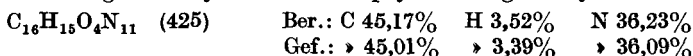
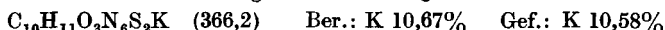


dendem Eisessig etwas löslich, unlöslich in Mineralsäuren und Alkalien. Zwecks Analyse wurde die Umsetzung mit analysenreinem Theophyllin-7-essigsäurehydrazid durchgeführt.



Theophyllin-7-acetyl-dithiocarbazinsäures Kalium (XIV)

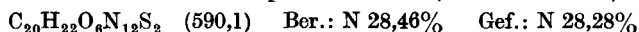
Theophyllin-7-essigsäurehydrazid wurde mit wasserfreiem Kaliumcarbonat und Schwefelkohlenstoff auf dem Wasserbade bis zur Beendigung der Gasentwicklung etwa 2–3 Stunden erhitzt. Im Kolben kristallisierte das Kalisalz von III aus und ließ sich aus 80%igem Alkohol umkristallisieren. Schmp.: bei 360° C noch keine Zersetzung, gut löslich in Wasser, unlöslich in organischen Lösungsmitteln, Geschmack intensiv bitter.



Die freie Säure konnte durch Lösen des Kalisalzes in Wasser und Zusatz von verdünnter Mineralsäure nicht erhalten werden.

Disulfid (XV): 0,5 g XIV wurden in 8 cm³ Wasser heiß gelöst, bei 60° C wurde nun portionsweise eine Jod-Kalijodidlösung zugesetzt, und zwar solange, bis eine schwach-braune Farbe der Lösung erhalten blieb, nun wurde mit verdünnter Salzsäure angesäuert, mit etwas Natriumbisulfidlösung die Reaktionslösung entfärbt.

Nach kurzem Stehen kristallisierten schöne farblose Nadeln des Disulfids aus. Sie zeigten sich löslich in Wasser, Schmp.: 265–267° C (braune Schmelze). Ausbeute: 0,3 g.



1488. Günther Wagner und Hans Kühmstedt

Über Salicylamidglykoside

Aus dem pharmazeutisch-chemischen Institut der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
Direktor: Prof. Dr. Pohloudek-Fabini

(Eingegangen am 26. Februar 1956)

Auf der Suche nach gut wasserlöslichen, neutralen und ohne Zersetzung sterilisierbaren Salicylamidderivaten, die zur Injektion benutzt werden können, beschäftigten wir uns mit der Darstellung von O-Glykosiden verschiedener Salicylamidderivate.

Durch Einführung der hydrophilen Zuckerreste konnte allerdings nicht mit einer Wirkungssteigerung der Salicylamidverbindungen gerechnet werden. Schon Mannich¹⁾ stellte bei dem von ihm synthetisierten Morphinglucosid fest, daß es schwächer wirkte als reines Morphin. Die analgetische Wirkung des Morphinglucosides entsprach der Wirkung des im Molekül vorhandenen Morphins.

Um die besten Darstellungsmöglichkeiten zu ermitteln, wurde Salicylamid-tetraacetyl-glucosid nach folgenden Verfahren zu synthetisieren versucht:

1. Durch Schmelzen von β -Pentaacetylglucose mit Salicylamid in Gegenwart eines sauren Katalysators (Helferich, Schmitz-Hillebrecht²⁾).

2. Durch Umsetzung von β -Pentaacetylglucose mit dem Aluminiumsalz des Salicylamides (Rosenmund, Güssow³⁾).

¹⁾ C. Mannich, Liebigs Ann. Chem. 394, 223 (1912).

²⁾ B. Helferich, E. Schmitz-Hillebrecht, Ber. dtsch. chem. Ges. 66, 378 (1933).

³⁾ K. W. Rosenmund, E. Güssow, Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 287, 38 (1954).

3. Durch Umsetzung von α -Acetobromglucose mit Salicylamid in Gegenwart von Chinolin und Silberoxyd (Robertson, Waters⁴).

4. Durch Umsetzung von α -Acetobromglucose mit dem Kaliumsalz des Salicylamides in Aceton-Wasser-Lösung (Sabalitschka⁵).

Dabei konnten die ersten drei Verfahren nicht mit Erfolg angewendet werden. Aus der Schmelze nach Verfahren 1 konnte kein Salicylamid-tetraacetylglucosid isoliert werden. Das Verfahren nach Rosenmund und Güssow konnte nicht angewendet werden, weil die Darstellung eines in Xylol löslichen Aluminiumphenolates nicht gelang. Bei dem Verfahren nach Robertson und Waters bereitete die Aufarbeitung der Umsetzungslösung große Schwierigkeiten.

Dagegen konnten wir nach dem von Sabalitschka beschriebenen Verfahren durch Umsetzung von äquimolaren Mengen der Kaliumsalze der verschiedenen Salicylamidderivate und α -Acetobromglucose in Aceton-Wasser-Lösung verschiedene Tetraacetylglukoside synthetisieren. Auf die Darstellung der festen Kaliumsalze der Salicylamidderivate wurde allerdings verzichtet. Die Tetraacetylglukoside wurden durch Umesterung mit 0,1 n Na-Methylatlösung (Zemplén, Pascu⁶) in die entsprechenden Glykoside überführt.

Die Darstellung der Salicylamidglykoside war auch möglich, indem zunächst nach gleicher Methode Salicylsäuremethylester-tetraacetyl- β -d-glucosid dargestellt und diese Verbindung in abs. methanolischer Lösung mit Ammoniak bzw. den entsprechenden Aminen zu den Salicylamidglucosiden umgesetzt wurden. Dieses Darstellungsverfahren besitzt aber praktisch geringere Bedeutung, weil Salicylsäuremethylester- β -d-glucosid in wesentlich geringerer Ausbeute gewonnen werden kann als z. B. Salicylamid-tetraacetyl- β -d-glucosid durch direkte Umsetzung von Salicylamid mit α -Acetobromglucose.

Folgende Glykoside und ihre Tetraacetylverbindungen wurden dargestellt:

	R_1	R_2	Zucker
Salicylamid- β -d-glucosid	H	H	Glucose
Salicylamid- β -d-galaktosid	H	H	Galaktose
Salicylmethylamid- β -d-glucosid	H	CH ₃	Glucose
Salicylisopropylamid-d-glucosid	H	$-\text{CH} \begin{array}{l} \diagup \text{CH}_3 \\ \diagdown \text{CH}_3 \end{array}$	Glucose
Salicyldimethylamid-d-glucosid	CH ₃	CH ₃	Glucose

Während die Salicylamidaglykone sehr schlecht in Wasser von 20° C löslich sind, wurde bei den dargestellten Verbindungen folgende Löslichkeit ermittelt:

⁴) A. Robertson, R. B. Waters, J. chem. Soc. [London] p. 1881 (1931).

⁵) Th. Sabalitschka, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 267, 675 (1929).

⁶) G. Zemplén, Pascu, Ber. dtsh. chem. Ges. 62, 1613 (1929).

Tabelle 1

Löslichkeit einiger Salicylamidglykoside in Wasser von 20° C

Substanz	Löslichkeit
Salicylamid- β -d-glucosid	5%
Salicylamid- β -d-galaktosid	2,0%
Salicylmethylamid- β -d-glucosid	3,3%
Salicyldimethylamid-d-glucosid	5%

Die Löslichkeit der Salicylamidglykoside ändert sich sehr beträchtlich bei Temperaturschwankungen. Schon geringe Erhöhung der Temperatur vermag einen wesentlich höheren Prozentsatz an Glykosid zu lösen, wie es andererseits bei Unterkühlung sehr schnell zu Glykosidausfällungen kommt, die aber leicht wieder in Lösung gebracht werden können.

Die Lösungen der Glykoside reagieren neutral. Eine 2,5%ige Salicylamidglucosidlösung in dest. Wasser zeigte nach einstündiger Sterilisation im strömenden Wasserdampf keine Zersetzung.

Um die synthetisierten Verbindungen der α - oder β -Reihe zuordnen zu können, wurden Spaltversuche mit Emulsin und Hefeautolysat durchgeführt. Von Emulsin werden Salicylamidglucosid, Salicylamidgalaktosid und Salicylmethylamidglucosid bei 37° C in 48 Stunden vollständig gespalten. Von Salicyldimethylamidglucosid und Salicylisopropylamidglucosid konnte bei gleicher Versuchsanordnung nach dieser Zeit im papierchromatographischen Versuch kein Aglykon, sondern nur unverändertes Glykosid aufgefunden werden.

Von der β -Glucosidase des Emulsins werden die β -Glykoside gespalten, und wie schon *E. Fischer*⁷⁾ und dann *Helferich* und Mitarbeiter⁸⁾ feststellten, auch die β -Galaktoside. Mit Hefeautolysat ließen sich alle 5 synthetisierten Verbindungen spalten. Der Schluß, daß aus diesem Grunde bei Salicylamidglucosid, Salicylmethylamidglucosid und Salicylamidgalaktosid Gemische der α - und β -Reihe vorliegen, ist nicht berechtigt, da einmal durch Emulsin eine vollständige Spaltung der erwähnten Verbindungen erfolgt, und zum anderen auch Verbindungen, für die die β -Glykosidkonfiguration gesichert ist, wie z. B. Salicylsäuremethylester-d-glucosid und Arbutin durch Hefeautolysat gespalten werden. Es muß vielmehr angenommen werden, daß die mit Emulsin spaltbaren Glykoside β -Konfiguration besitzen und im Hefeautolysat auch Fermente vorhanden sind, die die β -glucosidische und β -galaktosidische Bindung der Salicylamidglykoside aufzuspalten vermögen.

Für Salicyldimethylamidglucosid und Salicylisopropylamidglucosid wäre nach den enzymatischen Spaltversuchen α -Konfiguration anzunehmen. Für die α -Konfiguration des Salicyldimethylamidglucosides spricht auch das Verteilungsverhalten der Substanz. Trotz der Einführung einer hydrophoben Methylgruppe werden im Vergleich zum Salicylmethylamidglucosid niedrigere R_f -Werte gefunden.

⁷⁾ *E. Fischer*, Ber. dtsch. chem. Ges. 28, 1155 (1895).

⁸⁾ *B. Helferich*, *R. Gootz*, *G. Sparmberg*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 205, 201 (1932).

Schon *Kariyone, Takahashi, Takaishi* und *Isaka*⁹⁾ fanden, daß sich die untersuchten α -Glucoside verschiedener Phenole besser als die dazugehörigen β -Glucoside zugunsten der wässrigen Phase verteilen und damit niedrigere R_f -Werte besitzen. Gegen die Annahme einer α -Struktur bei den mit Emulsin nicht spaltbaren Salicylamidglucosiden spricht die optische Drehung, die bei diesen Verbindungen linksgerichtet ist und in gleicher Größenordnung liegt wie bei den β -Glykosiden der Salicylamid- und ganz allgemein der Salicylsäurereihe. Bei allen bisher synthetisierten phenolischen α -Glucosiden bzw. Galaktosiden¹⁰⁾ wurde starke Rechtsdrehung festgestellt (s. *Hudsonsche Regeln*).

Wir nehmen vorläufig an, daß auch dem Salicyldimethylamid-d-glucosid und dem Salicylisopropylamid-d-glucosid β -Struktur zukommt, die Verbindungen aber auf Grund ihrer Konstitution von der β -Glucosidase des Emulsins nicht gespalten werden können. Über Zusammenhänge zwischen der chemischen Konstitution der Glykoside der Salicylsäurereihe und ihrer Spaltbarkeit mit Emulsin wird später berichtet werden.

Versuchsteil

I. Synthetisierte Verbindungen:

1. Aglykone

Salicylamid und Salicylisopropylamid wurden durch Extraktion aus *Algamon* bzw. *Lopirintabletten* und wiederholtes Umfällen aus Methanol/Wasser gewonnen.

Salicylmethylamid:

In eine 10%ige Lösung von Methylsalicylat in absolutem Methanol wurde ein über Kaliumhydroxyd getrockneter Methylaminstrom 3 Stunden lang eingeleitet. Dabei erwärmte sich die Lösung beträchtlich. Am nächsten Tage wurde der Methylalkohol abdestilliert und der sofort auskristallisierende Rückstand zweimal aus Äthanol/Wasser umkristallisiert.

Fp.: 86–87° C.

Salicyldimethylamid:

In eine 10%ige Lösung von Methylsalicylat in absolutem Methanol wurde das aus einer wäßrigen Dimethylaminlösung mit Kaliumhydroxyd entwickelte Dimethylamingas 3 Stunden lang eingeleitet. Die Lösung erwärmte sich dabei und blieb über Nacht stehen. Nach dem Abdestillieren des Alkohols blieb ein rötliches Öl zurück, das nach dem Anreiben mit Wasser beim Abkühlen erstarrte. Das Wasser wurde abgesaugt und der trockne Rückstand zweimal mit Äther angeschüttelt und wieder abgenutscht. Der Äther wurde verworfen. Die Substanz wurde zweimal aus Wasser umkristallisiert.

Fp.: 161–164° C.

2. Tetraacetylglykoside und Glykoside

Salicylamid-tetraacetyl- β -d-glucosid:

12,3 g α -Acetobromglucose wurden in 36 g Aceton gelöst. 4,1 g Salicylamid und 1,7 g KOH wurden in 15 ml Wasser gelöst. Beide Lösungen wurden vereinigt und unter wieder-

⁹⁾ *T. Kariyone, M. Takahashi, K. Takaishi, H. Jsaka*, J. pharm. Soc. Japan 73, 404 (1953); ref. C. A. 48, 3322 (1954).

¹⁰⁾ u. a. *B. Helferich, K. H. Jung*, Liebigs Ann. Chem. 589, 77 (1954); *T. Kariyone, M. Takahashi, K. Takaishi*, J. pharm. Soc. Japan 72, 13 (1952), ref. C. A. 46, 11114 (1952); *M. Takahashi, J. pharm. Soc. Japan* 74, 706 (1954), ref. C. A. 49, 11565 (1955); *T. Kariyone, M. Takahashi, K. Takaishi, H. Jsaka*, J. pharm. Soc. Japan 73, 850 (1953), ref. C. A. 48, 9929 (1954).

holtem Umschütteln 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen. Dabei bildeten sich 2 Schichten aus. Der größte Teil des Acetons wurde anschließend auf dem Wasserbade verdampft und der Rückstand mit 400 ml Benzol aufgenommen. Die benzolische Lösung wurde zweimal mit 100 ml Wasser und anschließend dreimal mit je 100 ml 5%iger NaOH ausgeschüttelt und abschließend mit destilliertem Wasser alkalifrei gewaschen. Dabei muß schnell gearbeitet werden, weil sonst das Tetraacetylglucosid schon im Scheidetrichter auskristallisiert. Will man das vermeiden, so kann man für Benzol Chloroform benutzen. Das aus der Benzollösung auskristallisierte Tetraacetylglucosid wurde abfiltriert. Das Filtrat wurde über CaCl_2 getrocknet. Durch Destillation im Vakuum wurde das Benzol entfernt. Es blieb ein sirupöser Rückstand, der beim Anreiben mit dem Glasstab erstarrte. Die beiden Tetraacetylglucosidfraktionen wurden durch mehrmaliges Umkristallisieren aus absolutem Methanol gereinigt.

Ausbeute: 50—65%.

Fp.: 157—159° C.

Drehung in Chloroform: $[\alpha]_D^{20} = \frac{-9,3 \cdot 100}{1,5 \cdot 10,03} = -61,8^\circ$

Analyse: $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{O}_{11}\text{N}_1$ (Mol.-Gew. 467,42)

Ber.: C 53,96% H 5,39% N 3,00%

Gef.: » 53,87% » 5,35% » 3,06%

Salicylamid- β -d-glucosid:

a) Aus Salicylamid-tetraacetyl- β -d-glucosid durch Verseifen mit 0,1 n-Na-Methylatlösung

2,0 g Salicylamid-tetraacetyl- β -d-glucosid wurden in 5 ml absolutem Methanol gelöst und 1,0 ml 0,1 n Na-Methylatlösung zugegeben. Die Lösung wurde 5—15 Minuten auf dem Wasserbade im Sieden erhalten. Dabei schied sich das gebildete Glucosid aus der Lösung ab. Die ausgeschiedene Substanz wurde nach dem Erkalten abfiltriert und zweimal aus abs. Äthanol umkristallisiert.

Fp.: 202—204° C.

Drehung in destilliertem Wasser: $[\alpha]_D^{20} = \frac{-4,46 \cdot 100}{1,503 \cdot 5,0016} = -59,3^\circ$

Analyse: $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{O}_7\text{N}_1$ (Mol.-Gew. 299,29)

Ber.: C 52,17% H 5,73% N 4,68%

Gef.: » 52,07% » 5,66% » 4,89%

b) Durch Umsetzung von Salicylsäuremethylestertetraacetyl- β -d-glucosid mit Ammoniak

Salicylsäuremethylester-tetraacetyl- β -d-glucosid⁴⁾ wurde in ähnlicher Weise wie Salicylamid-tetraacetyl- β -d-glucosid aus äquimolaren Mengen des Kaliumsalzes des Salicylsäuremethylesters und α -Acetobromglucose in 11—16%iger Ausbeute hergestellt.

Fp.: 158—160° C.

2,0 g Salicylsäuremethylester-tetraacetyl- β -d-glucosid wurden in 50 ml abs. Methanol aufgeschlämmt. Die Suspension wurde auf 0° C abgekühlt und anschließend 1,5 Stunden trockenes Ammoniakgas eingeleitet. Dabei trat vollständige Lösung der Substanz ein. Die Reaktionslösung wurde in Eis über Nacht stehengelassen. Dann wurde Ammoniak im Vakuum abgesaugt und das Methanol bei 25° C abdestilliert. Der verbleibende Rückstand gab eine stark positiv ausfallende Reaktion mit Eisen(III)-chloridlösung und wurde dreimal mit Äther und zur Entfernung des nebenbei entstandenen Acetamids zweimal mit Essigester gewaschen und anschließend aus Äthanol umkristallisiert.

Fp.: 201—204° C.

Salicylamid-tetraacetyl- β -d-galaktosid:

13,5 g α -Acetobromgalaktose wurden in 30 ml Aceton gelöst. Dazu wurde eine Lösung von 1,87 g Kaliumhydroxyd und 4,5 g Salicylamid in 10 ml destilliertes Wasser gegeben. Die Reaktionslösung wurde in üblicher Weise aufgearbeitet. Ein Auskristallisieren des

Tetraacetylgalaktosides aus der Benzollösung erfolgte nicht. Die erhaltene Schmiere wurde im Vakuum restlos vom Benzol befreit und kristallisierte nach Anreiben mit Methanol.

Die Substanz wurde zweimal aus wenig Methanol umkristallisiert. Die Lösungen wurden zum Kristallisieren im Kühlschrank aufbewahrt. Kristallplatten.

Ausbeute: 45–50%.

Fp.: 118–121° C.

Drehung in Chloroform: $[\alpha]_D^{20} = \frac{-6,34 \cdot 100}{1,503 \cdot 9,9644} = -42,3^\circ$

Analyse: $C_{21}H_{25}O_{11}N_1$ (Mol.-Gew. 467,42)

Ber.: C 53,96% H 5,39% N 3,00%

Gef.: » 54,09% » 5,47% » 2,89%

Salicylamid- β -d-galaktosid:

2,0 g der Tetraacetylverbindung wurden in 5 ml abs. Methanol gelöst und mit 2 ml 0,1 n-Na-Methylatlösung versetzt. Die Lösung wurde auf dem Wasserbad zum Sieden erhitzt. Nach 5 Minuten begann sich das Galaktosid abzuschcheiden. Es wurde noch 5 Minuten weiter erhitzt und die nach dem Abkühlen ausgeschiedene Substanz aus viel Methanol umkristallisiert. Nadeln.

Fp.: 203–205° C.

Drehung in destilliertem Wasser: $[\alpha]_D^{20} = \frac{-0,8 \cdot 100}{2 \cdot 1,2335} = -32,3^\circ$

Analyse: $C_{13}H_{17}O_7N_1$ (Mol.-Gew. 299,29)

Ber.: C 52,17% H 5,73% N 4,68%

Gef.: » 51,97% » 5,72% » 4,57%

Salicylmethylamid-tetraacetyl- β -d-glucosid:

13,6 g α -Acetobromglucose wurden in 30 ml Aceton und 5,0 g Salicylmethylamid und 1,89 g Kaliumhydroxyd in 10 ml Wasser gelöst. Die Lösungen wurden vereinigt und wie bei Salicylamid-tetraacetyl- β -d-glucosid aufgearbeitet. Umkristallisation aus Methanol bzw. aus viel Benzol. Aus Methanol Nadeln.

Ausbeute: 30–40%

Fp.: 195–197° C.

Drehung in Chloroform: $[\alpha]_D^{20} = \frac{-9,49 \cdot 100}{1,503 \cdot 9,6084} = -65,7^\circ$

Analyse: $C_{22}H_{27}O_{11}N_1$ (Mol.-Gew. 481,44)

Ber.: C 54,88% H 5,65% N 2,91%

Gef.: » 54,91% » 5,58% » 2,90%

Salicylmethylamid- β -d-glucosid:

Aus dem Tetraacetylglucosid durch Verseifen mit Na-Methylatlösung. Umkristallisation aus Wasser. Kristallisiert mit 1 Mol H_2O in Form haarförmiger Nadeln.

Fp.: 122–124° C.

Drehung in Wasser: $[\alpha]_D^{20} = \frac{-1,76 \cdot 100}{1,503 \cdot 2,512} = -46,70^\circ$

Analyse: $C_{14}H_{19}O_7N_1 + 1 H_2O$ (Mol.-Gew. 331,32)

Ber.: C 50,75% H 6,39% N 4,23%

Gef.: » 50,68% » 6,29% » 4,20%

Salicyldimethylamid-tetraacetyl-d-glucosid:

12,5 g α -Acetobromglucose wurden in 30 ml Aceton und 5,0 g Salicyldimethylamid und 1,7 g Kaliumhydroxyd in 10 ml Wasser gelöst. Die vereinigten Lösungen wurden wie Salicylamid-tetraacetyl-d-galaktosid aufgearbeitet. Umkristallisation aus wenig Methanol.

Ausbeute: 8–15%.

Fp.: 157–159° C.

$$\text{Drehung in Chloroform: } [\alpha]_{\text{D}}^{20^\circ} = \frac{-11,8 \cdot 100}{1,5 \cdot 9,72} = -80,9^\circ$$

Analyse: $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{O}_{11}\text{N}_1$ (Mol.-Gew. 495,47)

Ber.: C 55,75%	H 5,90%	N 2,83%
Gef.: » 55,61%	» 6,01%	» 2,78%

Salicyldimethylamid-d-glucosid:

Verseifung mit 0,1 n-Na-Methylatlösung in abs. Methanol. Umkristallisation aus Methanol.

Fp.: 229—231° C.

$$\text{Drehung in Wasser: } [\alpha]_{\text{D}}^{20^\circ} = \frac{-2,2 \cdot 100}{1,5 \cdot 4,04} = -36,3^\circ$$

Analyse: $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{O}_7\text{N}_1$ (Mol.-Gew. 327,33)

Ber.: C 55,04%	H 6,47%	N 4,28%
Gef.: » 54,73%	» 6,39%	» 4,11%

Salicylisopropylamid-tetraacetyl-d-glucosid:

3,7 g α -Acetobromglucose wurden in 12 ml Aceton und 1,8 g Salicylisopropylamid und 0,6 g Kaliumhydroxyd in 5 ml Wasser gelöst. Die Aufarbeitung erfolgte wie bei Salicylamid-tetraacetyl- β -d-galaktoosid beschrieben. Die Substanz wurde zweimal aus Methanol, dem wenig Wasser zugesetzt war, umkristallisiert.

Ausbeute: 15—25%

Fp.: 129—131° C.

$$\text{Drehung in Chloroform: } [\alpha]_{\text{D}}^{20^\circ} = \frac{-7,75 \cdot 100}{1,503 \cdot 9,372} = -55,0^\circ$$

Analyse: $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{O}_{11}\text{N}_1$ (Mol.-Gew. 509,5)

Ber.: C 56,76%	H 6,13%	N 2,75%
Gef.: » 56,65%	» 6,25%	» 2,75%

Salicylisopropylamid-d-glucosid:

Verseifung des Tetraacetylglucosides mit 0,1 n-Na-Methylatlösung in abs. Methanol. Es gelang nicht, die Substanz aus Methanol zur Kristallisation zu bringen. Aus methanolischer Lösung wurde mit Äther eine amorphe Masse ausgeschieden, die keinen definierten Schmelzpunkt besaß, sich aber papierchromatographisch als einheitlich erwies. Die Substanz wurde in wenig Wasser aufgenommen, filtriert und die Lösung im P_2O_5 -Exsikkator zur Trockne eingedampft. Es fiel eine farblose, durchsichtige Masse an, die sich nach einiger Zeit zu einem weißen Pulver zerreiben ließ. Auf die Bestimmung der Drehung wurde verzichtet.

Analyse: $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{O}_7\text{N}_1 + 1 \text{ H}_2\text{O}$ (Mol.-Gew. 359,37)

Ber.: C 53,47%	H 7,01%	N 3,90%
Gef.: » 54,04%	H 6,80%	» 4,16%

Alle Schmelzpunkte sind unkorrigiert.

II. Papierchromatographische Untersuchungen

Die papierchromatographischen Versuche wurden nach der früher¹¹⁾ beschriebenen Technik auf Schleicher und Schüll 2043a durchgeführt. Gepufferte Papiere wurden in folgender Weise bereitet: Die Papiere wurden durch die entsprechenden Pufferlösungen gezogen, durch Abpressen zwischen Filtrierpapier von überflüssiger Lösung befreit und zum Trocknen einen Tag lang in einem von Lösungsmitteln nicht vergifteten Raum aufgehängt. Besonders für die Natronlauge enthaltenden Puffer ist es wichtig, daß die Trockenzeit eingehalten wird, wenn reproduzierbare R_f -Werte gefunden werden sollen. Für die beschriebenen Aglykone und Glykoside sind die von mindestens 10 Bestimmungen

¹¹⁾ G. Wagner, Pharmazie 9, 741 (1954).

erhaltenen Mittelwerte in Tabelle 2 zusammengestellt. Zum Vergleich wurden Salicylsäuremethylester- β -d-glucosid und Salicylsäure- β -d-glucosid¹²⁾ mit in die Untersuchungen einbezogen.

Die Substanzen wurden vor dem Auftragen in abs. Methanol teilweise unter Erhitzen gelöst. Besonders für Salicylsäure- β -d-glucosid ist es wichtig, daß abs. Methanol genommen wird, weil es sonst zu einer Aufspaltung des Glucosides kommen kann. Es wurden 10 bis 50 γ der einzelnen Glykoside aufgetragen. Die Aglykone wurde durch Besprühen mit einer 5%igen Eisen(III)-chloridlösung entwickelt; Aglykone und Glykoside konnten nach Besprühen mit Millons Reagenz und Erhitzen der Papiere im Trockenschrank auf 95° C als gelbbraune Flecke erkannt werden. Salicylsäure- β -d-glucosid erwies sich auch noch auf p_H-5-Papier als beständig. Salicylsäuremethylester- β -d-glucosid wurde beim Chromatographieren mit dem Butanol/Ammoniak-Verteilungsmittel in Salicylamid- β -d-glucosid und Salicylsäure- β -d-glucosid aufgespalten.

Tabelle 2

R_f-Werte einiger Salicylamidglykoside und ihrer Aglykone*)

(Papier: Schleicher und Schüll 2043a)

Substanz	n-Butanol/H ₂ O 1 : 1 v/v			n-Butanol/ NH ₄ OH (2,5%ig) 2 : 1 v/v
	0,067m KH ₂ PO ₄ / Na ₂ HPO ₄		0,1 m NaOH/ Glykokoll pH 12,0	
	pH 5,0	pH 6,0		
Salicylamid-β-d-galaktosid	0,37	0,37	0,37	0,38
Salicylamid-β-d-glucosid	0,41	0,41	0,42	0,42
Salicylmethylamid-β-d-glucosid	0,57	0,58	0,59	0,58
Salicyldimethylamid-d-glucosid	0,48	0,48	0,48	0,47
Salicylisopropylamid-d-glucosid	0,79	0,80	0,81	0,79
Salicylsäuremethylester-β-d-glucosid	0,77	0,77	0,76 (0,06)	0,76 (0,42; 0,06)
Salicylsäure-β-d-glucosid	0,09	0,05	0,04	0,07
Salicylsäure	0,64	0,50	0,51	0,52
Salicylamid	—	—	0,76	0,43
Salicylmethylamid	—	—	0,84	0,59
Salicyldimethylamid	—	—	0,86	0,68
Salicylisopropylamid	—	—	0,95	0,82

III. Enzymatische Spaltversuche

1. mit Emulsin⁵⁾:

50 mg des entsprechenden Glykosides wurden in 10 ml destilliertem Wasser gelöst. Der Lösung wurden 10 mg Emulsin „Merck“ und 1—2 Tropfen Toluol zugesetzt. Die Lösungen wurden anschließend 2 Tage bei 37° C im Ultrathermostaten aufbewahrt. Die enzymatische Abspaltung der Zuckerreste konnte nach Zusatz von 5%iger Eisen(III)-chloridlösung durch violette Färbung der Lösung erkannt werden. Zur Identifizierung der Substanzen wurden die Lösungen ohne weitere Vorbereitung auf Papier aufgetragen und papierchromatographisch untersucht. Aglykone und Glykoside konnten am besten mit wassergesättigtem n-Butanol auf p_H-12-Papier bzw. mit Butanol/NH₄OH (2,5%ig) 2 : 1 nebeneinander identifiziert werden. Auf die quantitative Verfolgung der enzymatischen Spaltung wurde zunächst verzichtet.

*) Die R_f-Werte wurden als Mittelwerte von mindestens 10 Einzelbestimmungen errechnet.

¹²⁾ B. Helferich, H. Lutzmann, Liebigs Ann. Chem. 537, 11 (1938).

Für Vergleichsversuche wurde die Enzymlösung durch einstündiges Erhitzen auf 110° C inaktiviert. Mit einer derart vorbehandelten Lösung wurde unter gleichen Bedingungen keines der untersuchten Glykoside gespalten.

2. mit Hefeautolysat¹³⁾:

20 g Preßhefe wurden mit 2,0 g sek. Ammoniumphosphat 1 Stunde lang verrührt. Dabei verflüssigte sich die Hefe. Die Lösung wurde mit destilliertem Wasser auf 80 ml ergänzt (10 ml Lösung enthielt danach 1 g Trockenhefe).

In 8 ml des so erhaltenen Hefeautolysates wurden 50 mg Glykosid gelöst. Nach Zusatz von 2 ml 0,1 m Phosphatpuffer pH 7 wurde die Lösung 48 Stunden bei 37° C aufbewahrt.

Die enzymatische Hydrolyse gab sich durch einen positiven Ausfall der Farbreaktion mit Eisen(III)-chloridlösung zu erkennen. Da die Eisenchloridlösung direkt der phosphathaltigen Hefelösung zugesetzt wurde, war eine größere Menge Reagenz nötig, um die violett gefärbten Eisenkomplexe zu erkennen. Zur Identifizierung der abgespaltenen Aglykone wurden jeweils 2 ml der hefehaltigen Lösung zweimal mit je 5 ml Äther ausgeschüttelt. Der Äther wurde zweimal mit 3 ml Wasser gewaschen und abdestilliert. Der Rückstand wurde mit 0,5 ml Methanol aufgenommen und auf Papier aufgetragen. Die Papiere wurden wie bereits beschrieben weiter bearbeitet.

Bei Vergleichsversuchen mit Hefelösung, die durch mehrstündiges Erhitzen auf 110° C inaktiviert worden war, wurden die Salicylamidglykoside nicht gespalten.

Fräulein Hößler danken wir für die gewissenhafte Hilfe bei den Arbeiten.

Zusammenfassung

1. Es wurde über die Darstellung einiger Salicylamidglykoside berichtet.
2. Ihr papierchromatographisches Verhalten und ihre Spaltbarkeit mit Emulsin bzw. mit Hefeautolysat wurde untersucht.
3. Bei Salicyldimethylamid-d-glucosid und Salicylisopropylamid-d-glucosid wird vermutet, daß die β -Glucosidase des Emulsins die β -glucosidische Bindung des Zuckers aus sterischen Gründen nicht spalten kann.

¹³⁾ R. Weidenhagen in E. Bamann und K. Myrbäck: „Die Methoden der Fermentforschung“, Leipzig 1941, New York 1945, Bd. 2, p. 1740.

1489. R. Krasemann

Beiträge zur Methodik biologischer Wertbestimmungen

(2. Mitteilung)

Aus dem Pharmakognostischen Institut der Technischen Hochschule Braunschweig
Direktor: Prof. Dr. R. Jaretzky

(Eingegangen am 7. März 1956)

Die Vielzahl der beschriebenen Methoden zur Farnwertbestimmung und besonders die Tatsache, daß dazu die verschiedensten Testtiere empfohlen und verwendet wurden, waren der Anlaß, eine grundsätzliche Klärung der Kriterien, die man bei der Auswahl von Testtieren berücksichtigen sollte, durchzuführen.

Dabei sind zwei Gesichtspunkte maßgebend: 1. der pharmakologische, 2. der analytische.