

Mischproben. Mit dem Phenylsemicarbazon des synthetischen α -Irons vom Smp. 166—167° tritt eine starke Erniedrigung des Schmelzpunktes ein (Mischschmelzpunkt ca. 155°). Mit dem Phenylsemicarbazon vom Smp. 161—162° aus Präparat 11 (β -Iron aus γ -Iron durch Isomerisieren mit Alkali etc.) tritt dagegen keine Erniedrigung ein (Mischsmp. 162—164°).

Die Analysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung von Hrn. W. Manser ausgeführt.

Organisch-chemisches Laboratorium der
Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

47. Glucoside und β -1,3,4,6-Tetraacetyl-glucose aus Triacetyl-glucosan- $\alpha\langle 1,2\rangle\beta\langle 1,5\rangle$

von E. Hardegger und J. de Pascual.

(22. XII. 47.)

Nach P. Brügel¹⁾ und W. J. Hickinbottom²⁾ addiert Triacetyl-glucosan- $\alpha\langle 1,2\rangle\beta\langle 1,5\rangle$ ³⁾ (I) primäre und sekundäre Alkohole mit ausserordentlicher Leichtigkeit. Die Reaktionsprodukte werden als sterisch einheitliche β -Glucoside beschrieben. Die Umsetzung von Carbinol mit I verläuft praktisch quantitativ und ist, z. B. mit einem Überschuss an Methanol bzw. Äthanol, bei Zimmertemperatur nach wenigen Stunden beendet. Mit höheren primären, bzw. sekundären Alkoholen (Benzylalkohol, Isopropanol, Menthol) ist zur Erzielung guter Ausbeuten an Glucosid mehrstündigtes Erwärmen mit I nötig; Nebenprodukte wurden in der Glucosid-Synthese nie beobachtet. Von Interesse ist die Feststellung Hickinbottoms (l. c.), dass die Addition von Phenol an I zu reinem α -Phenol-glucosid führt.

Diese ebenso elegante wie saubere Methode zur Herstellung von Glucosiden nach Brügel hat bisher wenig Beachtung gefunden⁴⁾, wohl infolge der etwas heiklen Herstellung von I. Da uns eine grössere Menge Brügel-Anhydrid zur Verfügung stand, war es naheliegend, im Zusammenhang mit Arbeiten, über die demnächst berichtet werden soll, die Glucosid-Synthese nach Brügel erneut aufzugreifen und auf allgemeine Anwendbarkeit zu prüfen.

Die Umsetzung von I mit Isopropanol, bzw. Benzylalkohol führte uns zum krystallisierten, bisher noch unbekannten Isopropyl-, bzw. Benzyl- β,d -glucosid-3,4,6-triacetat (II, III)⁵⁾.

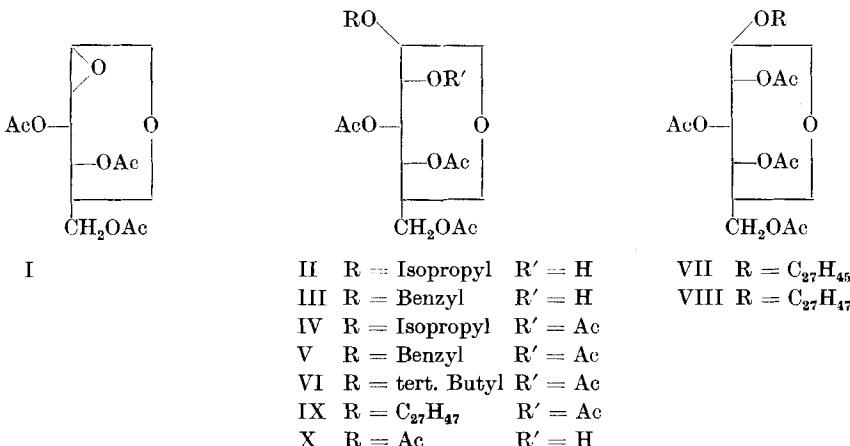
¹⁾ Z. physiol. Ch. 122, 245 (1922).

²⁾ Soc. 1928, 3140.

³⁾ I wird auch als Brügel-Anhydrid bezeichnet.

⁴⁾ Vgl. P. Brügel und R. Schinle, B. 62, 1717 (1929).

⁵⁾ Von Hickinbottom (l. c.) als Tetraacetyl-glucoside (IV, V) isoliert.



Dass auch tertiäre Alkohole zur Umsetzung mit I befähigt sind, konnte mit der Herstellung von tert. Butyl- β,d -glucosid gezeigt werden. Aus der mit Acetanhydrid und Pyridin acetylierten Reaktionsmischung wurde das tert. Butyl-glucosid als Tetraacetat (VI) in guter Ausbeute isoliert. Beim Versuch, das zuerst entstandene tert. Butyl- β,d -glucosid-3,4,6-triacetat durch Destillieren im Hochvakuum zu reinigen, zersetzte sich das Präparat, offensichtlich unter Abspaltung von Isobutylen. Das nicht weiter untersuchte Destillat gab bei der Verbrennung CH-Werte, welche denen von 3,4,6-Triacetyl-glucose recht nahe stehen.

Die Zugehörigkeit von II und III zu den β -Glucosiden wurde durch Acetylierung dieser Verbindungen zu den bekannten Tetraacetaten IV und V bewiesen; die Einordnung von VI in die β -Reihe ergibt sich aus dem Betrag der optischen Drehung von VI im Vergleich mit II.

Zur Erzielung guter Ausbeuten an II, III, VI, ist es notwendig, die Carbinole (Isopropyl-, Benzyl-, Butyl-alkohol) im Überschuss anzuwenden. Bei der Umsetzung äquimolarer Mengen I und Carbinol entstehen beträchtliche Mengen höher siedender Reaktionsprodukte, vermutlich Di- und Oligo-saccharide.

Die Umsetzung von I mit Cholesterin erfolgt schwieriger als jene von I mit tert. Butanol. Nach Acetylierung des Reaktionsproduktes konnte demzufolge das gut krystallisierte, bei 195° schmelzende Cholesterin-glucosid-tetraacetat nur in geringer Menge isoliert werden. Das neue Cholesterin-glucosid-tetraacetat weist mit $[\alpha]_D = +87^\circ$ gegenüber dem von *H. Lettré* und *A. Hagedorn*¹⁾ beschriebenen eine

¹⁾ Z. physiol. Ch. **242**, 210 (1936).

um 110° nach den positiven Werten verschobene optische Drehung auf. Das aus *Brigl*-Anhydrid zugängliche Präparat ist demnach als Cholesterin- α ,*d*-Glucosid-tetraacetat (VII) zu bezeichnen. In Übereinstimmung damit steht die katalytische Hydrierung von VII mit Platin in Eisessig, welche quantitativ zu Cholestanol- α ,*d*-Glucosid-tetraacetat¹⁾ führt (VIII).

Die Umsetzung von Cholestanol mit I verlief sterisch nicht einheitlich. Das acetylierte Reaktionsprodukt gab zwar bei der Verbrennung die erwarteten CH-Werte, schmolz aber unscharf zwischen $145-158^\circ$. Die optische Drehung von $+46^\circ$ weist darauf hin, dass eine Mischung gleicher Teile Cholestanol- α - und β -Glucosid-tetraacetat²⁾ vorliegt.

Aus der Umsetzung von Cholesterin und Cholestanol mit I folgt, dass die von *Hickinbottom* (l. c.) vertretene Ansicht über den sterischen Verlauf der *Brigl*'schen Glucosid-Synthese in bezug auf Richtung und Einheitlichkeit nur beschränkt gültig ist.

Wir haben nun beobachtet, dass sich I bei Zimmertemperatur mit Eisessig umsetzt. Das Reaktionsprodukt wurde zunächst nicht in krystallisierter Form isoliert. Bei der Wiederholung der Versuche erhielten wir in ausgezeichneter Ausbeute eine krystallisierte 1,3,4,6-Tetraacetyl-glucose (X) vom Smp. 131° . Das Präparat X liess sich in Pyridin mit Acetanhydrid zur β -Pentaacetyl-glucose acetylieren und gehört demnach in die β -Reihe.

Ob die hier beschriebene β -1,3,4,6-Tetraacetyl-glucose ($[\alpha]_D = +28^\circ$) mit der von *A. M. Gachokidse*³⁾ aus 3,4,6-Triaceto- β -1-chlor-glucose mit Silberacetat hergestellten 1,3,4,6-Tetraacetyl-glucose identisch ist, kann vorläufig nicht entschieden werden. Das von *Gachokidse* beschriebene Präparat kann auf Grund seiner Herstellungsweise sowohl ein Derivat der α -, wie der β -Glucose sein, je nach dem, ob bei seiner Herstellung Massnahmen zur Verhütung von Umlagerungen am C-Atom 1 getroffen wurden oder nicht.

In keiner der vorstehend beschriebenen Verbindungen (II, III, X) ist die Lage der freien Hydroxylgruppe am C-Atom 2 bewiesen. Trotzdem Acylwanderungen nicht ausgeschlossen sind, glauben wir für die getroffene Annahme (OH an C-2) gute Gründe zu haben.

Dem *Consejo Superior de Investigaciones Científicas* in Madrid und der *Stiftung für Stipendien auf dem Gebiete der Chemie* danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

¹⁾ R. P. Linstead, Am. Soc. **62**, 1766 (1940).

²⁾ Nach Linstead (l. c.) dreht das α -Derivat $+114^\circ$, das β -Derivat $+5^\circ$.

³⁾ C. 1942, I, 1503, bzw. Ž. obšč. Chim. **11**, (73) 117 (1941).

Experimenteller Teil¹⁾.

Isopropyl- β,d -glucosid-3, 4, 6-triacetat (II)²⁾.

100 mg *Brigl*-Anhydrid wurden in 2 cm³ trockenem Isopropanol gelöst und 16 Stunden auf 60° erwärmt. Die Lösung wurde im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand, 130 mg gelbliches Harz, wurde in 0,2 cm³ warmem Alkohol gelöst. Beim Erkalten schieden sich 85 mg Krystalle vom Smp. 80° aus. Nach dem Umkrystallisieren aus Alkohol schmolz das Präparat bei 84°. Zur Analyse wurde das Glucosid 24 Stunden bei 70° im Hohvakuum getrocknet.

3,700 mg Subst. gaben 7,022 mg CO₂ und 2,306 mg H₂O

C₁₅H₂₄O₉ Ber. C 51,72 H 6,94%

Gef. „ 51,79 „ 6,97%

[α]_D = +58° (c = 0,7 in Benzol)

Benzyl- β,d -glucosid-3, 4, 6-triacetat (III)²⁾.

100 mg *Brigl*-Anhydrid wurden in 3 cm³ trockenem Benzylalkohol gelöst und die Lösung 16 Stunden auf 110° erhitzt. Das durch Eindampfen im Vakuum erhaltene Reaktionsprodukt wog 160 mg und war ein gelbliches Harz. Das Präparat krystallisierte aus wenigen Tropfen Alkohol. Die Krystalle schmolzen unscharf bei 100°. Durch Destillation im Hochvakuum stieg der Schmelzpunkt des glasigen, langsam krystallisierenden Analysenpräparats auf 107°.

3,992 mg Subst. gaben 8,400 mg CO₂ und 2,205 mg H₂O

C₁₈H₂₄O₉ Ber. C 57,57 H 6,10%

Gef. „ 57,43 „ 6,18%

[α]_D = -44° (c = 0,9 in Chloroform)

tert. Butyl- β,d -glucosid-2, 3, 4, 6-tetraacetat (VI).

100 mg *Brigl*-Anhydrid wurden mit 2 cm³ trockenem tert. Butanol 16 Stunden auf 60° erhitzt. Die Lösung wurde im Vakuum zur Trockne eingedampft und der gelbliche, harzige Rückstand (130 mg) mit einigen Tropfen Acetanhydrid und Pyridin 16 Stunden bei 20° stehen gelassen. Nun wurde zunächst im Wasserstrahlvakuum, dann im Hochvakuum bei 100° zur Trockne eingedampft. Das Präparat krystallisierte aus 0,2 cm³ Alkohol in schönen Nadeln (90 mg) vom Smp. 141°. Das Glucosid wurde zur Analyse 16 Stunden bei 70° im Hochvakuum getrocknet.

1,584 mg Subst. gaben 3,093 mg CO₂ und 1,002 mg H₂O

C₁₈H₂₈O₁₀ Ber. C 53,46 H 6,98%

Gef. „ 53,27 „ 7,08%

[α]_D = +31° (c = 0,6 in Benzol)

Thermische Zersetzung. Das oben erwähnte, nicht acetylierte Reaktionsprodukt wurde im Hochvakuum bei 170° destilliert. Das Destillat war ein farbloses Harz.

3,840 mg Subst. gaben 6,731 mg CO₂ und 2,131 mg H₂O

C₁₂H₁₈O₉ Ber. C 46,99 H 5,88%

Gef. „ 47,83 „ 6,21%

Cholesterin- α,d -glucosid-2, 3, 4, 6-tetraacetat (VII).

1 g Cholesterin und 290 mg *Brigl*-Anhydrid wurden geschmolzen und die Schmelze im verschlossenen Gefäß 16 Stunden bei 120° gehalten. Die erkaltete Schmelze wurde

¹⁾ Alle Schmelzpunkte sind korrigiert.

²⁾ Acetylierung zu den Tetraacetyl-glucosiden vgl. *Hickinbottom* (l. c.).

in 1 cm³ Pyridin gelöst und nach Zugabe von 1 cm³ Acetanhydrid im Verlaufe von 16 Stunden bei 20° acetyliert. Der im Vakuum zur Trockne eingedampfte, dunkel gefärbte Rückstand wurde in 4 cm³ heißem Isopropanol gelöst und mit wenig Kohle entfärbt. Beim Abkühlen krystallisierten 50 mg Nadeln, die bei etwa 180° schmolzen. Das aus Alkohol krystallisierte Präparat schmolz bei 195°. Zur Analyse wurde das Glucosid 16 Stunden bei 150° im Hochvakuum getrocknet.

3,694 mg Subst. gaben 9,284 mg CO₂ und 2,908 mg H₂O
 $C_{41}H_{64}O_{10}$ Ber. C 68,68 H 9,00%
 Gef. „ 68,59 „ 8,80%
 $[\alpha]_D = +88^\circ$ (c = 0,9 in Chloroform)

Cholestanol- α, d -glucosid-2, 3, 4, 6-tetraacetat (VIII)¹⁾.

60 mg reines VII wurden in 6 cm³ Eisessig gelöst und nach Zugabe von 30 mg Platinoxyd bis zur Sättigung hydriert. Der Wasserstoffverbrauch betrug 9,6 cm³. Das von Katalysator und Eisessig befreite Hydrierungsprodukt wurde aus 1 cm³ Alkohol umkrystallisiert. Das Präparat (55 mg) schmolz bei 182°. Es wurde zur Analyse 15 Stunden im Hochvakuum bei 100° getrocknet.

3,930 mg Subst. gaben 9,874 mg CO₂ und 3,237 mg H₂O
 $C_{41}H_{66}O_{10}$ Ber. C 68,49 H 9,21%
 Gef. „ 68,57 „ 9,22%
 $[\alpha]_D = +108^\circ$ (c = 1,7 in Chloroform)

Cholestanol- $\alpha + \beta, d$ -glucosid-2, 3, 4, 6-tetraacetat (VIII+IX).

1 g Cholestanol und 290 mg *Brigl*-Anhydrid wurden wie für die Herstellung von VI umgesetzt. Das acetylierte, dunkel gefärbte Reaktionsprodukt wurde aus 2 cm³ Alkohol, dem einige Tropfen Benzol zugefügt waren, umkrystallisiert. Die Krystalle schmolzen unscharf bei 145°. Das zur Analyse im Hochvakuum bei 300° destillierte Präparat war ein glasklares Harz.

4,064 mg Subst. gaben 10,193 mg CO₂ und 3,344 mg H₂O
 $C_{41}H_{66}O_{10}$ Ber. C 68,49 H 9,21%
 Gef. „ 68,45 „ 9,21%
 $[\alpha]_D = +46^\circ$ (c = 1,4 in Chloroform)

Das aus Hexan krystallisierte Analysenpräparat schmolz unscharf bei 158°.

β -1, 3, 4, 6-Tetraacetyl-d-glucose (X).

290 mg *Brigl*-Anhydrid wurden in 2 cm³ Eisessig gelöst und 3 Stunden bei 20° stehen gelassen. Die Mischung wurde im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 2 cm³ Benzol gelöst, mit Petroläther bis zur Trübung versetzt, bis zur klaren Lösung erwärmt und stehen gelassen. Nach einiger Zeit hatten sich 280 mg noch leicht gefärbte Krystalle vom Smp. 128° abgeschieden. Das aus Benzol-Petroläther umkrystallisierte Präparat schmolz bei 131°. Zur Analyse wurde das Tetraacetat 16 Stunden bei 100° im Hochvakuum getrocknet.

3,748 mg Subst. gaben 6,604 mg CO₂ und 1,950 mg H₂O
 $C_{14}H_{20}O_{10}$ Ber. C 48,27 H 5,79%
 Gef. „ 48,09 „ 5,82%
 $[\alpha]_D = +28^\circ$ (c = 1,3 in Chloroform)

¹⁾ R. P. Linstead, Am. Soc. 62, 1766 (1940), findet den Smp. 184° und $[\alpha]_D = +114^\circ$ (in Chloroform).

Das Tetraacetat gab mit β -Pentaacetyl-glucose in der Mischprobe eine starke Schmelzpunktserniedrigung.

Acetylierung. Das mit Pyridin und Acetanhydrid 5 Minuten bei 60° acetylierte Tetraacetat gab quantitativ die bei 135° schmelzende β -Pentaacetyl-glucose.

$$[\alpha]_D = +3,8^\circ \text{ (c} = 1 \text{ in Chloroform)}$$

Die Mischprobe mit β -Pentaacetyl-glucose anderer Herkunft zeigte keine Schmelzpunktserniedrigung.

Die Analysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung von Hrn. *W. Manser* ausgeführt.

Organisch-chemisches Laboratorium der
Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

48. Sur les enzymes amylolytiques III¹⁾.

La β -amylase: dosage d'activité et contrôle de l'absence d' α -amylase
par G. Noelting et P. Bernfeld.

(22 XII 47)

Nous avons mis au point une méthode de dosage de la β -amylase, à la fois simple, rapide et précise, qui était nécessaire pour nos travaux. Elle consiste à déterminer photométriquement le maltose formé par action de l'enzyme.

Comme substratum, nous avons choisi l'amylopectine de pomme de terre, préparée avantageusement selon la méthode de *Schoch*²⁾. Ce produit est stable en solution aqueuse à froid: sa valeur de réduction à blanc n'augmente pas avec le temps comme c'est le cas pour l'amidon *Zulkowski*; sa solution ne devient pas trouble comme celle de l'amylopectine de maïs, même en présence de quelques pourcents d'amylose. Le maltose formé est dosé par réduction d'acide dinitro-3,5-salicylique à 100° en milieu alcalin, selon *Sumner*³⁾. On obtient ainsi une coloration brune dont on détermine l'extinction au photomètre. Pour une dégradation de l'amylopectine jusqu'à 10%, l'activité de l'amylase est directement proportionnelle à l'extinction obtenue, et, partant, à la quantité de maltose formé. On exprime l'activité de la β -amylase en mgr. de maltose hydraté ($C_{12}H_{22}O_{11}, H_2O$),

¹⁾ IIme communication, *Helv.* **30**, 1904 (1947).

²⁾ *Th. J. Schoch*, Advances in Carbohydrate Chemistry **1**, 247 (1945).

³⁾ *J. B. Sumner*, *J. Biol. Chem.* **62**, 287 (1925).