

acetal ungefähr 2.5 g reines Chlorhydrat. Die freie Base wird durch Natronlauge als dickes Öl gefällt, welches im Exsiccator erstarrt, aber wenig Neigung zum Krystallisieren zeigt.

0.1114 g Sbst.: 0.0377 g AgCl.

$C_{20}H_{28}O_6NCl$. Ber. Cl 8.58. Gef. Cl 8.37.

Über die pharmakologischen Eigenschaften der hier beschriebenen Stoffe mag noch angeführt werden, daß einzelne der Bis-[oxy-aryl]-amino-äthan-Basen kräftig vernichtend auf Paramäcien einwirken. So tötet, wie Hr. Geh. Rat Straub mir frdl. mitteilt, das Dithymol-amino-äthan die genannten Lebewesen noch in Verdünnungen von 1:40 000. Die erregende Wirkung des α -[Trioxy-phenyl]- β -amino-äthan-Chlorhydrats auf den Uterus wurde bereits erwähnt; nach Beobachtungen von Hrn. Prof. S. Löwe zeigen auch einzelne Phenol-äther dieser Reihe, z. B. die Verbindung $([CH_3O]_3C_6H_5)_2CH \cdot CH_2 \cdot NH_2$, HCl, dieselbe Art der Wirksamkeit und zwar in erhöhtem Maße.

Freiburg i. B.

120. Richard Kuhn: Die Biase des Amygdalins.

[Aus d. Chem. Laborat. d. Bayer, Akad. d. Wissensch. in München.]

(Eingegangen am 5. Februar 1923.)

Das Amygdalin ist im Jahre 1830 von P. Robiquet und F. Boudron-Charlard¹⁾ aus bitteren Mandeln in krystallisiertem Zustand abgetrennt worden. Von ihm nahmen die klassischen Untersuchungen von F. Wöhler und J. Liebig²⁾ über das »Benzoyl«, das Radikal des Bittermandelöls, ihren Ausgang. Wöhler und Liebig³⁾ haben auch den Nachweis geliefert, daß es in den Mandelsamen von einem »vegetabilischen Eiweiß«, dem Emulsin, begleitet wird, welches das Glucosid in Blausäure, Benzaldehyd und Traubenzucker spaltet. Viel später hat E. Fischer⁴⁾ die partielle Hydrolyse kennen gelehrt, die das Amygdalin durch Hefe und deren Auszüge erleidet. Das dabei neben Traubenzucker erhaltene Spaltprodukt, das Mandelnitril-glucosid, konnte er in Gemeinschaft mit M. Bergmann⁵⁾ auf synthetischem Wege gewinnen. Ungewiß ist die Verknüpfungsart der beiden Glucose-Reste im Amygdalin-Molekül geblieben. Denn die Angabe Giajas⁶⁾, der mit Hilfe des Verdauungssaftes der Weinbergschnecke ein nicht reduzierendes Disaccharid erhalten haben will, steht in Widerspruch mit der Tatsache, daß weder das Amygdalin, noch das Mandelnitril-glucosid Fehlingsche Lösung reduzieren.

Vor kurzem haben W. N. Haworth und G. C. Leitch⁷⁾ ihre in früheren Untersuchungen über Disaccharide bewährte Methode der Methylierung auf das Amygdalin übertragen. Unter der Einwirkung von Dimethylsulfat und Natronlauge geht das Glucosid unter Racemisierung des Mandelsäure-Restes⁸⁾ in Heptamethyl-amygdalinsäure-methyl-

1) A. ch. [2] 44, 352 [1830]; Pogg. Ann. 20, 494 [1830]. 2) A. 3, 249 [1832].

3) A. 22, 1 [1835]; A. ch. [2] 64, 185 [1837]. 4) B. 28, 1508 [1895].

5) E. Fischer und M. Bergmann, B. 50, 1047 [1917].

6) C. r. 150, 793 [1910]. 7) Soc. 121, 1921 [1922].

8) H. D. Dakin, Soc. 85, 1512 [1904].

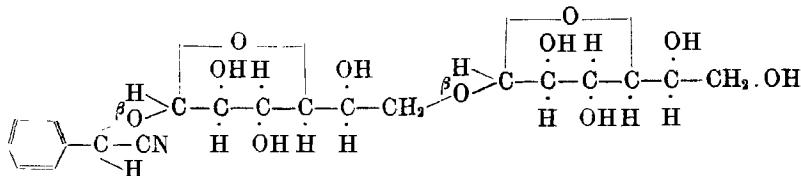
ester über. Aus diesem wurden durch Säurespaltung erhalten: 1. *d,l*-Mandelsäure, 2. 2,3,5,6-Tetramethyl-glucose (Schmp. 89°), 3. eine Trimethyl-glucose, für deren Methylgruppen durch Überführung in Trimethyl- β -methylglucosid (Schmp. 94,5°) und durch Oxydation zum Lacton der Trimethyl-zuckersäure die 2,3,5-Stellung bewiesen wurde. Die unter 2 und 3 angeführten Körper sind identisch mit denen, die Haworth und Leitch bei der Hydrolyse des vollständig methylierten Malzzuckers⁹⁾ erhalten haben.

»The disaccharide of amygdalin has therefore the structure of maltose and quite definitely cannot be cellobiose. For the stereochemical formulation of this maltose structure we are dependent on the researches of other workers on the selective action of enzymes, and here the results, if not conflicting, are certainly anomalous. Their results favour the view that the amygdalinbiose is a glucose- α -glucoside . . . and therefore, on this reasoning, the biose itself must be maltose and amygdalin is mandelonitrile- β -maltoside«. Die englischen Forscher fügen aber hinzu: »Should it ultimately be the case that the stereochemical representation of the biose is found to be that of a glucose- β -glucoside, this cannot, of course, affect the structural formula we have herein ascribed to the sugar, but it may point to the identity of the amygdalin biose with isomaltose or gentiobiose«¹⁰⁾.

Die Frage nach der Natur der Amygdalin-Biose läßt sich nun entscheiden durch Untersuchung der Mutarotation des Traubenzuckers, der bei rascher enzymatischer Hydrolyse aus dem Glucosid entbunden wird¹¹⁾. Die folgenden Versuche, in denen nach Sistierung der Enzymwirkung (z. B. durch Sublimat) durchwegs Drehungszunahmen beobachtet wurden, beweisen, daß beide Glucose-Reste in β -Form vorliegen.

S. J. M. Auld¹²⁾ hat nach Unterbrechung der Amygdalin-Hydrolyse durch Zusatz von Ammoniak Drehungsabnahmen beobachtet. Im experimentellen Teil wird aber gezeigt, daß dieser Effekt nicht der Mutarotation des gebildeten Zuckers entspricht. Er ist bedingt durch die beträchtliche Drehungsabnahme, die eine Amygdalin-Lösung auf Zusatz von Ammoniak zeigt¹³⁾.

Das Disaccharid des Amygdalins ist also nicht Maltose¹⁴⁾, sondern 1,6- β -Glucosido-glucose. Die räumliche Anordnung der 59 Atome, die das Molekül des Amygdalins aufbauen, ist damit festgelegt. Der Konfiguration des Amygdalins entspricht die Formel:



⁹⁾ Soc. 115, 809 [1919]. ¹⁰⁾ a. a. O. und zwar S. 1924.

¹¹⁾ E. F. Armstrong, Soc. 83, 1305 [1903] hat auf diese Weise z. B. den genetischen Zusammenhang von Malzzucker und α -Glucose dargetan.

¹²⁾ Soc. 93, 1276 [1908]. Unverständlich ist die Folgerung, die Auld aus seinen Versuchen gezogen hat: »From these results it would therefore seem to have been definitely proved that the biose from which amygdalin is derived is not maltose, but an α, β -diglucose . . .«, a. a. O., S. 1279.

¹³⁾ vergl. auch J. W. Walker, Soc. 83, 472 [1903].

¹⁴⁾ W. R. Dunstan und T. A. Henry, Brit. Ass. Report, York [1906]. Nach E. Fischers Ansicht (B. 28, 1508 [1895] und B. 50, 1047 [1917] und zwar Anm. 4 auf S. 1051) ist dagegen »das Amygdalin ein Derivat der Maltose oder einer ganz ähnlich konstruierten Diglucose«.

Das übliche Verfahren, α - und β -Glucoside nach ihrem Verhalten gegen Hefe-Auszüge und gegen Emulsin zu unterscheiden, hat E. Fischer¹⁵⁾ in seinem Vortrag über die »Bedeutung der Stereochemie für die Physiologie« angegeben: »Zweifellos besteht also in dem Verhalten gegen die beiden Enzyme ein ganz scharfer Unterschied der α - und β -Derivate des Traubenzuckers, so daß wir auf diesem Wege die beiden Arten leicht erkennen können, während chemische Agenzien für diesen Zweck fehlen.«

Das Verhalten der Hefe gegen Amygdalin und einige andere Zuckerarten und Glucoside¹⁶⁾ lehrt, daß die enzymatischen Reagenzien, für deren Einheitlichkeit wir keine Gewähr besitzen, vermöge ihrer Spezifität über die Konfiguration von Zucker-Derivaten nicht immer entscheiden können, und daß eine Definition für α - und β -Glucoside, die auf dieser Grundlage ruht, unsicher ist¹⁷⁾. Darum sollte man als α -Glucoside die halbacetal-artigen Derivate¹⁸⁾ der α -Glucose ($[\alpha]_D = 110^\circ$), als β -Glucoside die der β -Glucose ($[\alpha]_D = 19^\circ$) betrachten und nach dieser Definition auch die Struktur anderer Hexoside beurteilen. Die Entscheidung zwischen α - und β -Form ist durch Untersuchung der Mutarotation des Zuckers, der bei der Hydrolyse gebildet wird, möglich. Zu diesem Zwecke sind die Enzyme, welcher Herkunft sie auch sein mögen, heute unentbehrlich. Für die Konfiguration nur langsam spaltbarer Glucoside sollen aber neben dem Verhalten zu den Enzymen z. B. der Weg der Synthese, das Drehungsvermögen und der Vergleich anderer physikalischer Konstanten entscheidend bleiben. Auf die Betrachtung solcher Beziehungen sind wir bei enzymatisch nicht angreifbaren Stoffen ausschließlich angewiesen.

Beschreibung der Versuche.

Die Bruttogleichung für die vollständige Hydrolyse, die das Amygdalin durch Emulsin erleidet: $C_{20}H_{27}NO_{11} + 2H_2O = 2C_6H_{12}O_6 + C_6H_5CHO + HCN$, läßt prinzipiell drei Möglichkeiten für die Mutarotation der dabei auftretenden Dextrose zu: 1. Beide Traubenzucker-Moleküle werden in der hochdrehenden α -Form freigelegt: starke Drehungsabnahme, entsprechend dem Sinken der spez. Drehung von 110° auf 52.5° ; 2. es entsteht 1 Mol. α - und 1 Mol. β -Glucose: Drehungsabnahme, bedingt durch Rückgang des $[\alpha]_D$ -Wertes von $\frac{110 + 19}{2} = 64.5^\circ$ auf 52.5° ; 3. es werden zwei β -Glucose-Reste in Freiheit gesetzt: Drehungszunahme ($19^\circ \rightarrow 52.5^\circ$).

Die Reaktion verläuft jedoch stufenweise, und zwar derart, daß die Entbindung des Traubenzuckers derjenigen der Cyanwasserstoffsäure voraus-eilt¹⁹⁾. Für die unter 2 diskutierte Möglichkeit, die bei der Spaltung eines Mandelnitril- β -maltosids zutreffen würde, ergibt sich daraus, daß die dort berechnete Drehungsabnahme in Wirklichkeit noch etwas größer sein müßte. Einer besonderen Entkräftung bedarf der Einwand, daß die Enzymwirkung z. B. durch Anwendung von 1.2 g Sublimat auf 1 g Emulsin nicht

¹⁵⁾ H. 26, 60 [1898] und zwar S. 66.

¹⁶⁾ Melibiose, Linamarin, Glucosido-galaktose usw.

¹⁷⁾ siehe auch H. v. Euler, Chemie d. Enzyme, 2. Aufl., II, 1. Abschn., 145 [1922].

¹⁸⁾ vergl. hierzu E. Fischer, B. 46, 3253 [1913] und zwar S. 3281.

¹⁹⁾ S. J. M. Auld, P. Ch. S. 23, 72 [1907]; Soc. 93, 1251 und 1276 [1908]; P. Ch. S. 24, 97 und 181 [1908].

sofort völlig unterbrochen werden kann²⁰⁾. Es ist auch zu berücksichtigen, daß die nachträglich beobachteten Drehungszunahmen in sekundären, nicht enzymatischen Reaktionen, die sich z. B. auf den gleichfalls optisch-aktiven Mandelsäurenitril-Rest beziehen, ihre Ursache haben könnten.

Diese Einwände werden durch das Ergebnis von Kontrollversuchen als nicht stichhaltig erwiesen: 1. Die Drehungszunahme ist nach 2—3 Stdn. beendet. Die Enddrehung entspricht einer Spaltung von z. B. 50% des vorhandenen Glucosids. Das Enzym wirkt also nicht weiter. 2. Die Drehung, die sich auf sofortigen Zusatz von Sodalösung nach einiger Zeit einstellt, wird von der Lösung, in der sich die Mutarotation bereits vollzogen hat, nach Zusatz von Alkali gleichfalls erreicht; 3. die Einstellung der endgültigen Drehung läßt sich durch Erhitzen der schwach sauren Lösung in wenigen Minuten erzielen. Das bei Zimmertemperatur langsam erreichte Gleichgewicht wird durch Erhitzen nicht geändert; 4. während der Drehungsänderung bleibt das Reduktionsvermögen der Flüssigkeit konstant; 5. wie die Sublimatfällung vermag auch die Behandlung mit adsorptionstüchtiger Tonerde dem Reaktionsgemisch das wirksame Enzym zu entziehen; 6. die Acidität der zentrifugierten bzw. filtrierten Lösungen ($p_H \leq 3.0$) schließt die Möglichkeit weiterer Enzymwirkung aus, ohne daß sich unter diesen Bedingungen die Säure-Hydrolyse des Glucosids und der Reaktions-Zwischenprodukte bemerkbar macht²¹⁾.

1. Beispiel. Das Experiment von S. J. M. Auld: 2.000 g Amygdalin (E. Merck, 3 H₂O enthaltend; $[\alpha]_D^{17} = -37.25^\circ$, im 4 dm-Rohr für 4-proz. Lösung bestimmt) wurden in einem 50-ccm-Meßkolben in etwa 20 ccm Wasser gelöst und zur Einstellung der nach R. Willstätter und W. Csányi²²⁾ für die Amygdalin-Spaltung optimalen Wasserstoff-ionen-Konzentration ($1.10 \cdot 10^{-6}$)²³⁾ mit 2 ccm $m/3$ -Phosphatmischung versetzt. Zuletzt wurden 0.5 g Emulsin (E. Merck), die in 5 ccm Wasser gelöst bzw. suspendiert waren, hinzugefügt. Die bei 30° unter lebhafter Blausäure-Entwicklung verlaufende Reaktion wurde nach 10 Min. durch Auffüllen des Kolbens mit 1 ccm 2-n. Essigsäure + 0.57 g Tonerde B²⁴⁾ und sofortiges Abzentrifugieren des Adsorbates unterbrochen. 20 Min. nach Versuchsbeginn wurde im 2-dm-Rohr eine Drehung von $0.00^\circ \pm 0.01^\circ$ beobachtet. Auf Zusatz von 1 Tropfen konz. Ammoniak stieg sie schnell auf $+0.20^\circ$, um in weiteren 20 Min. bis auf -0.06° zurückzugehen²⁵⁾. Im Parallelversuch ohne Alkali nahm die Drehung dagegen um 0.43° zu. Der Endwert entspricht einer Hydrolyse von etwa 65%; er zeigt, daß kein wirksames Enzym mehr vorhanden war.

2. Beispiel: 2 g Amygdalin + 4 ccm Phosphatpuffer + 1 g Emulsin (Merck) wurden nach 10 Min. langer Einwirkung bei Zimmertemperatur (19°) durch 20 ccm

²⁰⁾ Über den zeitlichen Verlauf der Reaktion zwischen Saccharase und Metallsalz in zuckerfreier Lösung vergl. H. v. Euler und O. Svanberg, *Ferm.-Forsch.* 3, 330 [1920] und zwar S. 357. Eine Vergiftungsgrenze für dieses Enzym wurde von H. v. Euler und K. Myrbäck, *Sv. Vet. Akad., Arkiv f. Kemi* 8 [1922] festgestellt.

²¹⁾ R. Willstätter und W. Csányi, *H.* 117, 172 [1921] und zwar S. 177.

²²⁾ a. a. O. und zwar S. 181f.

²³⁾ vergl. dagegen G. Bertrand und A. Compton, *C. r.* 153, 360 [1911] und *Bl.* [4] 29, 229 [1921].

²⁴⁾ R. Willstätter und H. Kraut, *B.* 56, 149 [1923] und zwar S. 150.

²⁵⁾ Eine 1,134-proz. Lösung von Amygdalin dreht bei 19° im 2-dm-Rohr -0.805° . Dieser Wert ist nach 14 Stdn. ungeändert (-0.81°). Nach Zugabe von 1 Tropfen Ammoniak sinkt die Drehung in 10 Min. auf -0.95° , in 50 Min. auf -1.05° . Sodalösung bewirkt die gleiche Erscheinung. Bei Prunasin ist der Effekt noch größer. Der Übergang in Prulaurasin ist begleitet von einer Verdopplung der Linksdrehung.

6-proz. Sublimat-Lösung auf 50 ccm ergänzt. Durch Filtration unter Zusatz von 0.1 g spanischer Klärerde ließ sich die in der Zentrifuge von der Quecksilberfällung befreite Lösung vollends klären. Die erste polarimetrische Bestimmung konnte 15 Min. nach der Ausfällung bzw. Vergiftung des Enzyms (25 Min. nach Versuchsbeginn) vorgenommen werden.

Zeit (Min.)	Drehung (°) im 2-dm-Rohr.
0	[−0.65]
25	−0.435
40	−0.325
60	−0.23
100	−0.19
160	−0.185

Nach 24 Min. wurde eine Probe von 10 ccm mit dem gleichen Volumen n_{1-} -Sodalösung verdünnt und von der entstandenen, glucosidhaltigen Fällung abfiltriert. Das nach 2 Stdn. im 2-dm-Rohr bestimmte Drehungsvermögen betrug -0.22° . Eine erst nach 160 Min. gleichartig behandelte Probe ergab übereinstimmend -0.21° .

3. Beispiel: Der Ansatz war derselbe wie im 2. Beispiel. Nur wurde die Amygdalin-Lösung auf 30° vorgewärmt, blieb aber nach Zusatz des Emulsins bei 16° stehen.

Zeit (Min.)	Drehung (°) im 2-dm-Rohr.
0	[−0.53]
20	−0.40
35	−0.31
48	−0.225
60	−0.16
75	−0.07
120	+0.02
180	+0.055
270	+0.06

Das Gesamt-Reduktionsvermögen wurde in Proben von 2 ccm nach Willstätter und Schudel²⁶⁾ bestimmt:

- a) nach 30 Min.: gef. 4.97 ccm n_{10} -Jodlösung,
- b) nach 240 Min.: gef. 5.06 ccm.

Unter den gewählten Versuchsbedingungen beträgt das Drehungsvermögen des angewandten Emulsin-Präparates -0.49° im 2-dm-Rohr. Eine merkliche Menge des Amygdalins und seiner Spaltprodukte wird von der Quecksilberfällung nicht mitgerissen²⁷⁾. Unter der Annahme, daß Zucker, Blausäure und Bittermandelöl gleichzeitig und in äquivalenten Mengen auftreten, läßt sich aus der Anfangsdrehung (-3.47°) und der Enddrehung ($+2.46^{\circ}$) der in 10 Min. erreichte Umsatz zu 59.5% berechnen. Die zwischen 30 und 240 Min. beobachtete Drehungszunahme von 0.40° entspricht einer scheinbaren Zunahme des Spaltungsgrades um 6.7%, während das Reduktionsvermögen nur um 1.1% zugenommen hat.

4. Beispiel: 2 g Amygdalin + 0.45 g eines aus bitteren Mandeln gewonnenen Emulsin-Präparates²⁸⁾ + 4 ccm Phosphat wurden bei 30° auf 50 ccm gebracht und nach 10 Min. mit 20 ccm 6-proz. Sublimatlösung gestoppt.

²⁶⁾ R. Willstätter und G. Schudel, B. 51, 780 [1918].

²⁷⁾ Bei Anwendung von nur 0.2 g Mercurichlorid verläuft nämlich die Spaltung weiter. Die Drehung erreicht in 16 Stdn. $+2.43^{\circ}$ (ber. $+2.46^{\circ}$ für 2.815-proz. Glucoselösung im 2-dm-Rohr nach Berücksichtigung von -0.49° für die Eigendrehung des Emulsins).

²⁸⁾ Präparat Nr. 8 der Untersuchung von R. Willstätter und G. Oppenheimer, H. 121, 183 [1922] und zwar S. 193.

Zeit (Min.)	Drehung (°) im 2-dm-Rohr.
0	[+ 1.20]
20	+ 1.38
28	+ 1.43
40	+ 1.55
58	+ 1.67
70	+ 1.74
100	+ 1.85
160	+ 1.93

30 Min. nach Beginn der Reaktion wurden 10 ccm in einem 50-ccm-Kölbchen für 15 Min. ins siedende Wasserbad getaucht. Die nach dem Erkalten zur Marke aufgefüllte Lösung zeigte im 4-dm-Rohr $\alpha_D = +0.78^\circ$. Daraus ließ sich die Enddrehung für den Hauptversuch zu $+1.95^\circ$ berechnen. Mit der bei Zimmertemperatur (17°) gestandenen Lösung wurde der Kontrollversuch nach 140 Min. wiederholt und abermals $\alpha_D = +0.78^\circ$ gefunden.

5. Beispiel. Hydrolyse von Iso-amygdalin: Zur direkten Beobachtung der Mutarotation, welche der aus Amygdalin in Freiheit gesetzte Zucker nach Zugabe von Ammoniak zeigt, ist es notwendig, die gleichzeitig erfolgende Racemisierung des Mandelsäure-Restes experimentell auszuschalten. Dies gelingt, wenn man das Glucosid vor der Einwirkung des Enzyms mit Alkalien behandelt. Entgegen einer von J. W. Walker und V. K. Kriehle²⁹⁾ geäußerten Vermutung wird die Bindungsart der Zuckerreste hierdurch nicht beeinflußt. Das in bezug auf die Mandelsäurenitrilgruppe racemische Glucosid, das H. D. Dakin³²⁾ Iso-amygdalin benannt hat, entbindet unter der Einwirkung von Emulsin gleichfalls 2 Mol. β -Glucose.

4 g Amygdalin wurden mit 30 ccm Wasser $+1$ ccm N_{10} -Natronlauge 30 Min. auf etwa 80° erhitzt und nach dem Erkalten unter Zusatz von 1 ccm N_{10} -Salzsäure auf 50 ccm gebracht. Aus der im 1-dm-Rohr beobachteten Drehung von -3.92° berechnet sich für ein Trihydrat des r -Amygdalins $[\alpha]_D^{18} = -49.3^\circ$. 25 ccm dieser Lösung wurden mit 2 ccm $m/3$ -Phosphat ($p_H = 6.0$) und 50 mg Emulsin (14 Monate altes Präparat aus bitteren Mandeln; Zeitwert für Amygdalin in frischem Zustand 36.5^{31}) versetzt und auf 50 ccm verdünnt. Ein Teil der vollkommen klaren Lösung zeigte nach 25 Min. im 2-dm-Rohr $\alpha_D = -1.20^\circ$, nach Zusatz von 1 Tropfen konz. Ammoniak -1.05° . Nach 10 Min. war die Drehung bei -0.98° konstant geworden.

45 Min. nach Versuchsbeginn drehte der übrige Teil des Reaktionsgemisches im 4-dm-Rohr die Ebene des polarisierten Lichtes 0.30° nach links. 0.5 ccm Ammoniak bewirkten sofort 0.04° Rechtsdrehung. Nach weiteren 15 Min. war die Enddrehung ($+0.12^\circ$) erreicht.

Meinem verehrten Lehrer, Hrn. Geheimrat Prof. R. Willstätter, danke ich für das fördernde Interesse, das er diesen Versuchen zuteil werden ließ.

²⁹⁾ Soc. 95, 1437 [1909].

³⁰⁾ Soc. 85, 1512 [1904].

³¹⁾ Präparat Nr. 5 der Untersuchung von R. Willstätter und G. Oppenheimer, H. 121, 183 [1922] und zwar S. 193.