der Luft konstant getrocknet, verloren im Exsiccator bei 1 bis 2 mm über P_2O_5 0.0276 g (nach 24 Stdn. konstant), bei 100° über P_2O_5 und bei 1–2 mm weitere 0.0008 g (konstant nach 21 Stdn.), im ganzen also 0.0280 g. Manchmal lassen sich die letzten Anteile Krystallwasser erst bei $140^\circ/1$ –2 mm über P_2O_5 entfernen.

$\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{O}_{11} + 2\text{H}_2\text{O}$ (404.2). Ber. H_2O 8.8. Gef. H_2O 8.5.

¹⁾ C. S. Hudson u. J. M. Johnson, Journ. Amer. chem. Soc. **37**, 1270 [1915].

Hydroxylgruppenbestimmung (mit Pyridin-Essigsäureanhydrid) einer teilweise entwässerten Probe, die etwa noch ein Mol. Wasser enthielt:



Die wasserhaltige Substanz sintert, je nach dem Wassergehalt, verschieden stark und verschieden früh — eine bei 100° getrocknete z. B. bei etwa 150° — und schmilzt bei 207—208°. Die wasserfreie Substanz zeigt den gleichen hohen Schmelzpunkt, ohne vorher zu sintern.

$\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$ (368.33). Ber. C 45.61, H 6.57 (wasserfrei). Gef. C 45.23, H 6.67 (wasserfrei).

Drehung der wasserfreien Substanz: $[\alpha]_D^{25}: + 1.15^\circ \times 1.1736/0.0508 \times 0.5 \times 1.014 = +52.4^\circ$ (in Wasser).

Das Glykol-lactosid-anhydrid ist leicht löslich in Wasser, schwerer in Methanol, Alkohol und Eisessig und sehr schwer bis unlöslich in den sonstigen gebräuchlichen organischen Lösungsmitteln.

Hexa-acetyl-glykol- β -*d*-lactosid-anhydrid (V): 0.5 g Glykol-lactosid-anhydrid (wasserhaltig) werden in 4 ccm eines Gemischs gleicher Teile von absol. Pyridin und Essigsäureanhydrid 16 Stdn. bei Zimmertemp. aufbewahrt. Nach Zusatz von 2 ccm Wasser wird die Mischung im Exsiccator über KOH und KHSO_4 (oder H_2SO_4) zur Trockne verdunstet, der zunächst sirupöse Rückstand mit Wasser verrieben, die dabei entstehenden Flocken abgesaugt und aus 3 ccm absol. Alkohol (Kohle) umkrystallisiert. Ausb. 0.52 g. Schmp. 156°.

$\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{O}_{17}$ (620.28). Ber. C 50.30, H 5.85, $6\text{CH}_3\text{CO}$ 41.6.

Gef. „ 51.34. „ 5.92, „ 42.7.

$[\alpha]_D^{25}: + 0.64^\circ \times 1.1835/0.0374 \times 0.5 \times 1.476 = +27.4^\circ$ (in Chloroform).

Die gleiche Verbindung entsteht aus der bei 140° wasserfrei getrockneten Substanz. Durch Entacetylieren in Methanol mit Natriummethylat wird das Glykol-lactosid-anhydrid mit allen seinen Eigenschaften wiedergewonnen. Insbesondere wurde erneut nach dem Krystallisieren aus Alkohol der Gehalt an Krystallwasser, das z. Tl. erst bei 140° abgegeben wird, nachgeprüft.

Säurespaltung des Glykol- β -*d*-lactosid-anhydrids: 0.35 g des krystallwasserhaltigen Glykol-lactosid-anhydrids werden in 10.00 ccm *n*- H_2SO_4 14 Stdn. auf dem Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wird mit 10.00 ccm *n*-NaOH neutralisiert, nach Zusatz von einem Tropfen Lauge die Lösung im Vak. eingedampft, der Rückstand über P_2O_5 getrocknet, portionsweise mit im ganzen 20 ccm absol. Alkohol heiß extrahiert, die vereinigten Auszüge mit Kohle geklärt und abgekühlt. Es krystallisiert dabei im Laufe einiger Stunden Glykol- β -*d*-glucosid-anhydrid*) aus. Dieses wurde durch Verbrennung, durch Schmelzpunkt und durch Überführen in seine Triacetylverbindung sicher identifiziert.

Fermentspaltungen des Glykol- β -*d*-lactosid-anhydrids.

A) Mit Süßmandel-Emulsin (β -Glucosidase-Wert 1): Die Spaltungen wurden bei p_{H} 5.0 (Acetatpuffer) und 30.0° durchgeführt und jodometrisch²⁾ verfolgt. Die Substratkonzentration entsprach, nach dem Mol.-Gew. umgerechnet, der üblichen von 40 mg Phenol-glykosid in 3 ccm Bestimmungsgemisch. Die Wirksamkeit des Ferments wurde gleichzeitig an Milchzucker geprüft. Zu jedem Versuch wurden 3.0 ccm Substratlösung,

²⁾ B. 51, 780 [1918] v. bes. F. Auerbach u. E. Bodländer, Ztschr. angew. Chem. 36, 605 [1923].

3.0 ccm Puffer und 3.0 ccm Fermentlösung — Trockenrückstand 0.0500 g in 10.0 ccm — zusammengegeben und nach t Min. in 100 ccm Carbonatpuffer eingegossen und titriert.

g Sbst. in 9 ccm Bestimmungsgemisch	Zeit in Min.	Verbr. an n_{10} -Jod ³⁾	% Spaltung	Wertig- keit ⁴⁾
Lactose, H ₂ O (bei vollst. Spalt. 19.0 ccm n_{10} -Jod).				
0.1685	0	9.50	0	—
0.1695	1069	12.70	34	0.007
0.1693	4041	14.80	56	—
Glykol-lactosid-anhydrid, H ₂ O (bei vollst. Spalt. 9.1 ccm n_{10} -Jod)				
0.1706	981	3.00	33	0.007

B) Spaltung mit Luzerne-Emulsin⁵⁾: Die Versuche wurden bei p_H 4.4 (Acetatpuffer) und 30.0^o durchgeführt und die Spaltung jodometrisch gemessen. Im übrigen wurde wie bei dem Süßmandel-Emulsin (s. o.) verfahren. Das Luzerne-Emulsin hatte gegen Phenol- β -*D*-galaktosid eine Wertigkeit von 0.04 (polarimetrisch bestimmt), die angewandte Fermentlösung enthielt 0.0794 g in 10.0 ccm, der Jodverbrauch des Ferments selbst ist berücksichtigt.

g Sbst. in 9 ccm Bestimmungsgemisch	Zeit in Min.	Verbr. an n_{10} -Jod	% Spaltung	Wertig- keit
Lactose, H ₂ O (bei vollst. Spalt. 19.3 ccm n_{10} -Jod).				
0.1702	0	9.65	0	—
0.1700	835	11.10	15	0.002
Glykol-lactosid-anhydrid (bei vollst. Spalt. 10.08 ccm n_{10} -Jod).				
0.1818	810	4.70	47	0.009

C) Spaltung mit Kefir-Pilzen: Die näheren Bedingungen dieser Spaltung sollen an anderer Stelle veröffentlicht werden. Die Bestimmung der Spaltung erfolgte ebenfalls jodometrisch. Als Fermentgehalt von 50 ccm Bestimmungsgemisch wurden (bei Berechnung der Wertigkeit) 0.5 g eingesetzt.

g Sbst. in 9 ccm Bestimmungsgemisch	Zeit in Min.	Verbr. an n_{10} -Jod	% Spaltung	Wertig- keit
Lactose, H ₂ O (bei vollst. Spalt. 18.5 ccm n_{10} -Jod).				
0.1693	0	9.25	0	—
0.1693	60	16.20	75	0.07
Glykol-lactosid-anhydrid (bei vollst. Spalt. 9.25 ccm n_{10} -Jod).				
0.1735	60	4.3	46	0.03

³⁾ Der Jodverbrauch der Fermentlösung allein unter den gleichen Bedingungen ist berücksichtigt (abgezogen).

⁴⁾ z. B.: B. Helferich u. R. Hiltmann, A. 531, 173 [1937].

⁵⁾ K. Hill, Ber. Sächs. Akad. Wiss., math.-physik. Kl. 86, 115 [1934].