

angibt. Als besonderes Ergebnis führt H. Bersch an, daß die von ihm hergestellte Homoisovanillinsäure bei 127—129° schmolz, während E. Späth und N. Lang 122.5—124.5° angaben. Da unser Schmelzpunkt unkorrigiert bestimmt war, ist diese Differenz nicht so groß, um dadurch, wie Bersch es tut, zu erklären, daß unsere Werte für C und H durch die Verunreinigungen um 0.3% abwischen. Da Bersch seinen Schmelzpunkt dem von uns erhaltenen kritisch gegenüberstellt, muß er korrigiert bestimmt sein. Wir haben nun den von H. Bersch zu 127—129° ermittelten Schmelzpunkt der Homoisovanillinsäure genauer untersucht und gefunden, daß er noch immer nicht richtig ist, sondern auf 131.5—132° (korr., offen oder Vak.-Röhrchen) erhöht werden kann. Auch der Schmelzpunkt der Carbäthoxy-isovanillinsäure, den Bersch angibt, ist um 2° zu tief, er liegt in Wirklichkeit bei 116.5—117° (korr., offen. oder Vak.-Röhrchen).

**252. Burckhardt Helferich und Friedrich von Stryk:  
Methansulfonsäureester in der Zuckergruppe, V. Mitteil.\*): Über die  
Ferment-Spaltung von Trehalose.**

[Aus d. Chem. Laborat. d. Universität Leipzig.]

[Eingegangen am 9. Oktober 1941.]

Die Geschwindigkeit der Veresterung verschiedener Hydroxyle einer Polyoxyverbindung hängt von der Natur dieser Hydroxyle ab. So ist es bei genügend milden Versuchsbedingungen gelungen, von den Hydroxylen der Glucose vorwiegend das endständige, primäre 6-Hydroxyl an Methansulfonsäure zu verestern und direkt von der Glucose zu Derivaten der 6-Mesyl-glucose zu kommen<sup>1)</sup>. Ähnlich lässt es sich auch für Oligosaccharide, ja sogar für Polysaccharide, durchführen<sup>2)</sup>, trotzdem die Methansulfonsäure wesentlich kleiner ist, als die für gleiche Zwecke schon oft verwandte *p*-Toluolsulfonsäure. Andererseits macht es, im Gegensatz zur Toluolsulfonsäure, keine Schwierigkeiten, den Rest der Methansulfonsäure in alle Hydroxyle einer Polyoxyverbindung, also z. B. eines Oligosaccharides, einzuführen<sup>2)</sup>.

Im folgenden wird zunächst die Einwirkung von 2 Mol. Mesylchlorid auf  $\beta$ -Methyl-celllobiosid beschrieben. Es ergibt sich in sehr guter Ausbeute ein 6.6'-Dimesyl- $\beta$ -methyl-celllobiosid (I), das als Pentaacetyl-Verbindung krystallisiert erhalten werden konnte. Wie die früher beschriebene Ditosylverbindung liefert diese Dimesylverbindung, besonders leicht und glatt, das schon bekannte 6.6'-Dijod-pentaacetyl- $\beta$ -methyl-celllobiosid<sup>3)</sup>.

Im Molekül der Trehalose lassen sich glatt alle Hydroxyle an Methansulfonsäure zu einer krystallinen Oktamesyltrehalose verestern (II). Wird aber unter besonders milden Bedingungen und mit nur etwas mehr als 1 Mol. Mesylchlorid gearbeitet, so lässt sich nach Acetylieren der freibleibenden Hydroxyle eine krystallisierte, einheitliche 6-Mesyl-heptaacetyl-trehalose (III) in sehr guter Ausbeute gewinnen. In ihr ist offenbar eins der zwei gleichwertigen, primären, endständigen 6-Hydroxyle in der Trehalose an Methansulfonsäure verestert, die übrigen Hydroxyle sind acety-

\*): IV. Mitteil.: B. 74, 719 [1941].

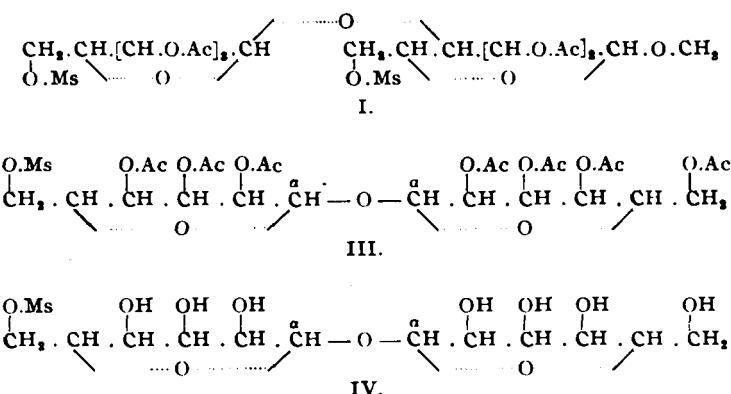
<sup>1)</sup> B. Helferich u. A. Gnüchtel, B. 71, 713 [1938]; B. Helferich, H. Dressler u. R. Griebel, Journ. prakt. Chem. [2] 153, 285 [1939].

<sup>2)</sup> Siehe F. v. Stryk, Dissertation, Leipzig 1940 (15).

<sup>3)</sup> B. Helferich, E. Bohm u. S. Winkler, B. 63, 997 [1930].

liert. Aus dieser Verbindung läßt sich durch sehr vorsichtige Entacetylierung eine zwar bisher nicht krystallisierte, offenbar aber doch recht reine 6-Mesyl-trehalose (IV) herstellen, die uns zu einer Prüfung der fermentativen Spaltbarkeit von Trehalose diente:

Trehalose wird durch Hefeextrakt — auf Grund der darin vorhandenen  $\alpha$ -Glucosidase — gespalten. Trehalose wird nach Weidenhagen aber auch durch gewöhnliches Süßmandeleumulsin hydrolysiert, was auf einen, wenn auch nur geringen Gehalt des Süßmandeleumulsins an  $\alpha$ -glucosidatischer Wirkung zurückgeführt werden kann<sup>4)</sup>. Da in der Trehalose die beiden Glucosereste als  $\alpha$ -Glucose vorliegen und einander gleichwertig sind, so kann nach der Theorie von Weidenhagen<sup>5)</sup> ein trehalosespaltendes Ferment an 2 Stellen des Zuckers angreifen — sich anlagern — um die Spaltung durchzuführen. Durch Einführung der Mesylgruppe in das 6-Hydroxyl vom Zuckeranteil eines  $\beta$ -d-Glucosids wird die fermentative Spaltbarkeit dieses Glucosids durch Süßmandeleumulsin praktisch aufgehoben<sup>6)</sup>. Nach den bisherigen Erfahrungen ist die  $\alpha$ -Glucosidase gegen Änderungen im Zuckeranteil ihres Substrates noch empfindlicher<sup>7)</sup>. So war also anzunehmen, daß eine Trehalose, in der das 6-Hydroxyl eines  $\alpha$ -Glucosidase-Anteils mesyliert war, die Fähigkeit, fermentativ von diesem mesylierten Glucoseanteil aus gespalten zu werden, verloren. Andererseits sollte der andere, unverändert gebliebene  $\alpha$ -Glucoseanteil eine solche fermentative Spaltung, wenn auch im ganzen langsamer, noch ermöglichen. Die Versuche haben diese Annahme voll bestätigt. Ein Süßmandeleumulsinpräparat, dessen Wertigkeit gegenüber Trehalose rund  $0.6 \times 10^{-3}$  beträgt, spaltet 6-Mesyl-trehalose auch noch, aber nur um etwa  $\frac{2}{3}$  der Wertigkeit, nämlich  $0.4 \times 10^{-3}$  (s. Tafel 1).



Ac = Acetyl-, Ms = Mesyl-(Methansulfonyl-).

Die Stereochemie ist in den Formeln nicht berücksichtigt.

<sup>4)</sup> B. Helferich u. H. Appel, Ztschr. physiol. Chem. **205**, 242 [1932]; B. Helferich, H. Appel u. R. Gootz, Ztschr. physiol. Chem. **215**, 277 [1933].

<sup>5)</sup> Ergebnisse der Enzymforschung, Leipzig 1931, Bd. I, S. 205.

<sup>6)</sup> B. Helferich, S. Grünler u. A. Gnüchtel, Ztschr. physiol. Chem. **248**, 88 [1937].

<sup>7)</sup> B. Helferich, W. Klein u. W. Schäfer, B. **59**, 79 [1926].

Ebenso sinkt (Tafel 2) die Fähigkeit eines Hefeextraktes, Trehalose zu spalten — z. B. 10.8% nach rund 4300 Min. — auf etwa die Hälfte ab — 5.1% nach der gleichen Zeit —, wenn als Substrat 6-Mesyl-trehalose geboten wird.

### Beschreibung der Versuche.

#### 6.6'-Dimesyl-pentaacetyl- $\beta$ -methyl-celllobiosid (I).

Eine Lösung von 4 g  $\beta$ -Methyl-celllobiosid in 100 ccm absol. Pyridin wird unter Kühlen mit Eis-Kochsalz und Umschütteln bei Ausschluß von Feuchtigkeit langsam mit 1.64 ccm Mesylchlorid (2 Mol.) versetzt. Nach etwa 12-stdg. Aufbewahren bei der gleichen niedrigen Temperatur werden bei Zimmertemperatur etwa 16 ccm Essigsäureanhydrid zugegeben, nach 4-stdg. Aufbewahren bei Zimmertemperatur die Lösung in Eiswasser eingerührt und die ausgefallene, allmählich fest gewordene Verbindung nach einigen Stunden abgesaugt und aus 320 ccm Methanol umkristallisiert. Ausb. 4 g, d. i. 48% d. Theorie. Aus der Mutterlauge können durch Einengen noch weitere 2.2 g — im ganzen also 80% d. Th. — gewonnen werden. Die reine Substanz schmilzt bei 196—198° (korrig.). Sie ist leicht löslich in Pyridin, Aceton und Chloroform, schwerer in Methanol, Äthanol, so gut wie unlöslich in Wasser und Ligroin.

4.440 mg Sbst.: 6.763 mg CO<sub>2</sub>, 2.130 mg H<sub>2</sub>O. --- 4.930 mg Sbst.: 3.501 mg Benzidinsulfat.

C<sub>28</sub>H<sub>38</sub>O<sub>20</sub>S<sub>2</sub> (722.4). Ber. C 41.53, H 5.30, S 8.87. Gef. C 41.54, H 5.37, S 8.03.

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>: —0.36° × 2.9046/0.0370 × 1.488 × 1 = —18.9° (Chloroform).

Die Substanz läßt sich, ähnlich wie die entsprechende Ditosyl-Verbindung, mit NaJ in Aceton in das schon bekannte 6.6'-Dijod-pentaacetyl- $\beta$ -methyl-celllobiosid überführen<sup>3)</sup>.

#### Oktamesyl-trehalose (II).

2 g Trehalose, bei 100° im Vak. getrocknet, werden in 25 ccm absol. Pyridin gelöst und unter Umschütteln und Kühlung mit Eiswasser mit 6.5 g Mesylchlorid (8 Mol.) versetzt. Nach etwa 15-stdg. Aufbewahren wird bei 0° eine kleine Menge Eiswasser zugegeben, um zunächst überschüssiges Mesylchlorid im homogenen Medium zu zersetzen, und dann die Lösung in Eiswasser eingerührt. Die dabei ausfallende Oktamesyl-Verbindung wird nach einiger Zeit fest und filtrierbar. Durch mehrfaches Umkristallisieren aus etwa 200 ccm Methanol erhält man sie, in einer Ausbeute von 6.4 g, d. i. 90% d. Th., in feinen Nadeln mit einem Zerspt. von 250°. Die Substanz ist leicht löslich in Essigester und Pyridin, schwerer in Methanol und Äthanol, unlöslich in Äther, Wasser und Ligroin.

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>: +1.43° × 2.2527/0.0339 × 0.901 × 1 = +105.5° (in Essigester).

4.107 mg Sbst.: 3.732 mg CO<sub>2</sub>, 1.456 mg H<sub>2</sub>O. --- 3.860 mg Sbst.: 8.973 mg Benzidinsulfat.

C<sub>20</sub>H<sub>38</sub>O<sub>27</sub>S<sub>2</sub> (966.7). Ber. C 24.84, H 3.93, S 26.50. Gef. C 24.78, H 3.97, S 26.41.

#### 6-Mesyl-heptaacetyl-trehalose (III).

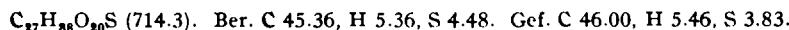
2 g getrocknete, wasserfreie Trehalose werden in 25 ccm absol. Pyridin gelöst und bei — 18° unter Schütteln mit 0.70 ccm Mesylchlorid (1 $\frac{1}{2}$  Mol.) versetzt. (Feuchtigkeitsausschluß!) Nach 12-stdg. Aufbewahren bei — 18°

wird die Lösung bei Zimmertemperatur mit 12 ccm Essigsäureanhydrid versetzt und nach 24-stdg. Aufbewahren bei Zimmertemperatur in Eiswasser eingerührt. Die dabei ausfallende Verbindung wird nach kurzer Zeit abfiltriert, gründlich mit Wasser gewaschen und 2-mal aus etwa 20 ccm Methanol umkristallisiert. Ausb. 2.8 g, d. i. 70% d. Theorie. Schmelzpunkt der farblosen, schön krystallinen Substanz 84° (korrig.).

Die Verbindung ist leicht löslich in Aceton, Pyridin und Methanol, schwerer in Äthanol, so gut wie unlöslich in Äther und Ligroin.

$$[\alpha]_D^{20} : +2.90 \times 2.7108 / 0.0625 \times 0.901 \times 1 = +139^\circ \text{ (in Essigester).}$$

3.641 mg Sbst.: 6.147 mg CO<sub>2</sub>, 1.776 mg H<sub>2</sub>O. — 3.597 mg Sbst.: 1.214 mg Benzidinsulfat.



#### 6-Mesyl-trehalose (IV).

Zu einer auf --- 18° abgekühlten Lösung von 3.2 g 6-Mesyl-hepta-acetyl-trehalose (III) in 50 ccm absol. Chloroform werden 75 ccm einer ebenso kalten Natriummethylat-Lösung zugegeben, deren Titer mit Schwefelsäure zu 51.4 mg Na in 10.0 ccm festgestellt war. Nach 1½-stdg. Aufbewahren bei der gleichen niedrigen Temperatur wurde das inzwischen trübe und gallertig erstarrte Reaktionsgemisch mit wenig Wasser versetzt, gegen Phenolphthalein mit  $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$  auf eben noch rosa abgestumpft, im Vak. zur Trockne verdampft und der Rückstand 2-mal mit je 100 ccm Methanol heiß ausgezogen. Beim Eindampfen der filtrierten Methanol-Lösung bleibt die Mesyl-trehalose als weiße hygroskopische amorphe Substanz zurück, die aber trotzdem den errechneten Schwefelgehalt aufweist:



$$[\alpha]_D^{20} : +2.92 \times 3.0462 / 0.0638 \times 1 \times 1 = +139^\circ \text{ (Wasser).}$$

#### Spaltungen von Trehalose und 6-Mesyl-trehalose mit Süßmandelmulsin.

Versuchsbedingungen: pH 5.0 (Acetatpuffer), 30.0°. Substratkonzentration: Die Menge von Trehalose und Mesyl-trehalose, die 0.040 g Phenol-hexosid entspricht, in 2.0 ccm Pufferlösung, dazu (zur Zeit 0) 1.0 ccm Fermentlösung. Die Konzentration des Ferments wurde durch Eindampfen der Fermentlösung und Wägen des Rückstandes bestimmt ( $\beta$ -Glucosidase-Wert: 1.1). Die Spaltung wurde polarimetrisch verfolgt. Nach t Min. wurde durch Zusatz von 0.2 g K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> abgestoppt. Anfangsdrehung wurde gemessen (mit Zusatz von Wasser statt Fermentlösung zur Substratlösung), die Enddrehung daraus für 100% Spaltung berechnet.

$$\text{Wertigkeit } W = \frac{\lg \frac{100}{100-x}}{t \times \lg 2 \times g}$$

x = Prozent Spaltung nach der Zeit t; t = Spaltzeit in Min.; g = Gramm Ferment in 50 ccm Bestimmungsgemisch. Die Eigendrehung des Ferments wurde berücksichtigt.

Anfangsdrehung (1-dm-Rohr)	Trehalose	+3.98
	6-Mesyl-trehalose	+3.48

Enddrehung (ber.)	Trehalose	+0.98
	6-Mesyl-trehalose	+0.84

$$g = 0.1267.$$

Tafel 1.  
Trehalose.

t'	Drehung nach t'		Spaltung Wertigkeit
	in Grad	in %	
2880	+3.51	15.7	$0.67 \times 10^{-3}$
6120	-3.17	27.0	$0.59 \times 10^{-3}$
8640	+2.97	33.7	$0.58 \times 10^{-3}$

6-Mesyl-trehalose			
2880	+3.24	9.1	$0.37 \times 10^{-3}$
4320	+3.12	13.5	$0.38 \times 10^{-3}$
6120	+3.07	15.5	$0.31 \times 10^{-3}$

Spaltungen der gleichen Substrate mit Hefe-Extrakt<sup>a)</sup>.

pH 6.9 (Phosphatpuffer); Substratkonzentration: Eine Menge, die äquivalent 0.25 g Maltose (mit 1 H<sub>2</sub>O) ist, gelöst in 8.0 ccm Wasser, dazu 2.0 ccm Fermentlösung. Außerdem wurde bei längerer Versuchsdauer Toluol zugegeben. Die Spaltung wurde reduktometrisch und polarimetrisch bestimmt. In beiden Fällen wurde die Eigenreduktion bzw. -drehung des Ferments unter den gleichen Umständen bestimmt und berücksichtigt. Sonst waren die Bedingungen die gleichen wie bei der Iminulsinpaltung.

Tafel 2.

t	Trehalose		6-Mesyl-trehalose	
	Drehung nach t'	Spaltung in %	Drehung nach t'	Spaltung in %
4320	+4.12	10.8	+4.09	5.1
5760	+4.09	11.7	+4.01	7.4
7200	+4.08	12.1	+3.98	8.3
8640	+4.08	12.1	+3.98	8.3

(Die Spaltung kommt wegen Zerstörung des Ferments zum Erliegen.)

253. Emil Eidebenz: Die Reduktion von *o*-Xylylendicyanid und 1-Cyan-2-imino-hydriden.

[Aus d. Pharmazeut.-wissenschaftl. Abteil. d. Chem. Werke Albert, Wiesbaden-Biebrich.]  
(Eingegangen am 16. Oktober 1941.)

Bei der Reduktion von *o*-Xylylendicyanid mit Natrium und Alkohol zur Darstellung von  $\beta,\beta'$ -Diamino-*o*-diäthyl-benzol fand Zanetti<sup>1)</sup> neben einer als das gesuchte Diamin angesprochenen Base eine Monoamino-Verbindung C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N. Später befaßten sich v. Braun, Kruber und Danziger<sup>2)</sup> wieder mit dieser Reduktion, wobei sie die Untersuchungen auf die Reduktion des aus *o*-Xylylendicyanid nach Moore und Thorpe<sup>3)</sup> leicht darstellbaren 1-Cyan-2-imino-hydridens ausdehnten. Die Verfasser klärten die Konstitution des bei der Reduktion unter den angegebenen Bedingungen entstehenden Monamins als 2-Methyl-2-amino-hydriden auf und formulierten den Vorgang wie folgt: Ein Teil des *o*-Xylylendicyanids wird direkt zum  $\beta,\beta'$ -Diamino-*o*-diäthyl-benzol hydriert.

<sup>1)</sup> R. Weidenhagen, Ztschr. Ver. dtsch. Zuckerind. **80**, 155 [1930].

<sup>2)</sup> Gazz. chim. Ital. **22**, II, 512 [1892].

<sup>3)</sup> B. **49**, 2642 [1916].

<sup>4)</sup> Journ. chem. Soc. London **93**, 165 [1908].