

1561. Günther Wagner und Hans Kühmstedt

Über die Spaltbarkeit verschiedener Salicylamid- β -d-glucoside und -galaktoside durch Mandel-Emulsin

3. Mitteilung „Über Phenolglykoside“

Aus dem Pharmaz.-chem. Institut der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
Direktor: Professor Dr. *Pohloudek-Fabini*

(Eingegangen am 15. Juli 1956)

In einer früheren Mitteilung¹⁾ berichteten wir über die Spaltbarkeit verschiedener Salicylamid- β -d-glykoside durch Mandelemulsin. Dabei waren zunächst nur qualitative Versuche durchgeführt und beschrieben worden. Über die quantitativen Verhältnisse bei der Enzymspaltung der Salicylamid- β -d-glykoside soll in dieser Veröffentlichung berichtet werden.

Die enzymatischen Spaltversuche wurden in gleicher Weise wie bei den Salicyl- und p-Oxybenzoesäureester- β -d-glucosiden durchgeführt²⁾. Um den Prozentsatz an gespaltenem Glykosid festzulegen, wurde das entstandene Aglykon als Eisen(III)-komplex kolorimetrisch bestimmt (vgl. Versuchsteil).

Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 1 und Abb. 1 zusammengestellt.

Die Spaltung unter der angegebenen Versuchsanordnung über einen Zeitraum von 6 Tagen hinaus zu verfolgen, hat keinen Sinn, weil dann die Aktivität des Emulsins so stark gesunken ist, daß eine Vermehrung des Aglykonanteils bei schwer spaltbaren Glykosiden nicht mehr festgestellt werden kann.

Die Betrachtung von Tabelle 1 und Abb. 1 zeigt, daß sowohl bei den β -d-Glucosiden als auch bei den β -d-Galaktosiden durch Substitution eines H-Atomes an der Säureamidgruppierung die Spaltbarkeit sinkt. Durch Verlängerung der Kohlenstoffkette dieses Substituenten sinkt die Spaltbarkeit weiter wesentlich ab. Ist dieser Substituent verzweigt, sind die Verbindungen bei der benutzten Fermentkonzentration praktisch nicht zu spalten. Das gleiche gilt auch für Substanzen, bei denen beide Wasserstoffatome am Säureamidstickstoff durch Methylgruppen substituiert sind.

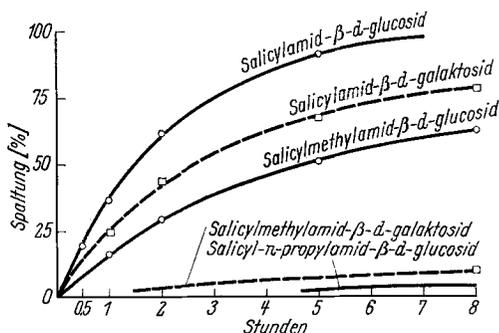


Abb. 1. Enzymatische Spaltung von Salicylamid-glykosiden (Auf 1 ml Lösung 10 mg Emulsin-Glucose-Verreibung 1 + 6)

¹⁾ G. Wagner und H. Kühmstedt, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 289/61, 247 (1956).

²⁾ G. Wagner und H. Kühmstedt, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 289/61, 488 (1956).

Tabelle 1

Enzymatische Spaltung von Salicylamidglykosiden (Versuchsordnung siehe Versuchsteil Seite 167)

(Konz. an Glykosid in Lösung 0,7%; 1,43 mg Emulsin in Glucoseverreibung auf 1 ml Lösung)

Substanz	Gespaltenener Glykosidanteil in Prozent nach									
	0,5	1	2	5	8	24	48	96	144	Std.
Salicylamid- β -d-glucosid	20	37	62	92	—	—	—	—	—	—
Salicylamid- β -d-galaktosid	—	25	44	68	79	—	—	—	—	—
Salicylmethylamid- β -d-glucosid	—	16	30	52	64	—	—	—	—	—
Salicylmethylamid- β -d-galaktosid	—	—	—	—	—	29	44	64	69	—
Salicyl-n-propylamid- β -d-glucosid	—	—	—	—	—	8	10,5	13	13	—
Salicyl-n-propylamid- β -d-galaktosid	—	—	—	—	—	—	—	—	1—2	—
Salicylisopropylamid- β -d-glucosid	keine Spaltung nachweisbar									
Salicylisopropylamid- β -d-galaktosid										
Salicyldimethylamid- β -d-glucosid										
Salicyldimethylamid- β -d-galaktosid										

Tabelle 2

Enzymatische Spaltung schwer spaltbarer Salicylamidglykoside

(Konz. an Glykosid in der Lösung 0,7%; auf 1 ml Lösung 50 mg Emulsin „Merck“)

Substanz	Spaltung in Prozent nach				
	5	25	50	75	100
Salicylisopropylamid- β -d-glucosid	19	48	69	79	—
Salicylisopropylamid- β -d-galaktosid	—	5	—	8,5	—
Salicyldimethylamid- β -d-glucosid	—	—	68	87	—
Salicyldimethylamid- β -d-galaktosid	—	—	35	—	46

Trotzdem sind die erwähnten Substanzen nicht unspaltbar, denn bei einer stärkeren Fermentkonzentration in den Spaltansätzen, etwa 50 mg Emulsin „Merck“ in 1 ml Lösung, werden auch sie gespalten. Die quantitativen Verhältnisse sind in Tabelle 2 wiedergegeben. Vergleicht man die Spaltgeschwindigkeit von Salicylamid- β -d-glucosid und von Salicylisopropylamid- β -d-glucosid miteinander, so liegt das Verhältnis ungefähr bei 500:1.

Offenbar liegt bei den schwer spaltbaren Verbindungen eine sterische Hinderung der Spaltung vor, wie sie u. a. von *S. Veibel* und Mitarbeitern^{3), 4), 5)} bei den β -d-Glucosiden verschiedener Alkohole beobachtet worden ist und die so gedeutet werden kann, daß es dem Ferment durch die räumliche Anordnung des meist sperrigen Aglykons nur schwer möglich ist, mit den Haftgruppen des Pyranringes in Reaktion zu treten. Die Deutung der von den erwähnten Autoren erhaltenen Ergebnisse im Sinne einer sterischen Hinderung der Fermentbindung scheint möglich, da Trimethylcarbinol- β -d-glucosid wesentlich langsamer gespalten wird als die β -d-Glucoside von Methanol, Äthanol, n-Butanol und Isopropanol, wird aber dadurch schwierig, daß die β -d-Glucoside des Dimethyläthyl-, Methyläthyl- und Triäthylcarbinols wieder besser als Trimethylcarbinol- β -d-glucosid gespalten werden. Ein Ausweg ergibt sich durch die Annahme, daß die Methylgruppen in den Raum zwischen den OH-Haftstellen des Pyranringes (besonders am C₃) und dem tertiären C-Atom des Aglykons passen und so den Angriff des Fermentes wesentlich erschweren. Für Äthylgruppen kann dieser Raum nicht ausreichen, und das Aglykon muß aus diesem Grunde in einer Lage angeordnet sein, die dem Ferment einen besseren Zugang zu den Haftgruppen am Pyranring erlaubt.

Wir vermuten (vgl. auch vorige Mitteilung²⁾), daß auch bei den schwer spaltbaren Salicylamidglykosiden die Hydroxylgruppe am C 3, der nach *B. Helferich*^{6), 7)} zusammen mit der Hydroxylgruppe am C 2 und wohl weniger auch mit der Hydroxylgruppe am C 4 die Aufgabe einer Haftgruppe für das Ferment zuzukommen scheint, räumlich blockiert wird. Das wäre bei Salicylisopropylamid- β -d-glucosid und Salicyldimethylamid- β -d-glucosid möglich. Die gegenüber dem Salicylamid- β -d-glucosid ebenfalls wesentlich geringere Spaltbarkeit von Salicyln-propylamid- β -d-glucosid könnte darauf zurückgeführt werden, daß eine längere Kohlenstoffkette am Säureamidstickstoff über den Pyranring hinausreicht und so den Angriff des Fermentes ebenfalls wesentlich erschwert.

Für die Deutung der unterschiedlichen Spaltbarkeit im Sinne einer sterischen Hinderung der Fermentspaltung spricht auch das Verhalten der Salicylamid- β -d-galaktoside. Schon von *E. Fischer*⁸⁾ und dann von *B. Helferich* und Mitarbeitern⁹⁾ ist festgestellt worden, daß von Mandel-Emulsin auch die β -d-Galaktoside gespalten werden. Die Tatsache, daß bei verschiedenen Fermentpräparaten vom Emulsintyp das Verhältnis der Spaltgeschwindigkeiten für β -d-Glucoside und β -d-Galaktoside bei gleichem Aglykon praktisch stets gleich war, ließ zunächst die Annahme eines Fermentes als naheliegend erscheinen. Die Unterschiede in der Spaltgeschwindigkeit von β -d-Glucosid und β -d-Galaktosid waren bei verschiedenen Aglykonen (u. a. Methanol, Phenol und Saligenin) allerdings beträchtlich.

³⁾ *S. Veibel, E. Nielsen*, C. R. Acad. Sci. URSS 203, 126 (1936).

⁴⁾ *S. Veibel, E. Eriksen*, C. R. Acad. Sci. URSS 203, 390 (1936).

⁵⁾ *S. Veibel und E. Lill Lund*, C. R. Acad. Sci. URSS 203, 692 (1936).

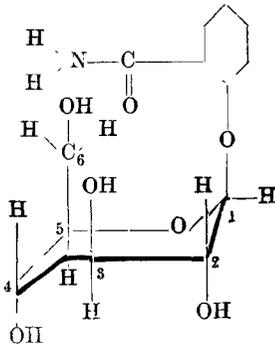
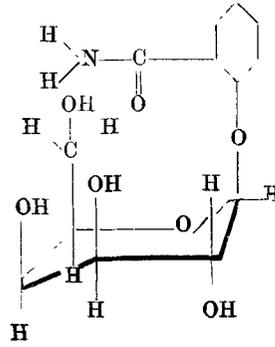
⁶⁾ *B. Helferich, W. Richter und S. Grünler*, Ber. Sächs. Akad. Wiss., Math.-phys. Klasse 89, 385 (1937).

⁷⁾ *B. Helferich und O. Lang*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 216, 123 (1933).

⁸⁾ *E. Fischer*, Ber. dtsh. chem. Ges. 28, 1155 (1895).

⁹⁾ *B. Helferich, R. Gootz und G. Sparmberg*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 205, 201 (1932).

Fermentschädigungsversuche und p_H -Abhängigkeit der Spaltung der β -d-Glucoside und β -d-Galaktoside forderten jedoch die Annahme von zwei verschiedenen Fermenten¹⁰⁾.

Salicylamid- β -d-glucosidSalicylamid- β -d-galaktosid

Nach unseren Versuchen liegt das Verhältnis der Spaltgeschwindigkeiten zwischen Salicylamid- β -d-glucosid und Salicylamid- β -d-galaktosid mit 2 : 1 wesentlich anders als zwischen Salicylmethylamid- β -d-glucosid und Salicylmethylamid- β -d-galaktosid mit 12 : 1. Diese Tatsache läßt sich für die Spaltung von β -d-Glucosiden und β -d-Galaktosiden erklären, wenn der OH-Gruppe am C 4 eine gewisse Bedeutung als Haftgruppe für das Ferment zukommt. Bei Betrachtung der Formeln I und II fällt auf, daß die OH-Gruppe am C 4 bei den Galaktosiden räumlich näher zur Säureamidgruppierung steht, wenn man die energetisch bevorzugte Sesselform am Pyranring annimmt, bei der die OH-Gruppen am C 3 und C 4 der Glucose in trans-Stellung und axial zueinander stehen. So kann bei einer Substitution am Säureamidstickstoff der Galaktoside auch eher ein hemmender Einfluß auf die Bindung des Fermentes ausgeübt werden.

Versuchsteil

1. Synthetisierte Verbindungen

Die Synthese eines Teiles der untersuchten Verbindungen wurde bereits früher beschrieben. Die restlichen Verbindungen wurden in folgender Weise dargestellt:

a) Aglykone

Salicyl-n-propylamid wurde durch Umsetzen von Salicylsäurechlorid — dargestellt nach A. Kispal¹¹⁾ — und n-Propylamin in ätherischer Lösung dargestellt. Umkristallisation aus Äther. Fp. 59—60° C.

b) Tetraacetylglykoside und Glykoside

Die Tetraacetylglykoside und -galaktoside wurden durch Umsetzen äquimolarer Mengen des Kaliumsalzes des entsprechenden Salicylamides und α -Acetobromglucose bzw. α -Aceto-

¹⁰⁾ B. Helferich und S. Winkler, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 221, 98 (1933); S. Veibel, Wangel und Östrup, Biochim. biophysica. Acta 1, 126 (1947); S. Veibel und E. Lillelund, Enzymologia 9, 161 (1941).

¹¹⁾ A. Kispal, Ber. dtsh. chem. Ges. 63, 3190 (1930).

bromgalaktose in einem Aceton-Wasser-Gemisch nach *Th. Sabalitschka*¹²⁾ synthetisiert. Genauere Angaben über das Aufarbeiten der Lösungen sind in einer früheren Mitteilung gegeben worden. Die Tetraacetylgalaktoside von Salicylmethylamid, Salicyl-n-propylamid, Salicylisopropylamid und Salicyldimethylamid konnten nicht kristallin, sondern nur amorph erhalten werden. Sie hatten keinen definierten Schmelzpunkt und zeigten sämtlich Linksdrehung. Die Analyseergebnisse einiger amorpher Produkte zeigten, daß ziemlich reine Substanzen vorlagen.

Salicyl-n-propylamid-tetraacetyl- β -d-glucosid

Ansatz: 7,0 g Salicyl-n-propylamid und 2,2 g KOH wurden in 17,5 g Wasser gelöst. 15,0 g α -Acetobromglucose wurden in 50 g Aceton gelöst. Die Lösungen wurden vereinigt und nach 24stündigem Stehen aufgearbeitet.

Umkristallisation: dreimal aus Methanol.

Nadeln, Fp. 174,5—176° C.

Optische Drehung in Chloroform: $[\alpha]_D^{17} = \frac{-6,945 \cdot 100}{1,503 \cdot 7,732} = -59,7^\circ$

Analyse: C₂₄H₃₁O₁₁N₁ (Mol.-Gew. 509,5)

Ber.: C 56,76%	H 6,13%	N 2,75%
Gef.: „ 56,55%	„ 6,22%	„ 2,75%

Salicyl-n-propylamid- β -d-glucosid

Durch Verseifen von Salicyl-n-propylamid-tetraacetyl- β -d-glucosid mit Na-methylatlösung in absol. Methanol nach *Zemplén* und *Pascu*¹³⁾. Die Substanz konnte nicht kristallin erhalten werden. Sie fiel nach Zusatz von Äther zu einer konz. methanolischen Lösung als Öl aus, das beim Aufbewahren im Vakuumexsiccator über P₂O₅ zu einer festen, glasigen Masse erstarrte, die sich zu einem weißen Pulver zerreiben ließ. Die Substanz hatte keinen definierten Schmelzpunkt und zeigte Linksdrehung.

Salicylmethylamid-tetraacetyl- β -d-galaktosid

Ansatz: 27,2 g α -Acetobromgalaktose wurden in 60 g Aceton und 10,0 g Salicylmethylamid und 3,8 g KOH in 20 g Wasser gelöst. Die Lösungen wurden vereinigt und 24 Stunden stehengelassen. Zunächst wurde in üblicher Weise aufgearbeitet. Das Lösungsmittel wurde aus der gereinigten Benzollösung abdestilliert. Aus der zurückbleibenden viskosen Lösung wurden die letzten Reste Benzol im Vakuumexsiccator entfernt. Es bildete sich dabei ein voluminöses weißes Pulver. Eine weitere Reinigung erfolgte durch Lösen der Substanz in Äther und Eintropfen der Lösung in Benzin. Das zunächst in schmieriger Form ausgefallene Produkt wurde allmählich fest und ließ sich unter Benzin verreiben und auf der Fritte abfiltrieren. Die Substanz war amorph, hatte keinen definierten Fp. und zeigte Linksdrehung.

Ausbeute: 39%.

Analyse: C₂₂H₂₇O₁₁N₁ (Mol.-Gew. 481,44)

Ber.: C 54,88%	H 5,65%	N 2,91%
Gef.: „ 54,81%	„ 5,83%	„ 2,79%

Salicylmethylamid- β -d-galaktosid

Durch Verseifen von Salicylmethylamid-tetraacetyl- β -d-galaktosid. Umkristallisation: dreimal aus absol. Methanol.

¹²⁾ *Th. Sabalitschka*, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 267, 675 (1929).

¹³⁾ *G. Zemplén* und *Pascu*, Ber. dtsh. chem. Ges. 62, 1613 (1929).

Nadeln. Fp. 198—200° C.

Optische Drehung in destilliertem Wasser: $[\alpha]_D^{26} = \frac{-0,32 \cdot 100}{1 \cdot 1,35} = -23,8^\circ$

Analyse: $C_{14}H_{19}O_7N_1$ (Mol.-Gew. 313,30)

Ber.: C 53,65%	H 6,11%	N 4,47%
Gef.: „ 53,25%	„ 5,99%	„ 4,63%

Salicylisopropylamid-tetraacetyl- β -d-galaktosid

Ansatz: 18,5 g α -Acetobromgalaktose wurden in 60 g Aceton und 9,0 g Salicylisopropylamid und 3,0 g KOH wurden in 25 g Wasser gelöst. Beide Lösungen wurden vereinigt und wie bei Salicylmethylamid-tetraacetyl- β -d-galaktosid beschrieben weiterbehandelt. Die amorphe Substanz hatte keinen definierten Fp. und zeigte Linksdrehung.

Ausbeute: 43%.

Analyse: $C_{24}H_{31}O_{11}N_1$ (Mol.-Gew. 509,5)

Ber.: C 56,76%	H 6,13%	N 2,75%
Gef.: „ 56,02%	„ 6,07%	„ 2,75%

Salicylisopropylamid- α -d-galaktosid

Durch Verseifen des entsprechenden Tetraacetylproduktes. Umkristallisation: einmal aus Methanol, anschließend zweimal aus Essigester.

Nadeln. Fp. 166—168° C.

Optische Drehung in destilliertem Wasser: $[\alpha]_D^{16} = \frac{-0,624 \cdot 100}{1 \cdot 2,63} = -23,7^\circ$

Analyse: $C_{16}H_{23}O_7N_1$ (Mol.-Gew. 341,35)

Ber.: C 56,25%	H 6,81%	N 4,10%
Gef.: „ 55,94%	„ 7,06%	„ 3,78%

Salicyl-n-propylamid-tetraacetyl- β -d-galaktosid

Ansatz: 15,0 g α -Acetobromgalaktose wurden in 50 g Aceton und 7,0 g Salicyl-n-propylamid und 2,2 g KOH in 17,5 g Wasser gelöst. Die beiden Lösungen wurden vereinigt und wie bei Salicylmethylamidtetraacetyl- β -d-galaktosid beschrieben aufgearbeitet. Das Produkt war amorph und zeigte Linksdrehung.

Salicyl-n-propylamid- β -d-galaktosid

Durch Verseifen von Salicyl-n-propylamid-tetraacetyl- β -d-galaktosid. Umkristallisation: einmal aus Methanol, anschließend zweimal aus Essigester. Die Substanz kristallisierte in Nadeln, war aber, wie Schmelzpunkt und Elementaranalyse ergaben, noch nicht vollständig rein. Die papierchromatographische Untersuchung ergab, daß in dem Produkt nur eine phenolische Verbindung, nämlich das Galaktosid vorhanden war. Aus diesem Grunde konnte die Substanz auch in unreinem Zustand zu den enzymatischen Spaltversuchen benutzt werden. Der Glykosidgehalt des Produktes ließ sich durch Säurespaltung und kolorimetrische Bestimmung des abgespaltenen Aglykons ermitteln.

Salicyldimethylamid-tetraacetyl- β -d-galaktosid

Ansatz: 25,0 g α -Acetobromgalaktose wurden in 60 g Aceton und 10,0 g Salicyldimethylamid und 3,4 g KOH wurden in 20 g Wasser gelöst. Die Aufarbeitung wurde wie bei Salicylmethylamidtetraacetyl- β -d-galaktosid beschrieben durchgeführt. Es wurde eine

amorphe Substanz erhalten, die Linksdrehung zeigte und keinen definierten Schmelzpunkt besaß.

Ausbeute: 30%.

Analyse: $C_{23}H_{29}O_{11}N_1$ (Mol.-Gew. 495,47)

Ber.: C 55,75%	H 5,90%	N 2,83%
Gef.: „ 54,75%	„ 5,67%	„ 2,54%

Salicyldimethylamid- β -d-galaktosid

Durch Verseifen von Salicyldimethylamid-tetraacetyl- β -d-galaktosid. Umkristallisation: zunächst aus wenig Methanol, aus dem die Substanz sehr langsam kristallisierte, anschließend zweimal aus Essigester.

Platten. Fp. 195—197° C.

Optische Drehung in destilliertem Wasser: $[\alpha]_D^{24} = \frac{-0,58 \cdot 100}{1 \cdot 3,41} = -17^\circ$

Analyse: $C_{15}H_{21}O_7N_1$ (Mol.-Gew. 327,33)

Ber.: C 55,04%	H 6,47%	N 4,28%
Gef.: „ 54,81%	„ 6,57%	„ 4,22%

Alle Schmelzpunkte wurden mit Hilfe des Mikroheiztisches „Boetius“ bestimmt.

2. Enzymatische Spaltversuche und Feststellung des Spaltungsgrades

Die aus den Salicylamidglykosiden abgespaltenen Aglykone wurden kolorimetrisch bestimmt. Die Salicylamidderivate geben mit Eisen(III)-ionen violettfarbene Komplexe. Die Reaktion gehorcht im Untersuchungsbereich dem Beer-Lambertschen Gesetz. Die abgespaltenen Salicylamidaglykone wurden nicht ausgeschüttelt, sondern direkt in den Spaltansätzen bestimmt. Bei einer quantitativen Auswertung der Spaltung auf Grundlage der Reaktion mit Eisen(III)-ionen muß die Anwesenheit der Phosphationen berücksichtigt werden. Die Phosphationen binden Eisenionen, die dann nicht zur Bildung der Salicylamid-Eisen-Komplexe zur Verfügung stehen. Die Bestimmung der Salicylamidderivate in phosphathaltiger Lösung ist trotzdem möglich, weil bei gleicher Phosphatkonzentration die Extinktion immer um einen proportionalen Betrag tiefer liegt (siehe Abb. 2—5). Um den genauen Betrag an abspaltbarem Aglykon in den Spaltansätzen festzustellen, wurde mit jeweils einer Probe eine Säurespaltung durchgeführt.

a) Ansetzen der Spaltproben

50—55 mg Glykosid wurden in einem Gemisch von 2 ml 0,1 m Phosphatpuffer p_H 5,0 und 5 ml destilliertem Wasser gelöst (= Puffergemisch A). Von dieser Lösung wurden 6 Proben zu je 1 ml mit jeweils 10 mg einer Verreibung von 100 mg Emulsin »Merck« und 600 mg getrockneter Glucose versetzt und in graduierten Reagenzglasern mit eingeschlifffem Glasstopfen bei 37° C im Ultrathermostaten aufbewahrt.

Bei den Salicyldimethylamidglykosiden wurden Proben zu 2 ml angesetzt, die mit 20 mg der Emulsin-Glucose-Verreibung versetzt worden waren.

Bei Ansätzen mit stärkerer Fermentkonzentration wurden zu den Proben von 1 ml der erwähnten Glykosidlösungen 50 mg Emulsin und zu den Proben von 2 ml 100 mg Emulsin zugegeben.

b) Kolorimetrische Bestimmung des abgespaltenen Aglykons bei Salicylamid- und Salicylmethylamidglykosiden

Eine Probe zu 1 ml wurde unter Nachspülen des Reagenzglases mit destilliertem Wasser in ein 25-ml-Meßkölbchen überführt. Mit destilliertem Wasser wurde auf 25 ml aufgefüllt. Nach gründlichem Umschütteln wurden 5 ml entnommen und mit 5 ml destilliertem Wasser und 1 ml Eisen(III)-Reagenz versetzt. Das Eisen(III)-Reagenz wurde durch Lösen von 15,0 g $FeNH_4(SO_4)_2 + 12 H_2O$ in 500 ml 0,1 n HNO_3 bereitet. Gemessen wurde im Pulfrich-Stufenphotometer unter S 53 in 2-cm-Küvetten. Die Kompensationsflüssigkeit

wurde aus 0,2 ml Puffergemisch A; 9,8 ml destilliertem Wasser und 1 ml Eisen(III)-Reagenz bereitet. Die vorhandenen Aglykommengen wurden aus den Eichkurven entnommen (Kurve II in den Abb. 2 und 3).

Zur Säurespaltung wurde eine Probe zu 1 ml mit 1 ml n HCl versetzt und 30 Minuten im siedenden Wasserbad aufbewahrt. Anschließend wurde 1 ml n NaOH zugesetzt, auf 25 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt und wie oben beschrieben weitergearbeitet.

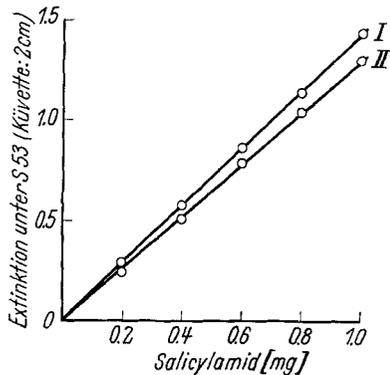


Abb. 2.

Eichkurve für Salicylamid

- I) mg Salicylamid in 10 ml H_2O + 1 ml Fe(III)-Reagenz
 II) mg Salicylamid in 0,057 ml 0,1 m Phosphatpuffer p_H 5,0 und 9,943 ml H_2O + 1 ml Fe(III)-Reagenz

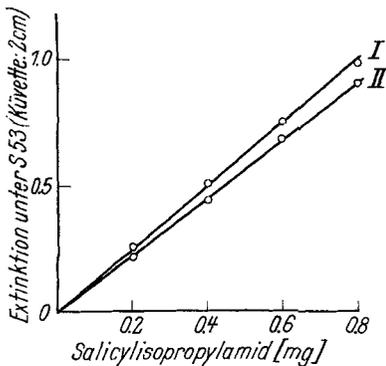


Abb. 4.

Eichkurve für Salicylisopropylamid

- I) mg Salicylisopropylamid in 6 ml H_2O + 5 ml Eisenreagenz
 II) mg Salicylisopropylamid in 0,286 ml 0,1 m Phosphatpuffer p_H 5,0 und 5,714 ml H_2O + 5 ml Fe(III)-Reagenz

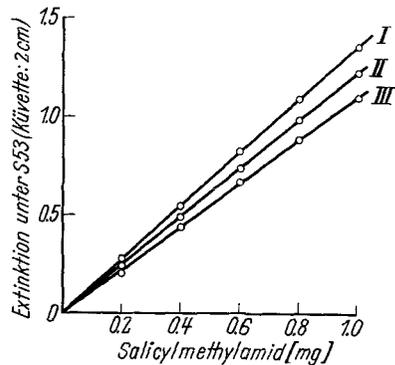


Abb. 3.

Eichkurve für Salicylmethylamid

- I) mg Salicylmethylamid in 10 ml H_2O + 1 ml Fe(III)-Reagenz
 II) mg Salicylmethylamid in 0,057 ml 0,1 m Phosphatpuffer p_H 5,0 und 9,943 ml H_2O + 1 ml Fe(III)-Reagenz
 III) mg Salicylmethylamid in 0,114 ml 0,1 m Phosphatpuffer p_H 5,0 und 9,886 ml H_2O + 1 ml Fe(III)-Reagenz

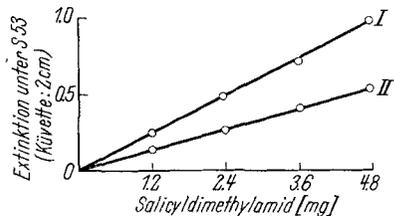


Abb. 5.

Eichkurve für Salicyldimethylamid

- I) mg Salicyldimethylamid in 6 ml H_2O + 5 ml Fe(III)-Reagenz
 II) mg Salicyldimethylamid in 0,571 ml 0,1 m Phosphatpuffer p_H 5,0 und 5,429 ml H_2O + 5 ml Fe(III)-Reagenz

c) Kolorimetrische Bestimmung des abgespaltenen Aglykons bei Salicylpropylamidglykosiden

Da die Spaltung dieser Glykoside langsamer erfolgte, mußte die kolorimetrische Bestimmung in weniger verdünnten Lösungen durchgeführt werden, um eine größere Empfindlichkeit zu erreichen. Eine weitere Änderung des Verfahrens erwies sich als notwendig, da sich die Ansätze beim längeren Aufbewahren trübten. Der Zusatz einer erhöhten Menge des sauren Eisen(III)-reagenzes war notwendig, um ein Ausfallen von Eisenphosphat zu verhindern.

Im einzelnen wurde in folgender Weise gearbeitet:

Eine Probe zu 1 ml wurde auf 6 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Anschließend wurden 2 ml eines Gemisches von 10 ml Puffergemisch A und 50 ml Wasser (= Puffergemisch B) zugesetzt. Die Lösung wurde zentrifugiert und dann filtriert. 6 ml des Filtrates wurden mit 5 ml Eisen(III)-Reagenz versetzt und unter S 53 in 2-cm-Küvetten gemessen. Die Kompensationsflüssigkeit wurde durch Mischen von 6 ml Puffergemisch B und 5 ml Eisen(III)-Reagenz bereit. Die Werte sind der Kurve II in Abb. 4 zu entnehmen. Bei der Aufarbeitung der Spaltansätze mit stärkerer Fermentkonzentration kam es manchmal nach Zusatz des Eisen(III)-Reagenzes zu Trübungen, die durch erneutes Zentrifugieren beseitigt werden konnten.

Zur Säurespaltung wurde eine Probe zu 1 ml mit 1 ml n HCl versetzt, 30 Minuten im siedenden Wasserbad belassen, anschließend mit 1 ml n NaOH versetzt und auf 6 ml mit destilliertem Wasser ergänzt. Mit Phosphatpuffergemisch B wurde auf 25 ml aufgefüllt. Nach gründlichem Umschütteln wurden 5 ml entnommen, mit 1 ml Phosphatpuffergemisch B und 5 ml Eisen(III)-Reagenz versetzt und in üblicher Weise gemessen.

d) Kolorimetrische Bestimmung des abgespaltenen Aglykons bei Salicyldimethylamidglykosiden

Für die Ausbildung farbintensiver Eisenkomplexe ist ein Wasserstoffatom am Amidstickstoff von wesentlicher Bedeutung. Fehlt dieses Wasserstoffatom, wie z. B. beim Salicyldimethylamid, dann fällt die Farbreaktion erheblich schwächer aus. Aus diesem Grunde ist eine höhere Substanzkonzentration notwendig, um die Spaltung verfolgen zu können. Es wurde in folgender Weise gearbeitet:

Eine Probe zu 2 ml wurde mit Wasser auf 6 ml aufgefüllt. Anschließend wurden 2 ml Puffergemisch C (aus 10 ml Puffergemisch A und 20 ml Wasser hergestellt) zugesetzt. Die trübe Lösung wurde zentrifugiert und filtriert. 6 ml Filtrat wurden mit 5 ml Eisen(III)-Reagenz versetzt und in einer 2-cm-Küvette unter S 53 gemessen. Die Kompensationsflüssigkeit wurde durch Mischen von 6 ml Puffergemisch C und 5 ml Eisen(III)-Reagenz bereit.

Bei Spaltproben mit stärkerer Fermentkonzentration wurde wie bei den Salicylpropylamidglykosiden gearbeitet.

Zur Säurespaltung wurde eine Probe zu 2 ml mit 2 ml n HCl versetzt und 30 Minuten im siedenden Wasserbad aufbewahrt. Anschließend wurden 2 ml n NaOH zugesetzt. Wenn notwendig, wurde mit destilliertem Wasser auf 6 ml aufgefüllt. Zu dieser Lösung wurden 5 ml Eisen(III)-Reagenz zugesetzt. Gemessen wurde in üblicher Weise.

Fräulein *Hoessler* danken wir für gewissenhafte Hilfe bei den experimentellen Arbeiten.

Zusammenfassung

1. Die Darstellung einiger Salicylamidglucoside und -galaktoside wird beschrieben.

2. Ihre Spaltung durch Mandel-Emulsin wird quantitativ verfolgt. Bei den Glykosiden, bei denen unter normalen Bedingungen keine Spaltung erfolgt, konnte diese

mit sehr hohen Fermentkonzentrationen (50 mg Emulsin/ml) erreicht werden. Für dieses Verhalten wird die Möglichkeit einer sterischen Hinderung der als Haftstellen für das Ferment fungierenden OH-Gruppen des Pyranringes durch bestimmte Seitenketten des Aglykons diskutiert.

3. Für die Aglykone wurden kolorimetrische Bestimmungsmethoden ausgearbeitet.

Anschri \ddot{f} t: Doz. Dr. Günther Wagner, Greifswald, Soldtmannstr. 23.

1562. H. Pfan \ddot{z} , E. Jassmann*) und H. Breslauer**)

Beiträge zur Synthese spasmolytisch wirksamer Verbindungen

1. Mitteilung: Über basisch substituierte Ester substituierter Aminocarbonsäuren

Aus der Pharmazeutischen Abteilung des VEB Fahlberg-List, Magdeburg

(Eingegangen am 23. Juli 1956)

Wertvolle synthetische Spasmolytica sind u. a. basisch substituierte Ester von Carbonsauren¹⁾ und Aminosaurealkylester²⁾. Es sind neuerdings auch einzelne aliphatische Carbonsäure-ester bekannt geworden, die in der Säure- und Alkoholkomponente basisch substituiert sind und sich durch spasmolytische Aktivität auszeichnen³⁾.

Es wird im folgenden berichtet über Untersuchungen zur Darstellung von Verbindungen, in denen der Carbonsäurerest durch araliphatische Amine substituiert ist und weiter über Verbindungen, welche statt der Phenylgruppen in den betreffenden Aminen teilweise oder ganz den Piperidinrest enthalten. Da die verwendeten Amine zum Teil schon als solche pharmakologisch wirksam sind, wie z. B. das Dibenzylamin⁴⁾, das β,β' -Diphenyldiathylamin⁵⁾ und das Phenylbenzylamin, war es von besonderem Interesse, die spasmolytische Wirksamkeit derart substituierter basischer Carbonsäure-ester zu studieren.

Als Säuren kamen die einfachen Fettsäuren, wie Essigsäure und Propionsäure, in Betracht; nur in einigen Fällen wurden auch Buttersäure- und Capronsaurederivate hergestellt, um orientierende Aussagen über die Beziehung zwischen Carbonsaurelange und pharmakologischer Wirksamkeit machen zu können.

*) Auszug aus der Dissertation von E. Jassmann (Leipzig 1955).

***) Auszug aus der Dissertation von H. Breslauer (Leipzig 1955).

Herrn Prof. Dr. W. Treibs, Direktor des Instituts für Org. Chemie der Univ. Leipzig, sei für sein Einverständnis zur Veröffentlichung und seine Unterstützung besonders gedankt.

¹⁾ u. a. Fromherz, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmacol.* **173**, 86 (1933); Halpern, *ref. Chem. Zbl.* 1938 II, 110; *Chem. Zbl.* 1939 I, 4081; Graham u. Lazarus, *J. Pharmacol.* **69**, 331 (1940).

²⁾ u. a. Junker, *Med. Klin.* **45**, 1108 (1950).

³⁾ u. a. Wunderlich u. Barth, *Pharmazie* **4**, 262 (1956).

⁴⁾ Gump u. Nikawitz, *J. Amer. chem. Soc.* **72**, 1309 (1950).

⁵⁾ Rosenmund u. Külz, *Chem. Ber.* **74**, 2161 (1941).