

Über die Gentiobiose.

Von

Dr. Géza Zemplén.

(Aus dem chemischen Institute der Hochschule für Forstwesen in Selmeczbánya.)

(Der Redaktion zugegangen am 11. Mai 1913.)

Man kennt derzeit sieben Disaccharide, die aus je zwei d-Glukose-Molekülen aufgebaut sind; nämlich: Maltose, Isomaltose, Cellobiose, Gentiobiose, Turanose, Trehalose und Isotrehalose. Die fünf erstgenannten Zucker unterscheiden sich scharf von den zwei letzteren durch ihr Reduktionsvermögen, ihre Fähigkeit, Osazone zu bilden und bei der Oxydation mit Brom 12 atomige einbasische Bionsäuren zu liefern. Unter diesen reduzierenden Disacchariden sind eigentlich nur Maltose und Cellobiose gut bekannt, die Isomaltose konnte bis jetzt nur in Form ihres Osazones bzw. Osones isoliert werden; Gentiobiose und Turanose sind ebenfalls wegen ihrer schweren Zugänglichkeit wenig untersucht geblieben.

Um Aufklärung über Konstitution bzw. Konfiguration der Disaccharide zu gewinnen, ist es aber nötig, möglichst genau gerade die Eigenschaften der isomeren, aus gleichen Bausteinen zusammengesetzten Zucker kennen zu lernen. Deshalb nahm ich eine genauere Untersuchung der Gentiobiose vor, die bisher nur von Bourquelot und Hérissey¹⁾ dargestellt wurde. Bei der Gewinnung des Zuckers stieß ich auf große Schwierigkeiten, indem die durch fraktionierte Extraktionen bzw. Fällungen mit Alkohol erhaltenen Sirupe auch nach längerem Stehen nicht krystallisieren wollten.

Da ich gleichzeitig mich mit der Untersuchung von Cellobiosederivaten ebenfalls beschäftigte, fiel mir die gute Krystal-

¹⁾ Em. Bourquelot und H. Hérissey, Comptes rendus, Bd. 132, S. 571 (1900); Bd. 135, S. 290, 399 (1901). — Journal de Pharmacie et de Chimie [6], Bd. 16, S. 420 (1901).

lisationsfähigkeit und Schwerlöslichkeit der Oktacetylcellobiose auf, und da kam ich auf den Gedanken, ob es nicht möglich wäre, durch Acetylierung der rohen Gentiobiosepräparate eine Reinigung der Produkte zu erzielen, eventuell die noch unbekannte Acetylverbindung in reinem Zustande zu gewinnen.

Meine Hoffnungen haben sich bei den Versuchen erfüllt, indem es mir gelang, die schwer lösliche, hochschmelzende und gut krystallisierende Oktacetylgentiobiose in reinem Zustande zu gewinnen. Das Präparat ist leicht zu isolieren sogar aus stark verunreinigten Rohprodukten, sodaß die Methode der Acetylierung ein einfaches und rasches Verfahren der Gentiobiosegewinnung darstellt.

Durch Verseifung der Oktacetylverbindung gewann ich die freie Gentiobiose als Sirup. Ich zweifle nicht daran, daß der Zucker nach mehrwöchentlichem Stehen krystallisieren wird. Daß es sich tatsächlich um Gentiobiose handelt, habe ich durch die Darstellung des analysenreinen Phenylgentiobiosazons, durch die Ermittlung des Reduktionsvermögens der bei der Verseifung des Oktacetylkörpers erhaltenen Produktes und durch die Spaltung des Gentiobiosesirups mittels Emulsin bewiesen.

Die Krystallisationsfähigkeit der Acetylverbindungen der Zucker wird noch wahrscheinlich in manchen Fällen bei sonst schwer krystallisierenden Zuckern die Isolierung derselben erleichtern.

Experimenteller Teil.

Darstellung der Oktacetylgentiobiose aus gereinigten Präparaten.

1 kg gepulverter Enzianwurzeln (*Radix gentianae germanicae pulv.*) werden in 8,5 l siedendes Wasser, das Calciumcarbonat suspendiert enthält, eingetragen, und die Flüssigkeit 10 Minuten gekocht. Die Masse wird koliert, dann unter 200 Atmosphären gepreßt. Das braungrüne Filtrat wird jetzt mit etwa 3,5 kg einer 5%igen Lösung von kolloidalem Eisenhydroxyd stark gerührt, wobei ein voluminöser Niederschlag

entsteht. Diese Methode zur Klärung von stark verunreinigten und Kolloide enthaltenden Flüssigkeiten wurde zuerst von L. Michaelis und P. Rona¹⁾ vorgeschlagen. Um die nötige Menge der Eisenhydroxydlösung zu ermitteln, vermischt man die Masse mit wenig reiner Tierkohle und prüft, nach zeitweisem Zusatz von Eisenhydroxyd, ob das Filtrat einer Probe durch die Tierkohle getrübt und schlecht filtrierbar ist. Diese Eigenschaften zeigen sich bei der Filtration der Flüssigkeit, wenn nicht genügende Mengen der Eisenhydroxydlösung zugegen sind. Ist die nötige Menge erreicht, so gelingt die Filtration sehr leicht, das Filtrat ist vollkommen klar und enthält kaum nachweisbare Eisenmengen. Man muß sich hüten vor einem Überschuß der Eisenlösung, denn der ausgeschiedene Niederschlag geht dann teilweise wieder in Lösung. Die Flüssigkeit wird jetzt auf große Filter gegossen, und wenn nichts mehr abtropft, wird der Rückstand unter 200 Atmosphären abgepreßt. Das Filtrat wird mit wenig Tierkohle aufgeköcht, filtriert und unter vermindertem Druck auf etwa 1 l verdampft. Die Flüssigkeit enthält nach der Titration mit Fehlingscher Lösung 78 g Zucker auf d-Glukose berechnet. Sie wird mit gewöhnlicher Bäckerhefe bei Zimmertemperatur in Gärung gesetzt, und nach etwa 24 Stunden, wenn die Gärung nachläßt, werden die Proteine wiederum mit kolloidalem Eisenhydroxyd entfernt, dann mit Tierkohle gekocht, und das Filtrat, das jetzt bei der Titration 32 g Zucker auf d-Glukose berechnet enthält, unter vermindertem Druck verdampft. Eine Probe der nach der Gärung erhaltenen geklärten Flüssigkeit wurde mit Phenylhydrazinchlorhydrat und Natriumacetat $\frac{5}{4}$ Stunden im Wasserbade erwärmt. In der Hitze war keine Ausscheidung von Osazon zu beobachten, dagegen gab das Filtrat nach dem Erkalten eine kräftige Fällung von amorphem Phenylgentiobiosazon.

Der Abdampfrückstand wurde mit 1 l 90%igem Alkohol ausgeköcht. Beim Erkalten der Flüssigkeit wurde eine amorphe

¹⁾ Biochem. Zeitschrift, Bd. 2, S. 219 (1906); Bd. 5, S. 365 (1907); Bd. 7, S. 329 (1908); Bd. 8, S. 356; Bd. 13, S. 121; Bd. 14, S. 476 (1908); Bd. 16, S. 60; Bd. 18, S. 375, 514 (1909).

Masse ausgeschieden, die spärliche Krystallisation zeigte. Die Flüssigkeit wurde verdampft, der Rückstand mit Calciumcarbonat vermischt und im Soxhletapparat mit Methylalkohol extrahiert. Die methylalkoholische Lösung wurde unter Umrühren in absoluten Alkohol gegossen, der ausgeschiedene flockige Niederschlag mehrmals durch Dekantation mit absolutem Alkohol gewaschen, endlich abgesogen und unter vermindertem Druck über Phosphorpentoxyd getrocknet. Ausbeute 16 g. Das Präparat lieferte bei der Osazonprobe bei der Abkühlung der ersten Mutterlauge gleich krystallisiertes Phenylgentiobiosazon. Da eine weitere Fraktionierung des Präparates nicht zu krystallisierenden Zuckersirupen führte, versuchte ich die Acetylierung.

15 g des amorphen gentiobiosehaltigen Präparates wurden mit 60 ccm Essigsäureanhydrid und 8 g Natriumacetat auf dem Wasserbade erwärmt. Die Reaktionsmasse wurde nach vollständiger Lösung noch etwa 5 Minuten weiter erhitzt und in $\frac{3}{4}$ l kaltes Wasser gegossen. Es schied ein rötlichgelbes Öl aus; die Mutterlauge wurde abgegossen, mit frischem Wasser ersetzt, und die Operation unter Reiben und Umrühren wiederholt. Bald wurde das Produkt fest und krystallinisch. Die erste Mutterlauge schied über Nacht nahezu farblose, mit bloßem Auge sichtbare Nadelchen aus. Die Niederschläge wurden abgesaugt und jede für sich verarbeitet. Das aus der Mutterlauge gewonnene Produkt ließ sich durch Umkrystallisieren zunächst aus konzentriertem, dann aus 50%igem Alkohol leicht rein gewinnen. Ausbeute 0,5 g. Die Hauptmenge des Niederschlages bot bei den Reinigungsversuchen größere Schwierigkeiten. Beim Umlösen aus heißem Alkohol nahmen nämlich die sonst schön ausgebildeten Krystallnadeln färbende Verunreinigungen mit sich, die in alkoholischer Lösung mit Tierkohle nicht zu beseitigen waren. Endlich führte wiederholtes Umkrystallisieren aus heißem 50%igem Alkohol zum Ziele. Ausbeute 0,7 g. Wie wir später sehen werden, läßt sich die Reinigung des Produktes viel leichter und mit besserem Erfolge ausführen durch Anwendung von Methylalkohol.

Das Präparat bestand aus nahezu farblosen, seidenglän-

zenden langen Nadeln. Im Kapillarrohr erhitzt, begann es bei 186° zu sintern und schmolz vollständig bei 193° zu einer schwach gelben Flüssigkeit.

Für die Analyse wurde unter vermindertem Druck über Phosphorpentoxyd bei gewöhnlicher Temperatur getrocknet.

0,1559 g gaben 0,2836 g CO_2 und 0,0839 g H_2O .

Berechnet für Oktacetylgentiobiose $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{O}_{19}$ (676,29):

49,54% C; 5,65% H.

Gefunden: 49,61% C; 6,02% H.

Für die optische Bestimmung diente die Lösung in Chloroform.

0,1693 g Substanz; Gesamtgewicht 9,825; spezifisches Gewicht 1,473; drehte Natriumlicht im 1 dm-Rohr bei 20° um $-0,17^{\circ}$ nach links; mithin

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -5,3^{\circ} \text{ in Chloroform.}$$

Nach der Verseifung gab das Präparat ein Osazon, das sämtliche Eigenschaften des später zu beschreibenden Phenylgentiobiosazons zeigte.

Gewinnung der Oktacetylgentiobiose aus stark verunreinigten Rohprodukten.

Für die Versuche diente als Ausgangsmaterial ein Enzianextrakt, Extractum Gentianae spirituosum aquosum spissum der Firma Thallmayer u. Seitz in Budapest. 1 kg des Extraktes wurde in 5 l Wasser gelöst, mit Bäckerhefe ausgegoren, die Flüssigkeit einmal mit Tierkohle aufgekocht und das Filtrat unter vermindertem Druck unter mehrmaligem Zusatz von absolutem Alkohol möglichst stark verdampft.

Der Rückstand wird mit 96%igem Alkohol, nachher mit Methylalkohol ausgekocht. Der äthylalkoholische Auszug wurde verdampft, der Rückstand mit Methylalkohol ausgekocht und die vereinigten methylalkoholischen Auszüge in absoluten Alkohol gerührt. Der flockige Niederschlag wurde mehrmals mit Alkohol dekantiert, dann abgesaugt und unter vermindertem Druck getrocknet.

Um zu erfahren, ob das Präparat Gentiobiose enthält, unterwarf ich es der Osazonprobe. Beim Abkühlen der heißen Flüssigkeit waren nur geringe Mengen eines amorphen Osazons

ausgeschieden zum Zeichen dafür, daß die Gentiobiose nur einen kleinen Bruchteil des Präparates ausmachen konnte.

Durch zweckmäßige Durchführung der Acetylierung und Reinigung des erhaltenen Rohproduktes gelang es mir doch leicht, aus dem obigen Präparat Oktacetylgentiobiose zu gewinnen und zwar in reinerem Zustande als vorher bei der Verarbeitung der reineren Präparate, wegen der besseren Methodik, die ich in diesem Falle anwandte.

120 g des Rohproduktes wurden mit 480 ccm Essigsäureanhydrid und 60 g wasserfreiem, geschmolzenem Natriumacetat eine halbe Stunde auf dem Wasserbade erwärmt. Die dunkelbraune Flüssigkeit wurde in 4 l Wasser gegossen, die Mutterlauge des ausgeschiedenen Niederschlages oft erneuert und stark gerührt. Nach einiger Zeit erstarrte die ganze Masse und ließ sich leicht zerpulvern. Sie wurde abgesaugt, mit Wasser gewaschen, unter 200 Atmosphären ausgepreßt und in 800 ccm warmem Methylalkohol gelöst. Aus der dunkelbraunen Flüssigkeit schieden sich innerhalb 10 Tagen hellgelbe, sphärische, krystallinische Aggregate aus. Die Mutterlauge wurde abgossen, der Niederschlag mit kaltem Alkohol gewaschen, dann in 250 ccm heißem Alkohol gelöst und erkalten gelassen. Die Oktacetylgentiobiose schied sich hierbei in langen, etwas gefärbten Nadeln aus. Sie wurden abgesaugt und in 250 ccm 50%igem heißen Alkohol gelöst und nach Zusatz von wenig Tierkohle filtriert. Die Verbindung fällt beim Erkalten der Flüssigkeit in analysenreinem Zustande in farblosen, langen, seidenglänzenden Nadeln aus. Ausbeute 3,5 g.

Das Produkt sintert beim Erhitzen im Kapillarrohr bei 192° und schmilzt vollständig bei 195° zu einer farblosen Flüssigkeit. Es löst sich leicht in Chloroform, Aceton, heißem Benzol, heißem Essigäther, weniger in heißem Alkohol; schwer löslich in kaltem Alkohol und in Äther, nahezu unlöslich in Petroläther und in heißem Wasser. In wasserhaltigem Alkohol löst es sich leichter als in absolutem.

Für die Analyse wurde unter vermindertem Druck über Phosphorpentoxyd bei gewöhnlicher Temperatur getrocknet.

0,1383 g gaben 0,2495 g CO_2 und 0,0716 H_2O .

Berechnet für Oktacetylgentiobiose $C_{28}H_{38}O_{19}$ (676,29):

49,54% C; 5,65% H.

Gefunden: 49,20% C; 5,79% H.

Für die optische Bestimmung diente die Lösung in Chloroform.

0,2694 g; Gesamtgewicht der Lösung 13,8234 g; spezifisches Gewicht 1,472; drehte Natriumlicht im 1 dm-Rohr bei 20° um $-0,16^{\circ}$ nach links; mithin

$$[\alpha]_D^{20} = -5,6^{\circ}.$$

Um das Reduktionsvermögen der freien Gentiobiose zu bestimmen, verfuhr ich wie folgt: 0,1828 g Oktacetylgentiobiose, die nach der Theorie 0,0925 g Gentiobiose entsprechen, wurden in ein Gemisch aus 10 ccm Wasser und 10 ccm Alkohol warm gelöst, dann 1 ccm 33%iger Kalilauge zugesetzt und mit Fehlingscher Lösung auf dem Wasserbade erwärmt. Nach dem Verdampfen der Hauptmenge des Alkohols kann man die Reduktion gut beurteilen. Zunächst gab ich auf einmal 10 ccm Fehlingsche Lösung hinzu, und nachdem diese völlig reduziert waren, setzte ich nach und nach je 0,2 ccm zu der Flüssigkeit. Im ganzen wurden 12,0 ccm Fehlingsche Lösung verbraucht. Demnach reduziert 1 g der freien Gentiobiose 130 ccm Fehlingsche Lösung. Nach den Angaben von Bourquelot und Hérissé steht das Reduktionsvermögen der Gentiobiose nahe demjenigen der Maltose. Diese Forscher fanden 0,081 g Gentiobiose auf 10 ccm Fehlingsche Lösung. Auf 1 g des Zuckers berechnet sind das 123,5 ccm, während ich etwas mehr, 130 ccm, fand. Die Maltose reduziert 128,5, die Cellobiose 153 ccm Fehlingsche Lösung auf 1 g Zucker berechnet.

Phenylgentiobiosazon.

0,7 g Oktacetylgentiobiose werden in ein Gemisch aus 45 ccm Wasser und 45 ccm Alkohol heiß gelöst, rasch abgekühlt und mit 2,5 ccm 33%iger Kalilauge vermischt. Es entsteht eine klare, schwach gelbliche Lösung, die genau mit Essigsäure neutralisiert und unter vermindertem Druck auf etwa 10 ccm eingeengt wird. Jetzt wird 0,7 g Phenylhydrazinchlorhydrat und 0,5 g Natriumacetat zugesetzt und $\frac{5}{4}$ Stunden im Wasserbade erwärmt. Die hellgelbe Flüssigkeit scheidet

beim Abkühlen sternartig geordnete, kompakte, citronengelbe, krystallinische Komplexe aus, die abgesaugt, mit Äther gewaschen und unter vermindertem Druck über Natronkalk getrocknet werden. Ausbeute 0,11 g.

Dasselbe Produkt kann direkt aus den gereinigten Flüssigkeiten nach der Gärung der Enzianextrakte erhalten werden. Allerdings ist das so erhaltene Präparat weniger rein.

Zur weiteren Reinigung wird das rohe Osazon in wenig Essigäther gelöst und mit absolutem Äther bis zur Trübung versetzt. Nach einiger Zeit beginnt die Ausscheidung von citronengelben, sternförmig geordneten Nadeln. Diese lassen sich jetzt schon bequem auch aus heißem Wasser umlösen, ohne an der Luft sich bräunende Präparate zu liefern. Aus heißem Wasser krystallisiert das Osazon in schönen, kurzen, zugespitzten Prismen.

Im Kapillarrohr rasch erhitzt, schmilzt das Produkt zwischen 160 und 170° unter Braunfärbung und Zersetzung. Der beobachtete Zersetzungspunkt hängt stark von der Art des Erhitzens ab. Bourquelot und Herissey geben den Schmelzpunkt 142° an. Allerdings habe ich keine gereinigten Präparate des Gentiobiosazons beobachtet, die nach dem vorschriftsmäßigen Verfahren der Schmelzpunktbestimmung der Osazone einen tieferen Schmelzpunkt als 160° gezeigt hätten.

Für die Analyse wurde unter vermindertem Druck über Phosphorpentoxyd bei 80° getrocknet.

0,1763 g Substanz gaben 0,3599 g CO₂ und 0,0979 g H₂O.

0,2012 g gaben 19,8 ccm Stickstoff über 33%ige Kalilauge (b = 712 mm, t = 18°).

Berechnet für Phenylgentiobiosazon C₂₄H₃₂O₉N₄ (520,30):
55,35% C; 6,20% H; 10,77% N.

Gefunden: 55,68% C; 6,21% H; 10,67% N.

Für die optische Bestimmung diente die Lösung in Pyridin und Alkohol, um die erhaltenen Werte mit den von Neuberger¹⁾ vorgeschlagenen Zahlen vergleichen zu können.

¹⁾ C. Neuberger, Über die Reinigung der Osazone und zur Bestimmung ihrer optischen Drehungsrichtung. Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. 32, S. 3384—3388 (1899).

0,1532 g in 4 ccm Pyridin und 6 ccm Alkohol gelöst; Gesamtgewicht der Lösung 8,7868 g; spezifisches Gewicht 0,874; drehte Natriumlicht bei 20° im 1 dm-Rohr um — 1,16° nach links; mithin

$$[\alpha]_D^{20} = - 76,1^\circ \text{ in Pyrin und Alkohol.}$$

Versuch zur Isolierung der freien Gentiobiose.

2 g Oktacetylgentiobiose wurden in 80 ccm absolutem Alkohol suspendiert und mit 5 ccm 33%iger Kalilauge geschüttelt. Die Krystalle der Oktacetylgentiobiose verwandeln sich dabei rasch unter Auftreten von Essigäthergeruch in eine körnige, rasch zu Boden sinkende Substanz, die die Kaliumverbindung der Gentiobiose darstellt. Sie wird nach dem Absetzen mehrmals mit absolutem Alkohol gewaschen, in Wasser gelöst, mit Essigsäure neutralisiert (Lackmus) und die Lösung unter vermindertem Druck auf einige Kubikzentimeter verdampft, dann auf dem Wasserbade bis zur Trübung mit absolutem Alkohol versetzt und stehen gelassen. Nach dem Erkalten scheidet sich ein farbloser Sirup aus, der nach einigen Tagen zu opalisieren beginnt. Ich zweifle nicht daran, daß der Zuckersirup nach einigen Wochen krystallinisch erstarrt.

0,2 g des Sirups wurden in Wasser gelöst und mit 0,1 g Emulsin in Gegenwart von Toluol 48 Stunden bei 32° aufbewahrt. Nach Entfernung der Proteine mit Natriumacetat schieden sich bei der Osazonprobe aus der heißen Flüssigkeit lange, citronengelbe Nadeln von Phenylglukosazon aus. Schmelzpunkt gegen 205°. Der Versuch stimmt ebenfalls mit der Beobachtung von Bourquelot und Hérissé überein, wonach die Gentiobiose durch Emulsin hydrolysiert wird.
