

FRIEDRICH CRAMER und FRIEDRICH-MARTIN HENGLEIN

Über Einschlußverbindungen, XIII¹⁾

Die Trennung und Isolierung der Cyclodextrine

Aus dem Chemischen Institut der Universität Heidelberg

(Eingegangen am 6. November 1957)

Durch Anwendung geeigneter Cyclodextrin-Einschlußverbindungen läßt sich ein Trennungsgang für α -, β - und γ -Cyclodextrin ausarbeiten, bei dem spezifische Fällungsreagenzien benützt werden. Der Trennungsgang ermöglicht auch die einfache Isolierung von γ -Dextrin.

In einer früheren Mitteilung dieser Reihe²⁾ haben wir gezeigt, daß die drei Cyclodextrine bei der Bildung von Einschlußverbindungen häufig in sehr spezifischer Weise reagieren. Mit Hilfe der nun verfügbaren Daten ließ sich ein einfacher Trennungsgang für die Cyclodextrine angeben.

Nach der bisher gebräuchlichen Methode wurden die Dextrine aus der mit Enzym abgebauten Stärkelösung durch Trichloräthylen ausgefällt; die weitere Auftrennung wurde mit Brombenzol durchgeführt, wobei die Löslichkeitswerte von FRENCH³⁾ zugrunde lagen. Aus den Werten unserer Tabelle⁴⁾ ergibt sich jedoch, daß die gesamte Menge des in der Enzymlösung vorhandenen γ -Dextrins mit dem α -Dextrin in Lösung blieb und dort verloren ging, da γ -Dextrin beim enzymatischen Abbau nur in recht geringen Mengen gebildet wird. So erklärt sich das Ausbleiben von greifbaren Mengen γ -Dextrin bei dem bisherigen Verfahren.

Bei dem neuen Trennungsgang werden folgende Fällungsmittel verwendet:

1. Ein Gemisch von Tetrachloräthylen und Tetrachloräthan *) zur Fällung der gesamten Dextrine;
2. *p*-Cymol zur Abtrennung von β - und γ -Dextrin;
3. Cyclohexan zur Isolierung von α -Dextrin;
4. Fluorbenzol zur Isolierung von β -Dextrin;
5. Anthracen zur Isolierung von γ -Dextrin.

Im Trennungsgang (Schema A) werden zunächst β - und γ -Dextrin gemeinsam mit *p*-Cymol gefällt und dann mit Fluorbenzol voneinander getrennt. γ -Dextrin läßt sich aus der Mutterlauge als Anthracenverbindung besonders rein darstellen. α -Dextrin wird mit Cyclohexan isoliert. Die Erfassungsgrenzen und Ausgangsbedingungen sind folgende:

	Erfassungsgrenze	Bedingung
α -Dextrin	11—62%	$\alpha < 73\%$
β -Dextrin	6.25—94%	$\beta > \gamma$
γ -Dextrin	3.7—16.3%	$\gamma < 20\%$

1) XII. Mittel.: F. CRAMER und F. M. HENGLEIN, Chem. Ber. **90**, 2572 [1957].

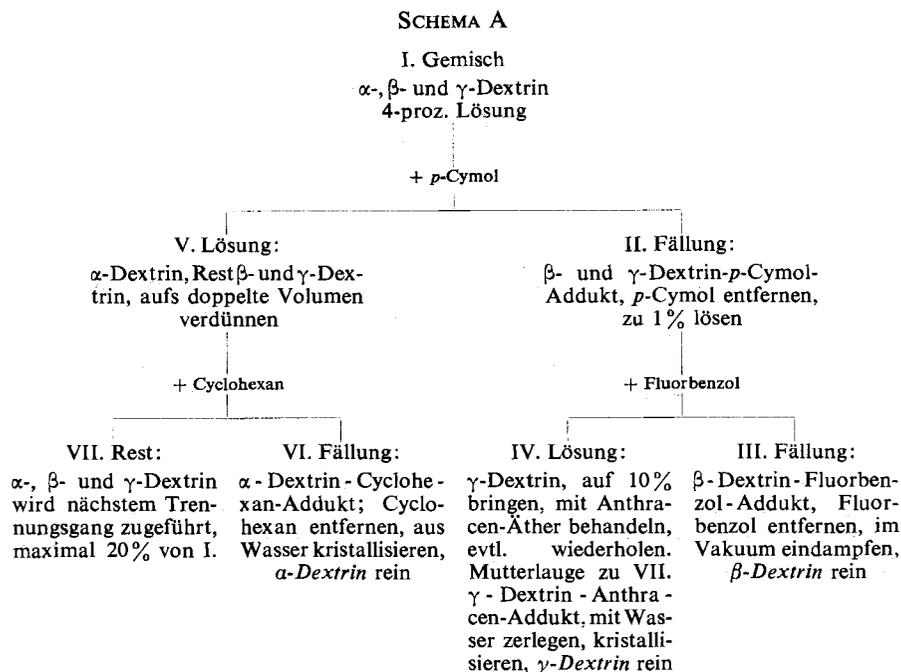
2) F. CRAMER und F. M. HENGLEIN, Chem. Ber. **90**, 2561 [1957] (XI. Mittel.).

3) D. FRENCH, L. LEVINE, J. H. PAZUR und E. NORBERG, J. Amer. chem. Soc. **71**, 353 [1949].

4) S. Fußnote²⁾, S. 2567.

*) Die bisher beschriebene Anwendung von Trichloräthylen ist etwas weniger günstig.

Diese neue Trennungsmethode unter Verwendung spezifischer Fällungsmittel vermeidet das Eindampfen größerer Flüssigkeitsmengen. Die Verbindungen fallen in sehr reinem Zustand an. Der Verlauf der Trennung wurde in den einzelnen Stufen papierchromatographisch und mit Hilfe der optischen Drehung verfolgt.



Die DEUTSCHE FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT, der VERBAND DER CHEMISCHEN INDUSTRIE und die BADISCHE ANILIN- & SODA-FABRIK haben die Arbeit durch Sachbeihilfen unterstützt.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

1. *Bereitung des Enzyms*: In Anlehnung an bekannte Vorschriften^{5,6,7)} wurden die Kulturen von *Bac. macerans* zunächst auf Agar-Platten, von dort auf Kartoffeln/Haferflocken/CaCO₃ in 100-ccm-Erlenmeyerkolben und schließlich in 2-l-Fernbachflaschen auf Kartoffeln/Haferflocken/CaCO₃/1000 ccm Wasser + Spurenelement-Lösung nach SCHWIMMER⁶⁾ ohne Belüftung gezüchtet. Nach 2 Wochen enthielt die Lösung etwa 6 Enzymeinheiten. Die Enzymlösung wurde zentrifugiert, mit Thymol versetzt und bakterienfrei filtriert, sie ist längere Zeit haltbar.

2. *Stärkeabbau*: 3 l 3-proz. Stärkelösung werden mindestens 1 Stde. bei 125–130° im Autoklaven gehalten und nach dem Abkühlen mit 150 ccm obiger Enzymlösung versetzt. Man beläßt bei 37–40° und verfolgt die Bildung der Cyclodextrine entweder mit dem Jod-

⁵⁾ E. B. TILDEN und C. S. HUDSON, *J. Bacteriol.* **43**, 527 [1942]; *J. Amer. chem. Soc.* **64**, 1432 [1942].

⁶⁾ S. SCHWIMMER und J. A. GARIBALDI, *Cereal Chem.* **29**, 108 [1952].

⁷⁾ W. S. HALE und L. C. RAWLINS, *Cereal Chem.* **28**, 49 [1951].

test oder papierchromatographisch⁸⁾. Nach etwa 10 Tagen ist das Maximum der Cyclodextrin-Konzentration erreicht. Man zentrifugiert, klärt die Lösung mit Tierkohle und dampft i. Vak. auf 700 ccm ein.

3. *Fällung von α -, β - und γ -Dextrin*: 700 ccm aus 2. werden mit einem Überschuß eines Gemisches aus gleichen Teilen *Tetrachloräthyl*en und *Tetrachloräth*an 48 Stdn. geschüttelt und der Niederschlag (28.4 g, im Exsikkator getrocknet) abzentrifugiert. Die Mutterlauge hat noch eine Drehung von $\alpha = 8.2^\circ$, enthält aber im Chromatogramm keine Dextrine mehr und wird verworfen. Die Cyclodextrin-Tetrachloräthan-Verbindung wird in ca. 500 ccm Wasser gelöst, 1 Stde. Wasserdampf eingeleitet, wobei man gleichzeitig erwärmt, damit durch Kondenswasser keine Verdünnung eintritt. Die nunmehr klare Lösung stellt man auf eine Konzentration von 4% ein (Stufe I) ($\alpha = 6.0^\circ$); man rechnet mit einer durchschnittlichen Drehung von $[\alpha]_D^{20}$: + 150° für die Cyclodextrine.

4. *Trennung (Schema A)*

II. und III. *β -Dextrin*: Die Lösung I (aus 3.) wird 48 Stdn. mit einem Überschuß von *p*-Cymol geschüttelt. Das erhaltene Addukt (14.7 g) wird in 100 ccm Wasser gelöst und durch 1stdg. Wasserdampfdestillation von *p*-Cymol befreit. Man stellt auf 1.0% (α_D : + 1.5°) ein. Chromatogramm: β -Dextrin stark, γ -Dextrin schwach. Die Lösung wird mit Überschuß von *Fluorbenzol* 48 Stdn. geschüttelt. Man erhält 13.4 g β -Dextrin-Addukt, welches mit Wasserdampf zerlegt und aus einer 10-proz. wäßrigen Lösung zur Kristallisation gebracht wird. Die Mutterlauge enthält noch 1.42% β -Dextrin. Ausb. 11 g reines *β -Dextrin*. $[\alpha]_D^{20}$: + 160°.

IV. *γ -Dextrin*: Das Filtrat von III wird durch Wasserdampfdestillation von *Fluorbenzol* befreit und i. Vak. auf eine Konzentration von 10% (α_D : + 15°) eingeeengt. Im Chromatogramm wird nur γ -Dextrin sichtbar. Die Lösung wird mit einem Überschuß einer gesätt. Lösung von *Anthracen* in Äther überschichtet. Nach 6 Tagen erhält man 1.4 g Anthracen-Addukt. Das Addukt wird mit 200 ccm heißem Wasser gelöst und vom frei gewordenen Anthracen durch Absaugen und Ausäthern befreit. Die Lösung wird i. Vak. stark eingedampft und das γ -Dextrin aus wenig Wasser, evtl. unter Methanol-Zusatz, zur Kristallisation gebracht. 0.9 g, $[\alpha]_D^{20}$: + 168°. Im Chromatogramm nur *γ -Dextrin*. Das Filtrat der Anthracenfällung wird chromatographisch auf seinen Restgehalt an Dextrinen geprüft. Wenn nur wenig α - und β -Dextrin vorhanden sind, wird i. Vak. erneut auf 10% konzentriert und die Behandlung wiederholt. Andernfalls vereinigt man die Mutterlauge mit VII.

V. und VI. *α -Dextrin*: Das Filtrat der *p*-Cymol-Fällung (II., III.) wird durch Wasserdampfdestillation von den noch in Lösung verbliebenen Resten an *p*-Cymol befreit und auf das doppelte Ausgangsvolumen (I) verdünnt*). Dann schüttelt man 3 Tage mit einem Überschuß von *Cyclohexan*. Man erhält 13 g α -Dextrin-Cyclohexan-Addukt, welches mit Wasserdampf zerlegt wird. α -Dextrin (Löslichkeit in H₂O 12.4%) kristallisiert aus etwa 30-proz. Lösung. 10.5 g α -Dextrin; $[\alpha]_D^{20}$: + 145°. Chromatogramm: reines *α -Dextrin*.

VII. Die Mutterlauge enthält hauptsächlich α -Dextrin (0.22%), etwas β -Dextrin (0.125%) und etwas γ -Dextrin (0.07%). Sie wird nach Entfernen des Cymols dem nächsten Trennungsgang zugeführt.

⁸⁾ Zur Papierchromatographie s. F. CRAMER und D. STEINLE, Liebigs Ann. Chem. **595**, 81 [1955]; wir verwenden als Lösungsmittel jetzt sek. Butanol/Pyridin/Wasser (1:1:1).

*) Diese Vorsichtsmaßnahme des Verdünnens, die ein Mitreißen von β -Dextrin verhindern soll, ist nicht unbedingt notwendig.