

**168. Hans Pringsheim und Arnold Steingroever:
Zur Kenntnis der Amylobiose. (Beiträge zur Chemie der Stärke, XVII¹⁾.)**

[Aus d. Chem. Institut d. Universität Berlin.]

(Eingegangen am 29. März 1926.)

Die Amylobiose geht aus den Polyamylosen²⁾ und aus der Inhalts-Substanz der Stärke³⁾, der Amylose, durch die Einwirkung kalter konz. Salzsäure hervor. Schon früher wurde festgestellt²⁾, daß dieses Disaccharid nicht nur aus den Vertretern der α -Reihe der Polyamylosen entsteht, sondern auch aus der β -Hexaamylose; bei unseren neuen und umfangreicheren Versuchen zur Gewinnung der Amylobiose aus α -Tetraamylose machten wir die Beobachtung, daß intermediär eine teilweise Umlagerung in β -Polyamylosen erfolgt. Hierbei ist noch unentschieden, ob diese Umlagerung eine Zwischenreaktion ist, oder ob ein Teil der α -Tetraamylose direkt zur Amylobiose aufgespalten wird. Jedenfalls konnte bei vorzeitigem Abbruch der Salzsäure-Einwirkung ein Körper von der Schwerlöslichkeit, Krystallform, Jodreaktion und Drehung der β -Hexaamylose in einer Ausbeute bis zu 25% des Ausgangsmaterials gewonnen werden. Die Umwandlung der Polyamylosen in die Amylobiose ohne Zurücklassung ungespaltener Polyamylosen läßt sich nach der im experimentellen Teil angegebenen Vorschrift immer durchführen.

Für die Amylobiose haben wir, gestützt auf ihre Beziehung zur Maltose, die Konstitution einer 4-Glucosido(1,4)-glucose(1,6) vorgeschlagen³⁾. Der Versuch, diese Formel auf dem üblichen Wege der Methylierung zu beweisen, ist uns nur in beschränktem Maße geglückt. Die Amylobiose verhält sich bei der Methylierung recht eigentümlich: Die Einführung von 6 Methylgruppen in die 8 Hydroxyle des Disaccharids gelingt mit Dimethylsulfat und Natronlauge und Nachmethylierung mit Jodmethyl und Silberoxyd in normaler Weise. Eine weitere Steigerung des Methoxylgehaltes war durch die Wiederholung dieser beiden Methylierungsmethoden auf keinem Wege zu erreichen. Wir haben deshalb daran gedacht, den Umweg über das acetylierte Methyloprodukt zu beschreiten, der sich bei der Cellulose⁴⁾ und Cellobiose⁵⁾ gut bewährt hat. Als Vorversuch haben wir die acetylierte Methylo- α -tetraamylose (mit einem Gehalt von 28% OCH_3)⁶⁾ mit 50-proz. Natronlauge methyliert. Hierbei gelangten wir bis zur Dimethylstufe ($\text{OCH}_3 = 32\%$), was vorher nur durch die Anwendung der Purdie-Irvineschen Methode erreichbar war. Die Besetzung des dritten Hydroxyls ist uns auf diese Weise nicht gelungen. Ebensovienig sind wir bei der Amylobiose auf diesem Umwege über die Hexamethylstufe hinausgekommen. Besonders merkwürdig war, daß sich nur eines der beiden freien Hydroxyle dieses Methylo-zuckers beim Acetylieren in Pyridin durch den Acetylrest ersetzen läßt.

Nach der Spaltung der Hexamethyl-amylobiose mit 5-proz. Schwefelsäure bzw. 1-proz. methylalkoholischer Salzsäure ließ sich die normale

¹⁾ XVI. Mitteilung voranstehend.

²⁾ H. Pringsheim und J. Leibowitz, B. **57**, 884 [1924].

³⁾ H. Pringsheim, B. **57**, 1581 [1924].

⁴⁾ E. Heuser und N. Hiemer, Cellulose-Chemie **6**, 125 [1925].

⁵⁾ K. Heß und G. Salzmann, A. **445**, 111 [1925].

⁶⁾ H. Pringsheim und W. Persch, B. **54**, 3166 [1921], **55**, 1425 [1922].

Tetramethyl-glucose als Anilid bzw. Methylglucosid nachweisen, wodurch eine normale Struktur des Glucosido-Teils entsprechend der von uns vorgeschlagenen Formel bewiesen ist. Der Glucose-Teil unseres Disaccharids wurde bei der Hydrolyse und Glucosidifizierung durch methylalkoholische Salzsäure als ein Dimethyl-zucker, d. h. als ein Monomethyl-methylglucosid, isoliert, welches große Ähnlichkeit mit dem von Irvine⁷⁾ aus der Diaceton-glucose dargestellten 3-Methyl-methylglucosid⁸⁾ zeigte. Aus diesem Befunde können wir höchstens den Schluß ziehen, daß das dritte Hydroxyl weder an der Verknüpfung der beiden Zucker-Reste, noch am Lactol-Ring⁹⁾ beteiligt ist. Das absonderliche Verhalten des Glucose-Teiles unseres Disaccharids, dessen γ -Struktur wir des öfteren betont haben, tritt besonders scharf durch die Tatsache hervor, daß unsere Hexamethyl-amylobiose, die infolge der Glucosidifizierung Fehlingsche Lösung nicht mehr reduziert, die Farbe verdünnter alkalischer Permanganat-Lösung in der Kälte momentan umschlagen läßt, was von Irvine¹¹⁾ als Charakteristikum des γ -Zustandes angesehen wird¹²⁾. Die Tatsache der beschränkten Methylierbarkeit erinnert an das Verhalten anderer, von uns als γ -Zucker erkannter Kohlenhydrate, wie der Stärke, des Glykogens, der Hexosane, der Polyamylosen und einer von uns neuerdings isolierten, in wäßriger Lösung existenzfähigen γ -Glucose¹³⁾. Alle die genannten Polysaccharide ließen sich im γ -Glucose-Teil bis zur Dimethylstufe methylieren, so auch das Dihexosan¹⁴⁾, während merkwürdigerweise die aus ihm durch Ringsprengung hervorgegangene Amylobiose in demselben γ -Glucose-Teil¹⁵⁾ außer der glucosidischen nur noch eine Methylgruppe aufnimmt. Die auffällige Erscheinung, daß auch bei der Acetylierung ein Hydroxyl frei bleibt, findet ihre Analogie in der Unmöglichkeit der Vollacylierung der Monoaceton-glucose¹⁶⁾, deren Ähnlichkeit mit γ -Glucose-Derivaten Irvine¹⁷⁾ hervorgehoben hat.

Die Konstitution des γ -Glucose-Radikals, welches wir nicht zum γ -Methylglucosid von Emil Fischer in Beziehung gebracht haben^{17a)}, soll von uns mit Rücksicht auf die neu aufgefundene stabile γ -Glucose¹³⁾ nochmals erwogen werden.

Im Anschluß an die beschriebenen Operationen wurde auch die Methylierung des Trihexosans versucht. Ebenso wie bei den Polyamylosen¹⁸⁾ und dem Dihexosan¹⁴⁾ ließ sich die Dimethylstufe glatt in einem Arbeitsgang erreichen. Eine Steigerung des

7) J. C. Irvine und J. P. Scott, Soc. **103**, 572 [1913].

8) P. A. Levene und G. M. Meyer, J. Biol. Ch. **54**, 805 [1922], **60**, 173 [1924].

9) B. Helferich und F. A. Fries, B. **58**, 1246 [1925].

10) H. Pringsheim, Naturwiss. **13**, 1085 [1925].

11) J. C. Irvine, A. W. Fyfe und Th. P. Hogg, Soc. **107**, 524 [1915]; J. C. Irvine, Soc. **123**, 915 [1923].

12) Im Gegensatz zu der Anwendung dieser Reaktion auf freie Zucker: R. Kuhn und Th. Wagner-Jauregg, B. **58**, 1441 [1925].

13) H. Pringsheim, Naturw. **14**, 198 [1926]; H. Pringsheim und S. Kolodny, B. **59**, im Druck.

14) K. Sjöberg, B. **57**, 1251 [1924].

15) H. Pringsheim und J. Leibowitz, B. **58**, 2808 [1925].

16) H. Ohle und E. Dickhäuser, B. **58**, 2593 [1925].

17) J. C. Irvine und J. Patterson, Soc. **121**, 2146 [1922].

17a) Im Gegensatz zu der Angabe von H. H. Schlubach und H. v. Bomhard, B. **59**, 845 [1926].

18) H. Pringsheim und K. Goldstein, B. **56**, 1520 [1923].

Methoxylgehaltes über diesen Wert hinaus durch mehrfache Wiederholung dieser Operation erfolgt nur sehr langsam und allmählich; offenbar verläuft die Reaktion in der auch an der β -Hexaamylose beobachteten Weise¹⁹⁾.

Beschreibung der Versuche.

Darstellung der Amylobiose.

Wir benutzten im wesentlichen das von Pringsheim und Leibowitz²⁾ ursprünglich angegebene Verfahren, mit der Maßgabe, daß wir die α -Tetraamylose sehr lange der Einwirkung der konz. Salzsäure überließen. Das Reaktionsprodukt stand, nachdem die Tetraamylose in Salzsäure in Lösung gebracht und während etwa 2–3 Tagen zur Trockne eingedunstet war, noch weitere etwa 3–4 Tage im Vakuum-Exsiccator über gepulvertem Ätzkali ungeachtet einer dabei eintretenden Schwarzfärbung, bis tatsächlich jede, für die Polyamylosen charakteristische Reaktion mit Jod ausblieb. Die Aufarbeitung erfolgte in der früher angegebenen Weise. Nach einmaligem Umfällen des so erhaltenen Produktes aus konz. wäßriger Lösung mittels absol. Alkohols erhielten wir ein rein weißes, nicht hygroskopisches Pulver, das keine Glucosazon-Reaktion mehr gab und in allen Fällen die konstante spezifische Drehung $+110^{\circ}$ zeigte. Die Ausbeute betrug 60% der angewandten Substanz.

Spezifische Drehung in Wasser:

$$[\alpha]_D^{20} = (+2.25 \times 5) / (1 \times 0.1046) = +110.1^{\circ}$$

$$,, = (+3.27 \times 5) / (1 \times 0.1482) = +110.4^{\circ}$$

Andere Werte waren: $+110.1^{\circ}$, 110.4° , 110.6° .

β -Hexaamylose aus α -Tetraamylose.

Unterbricht man bei der Darstellung der Amylobiose aus α -Tetraamylose die Reaktion vorzeitig, etwa dann, wenn die Lösung der Tetraamylose in konz. Salzsäure eben eingedunstet ist, so erhält man stark mit Polyamylosen verunreinigte Präparate von naturgemäß höherer spezifischer Drehung. Die Polyamylosen lassen sich aus ihnen auch durch Schütteln mit Trichloräthylen, welches nach der Beobachtung des Hrn. Dr. Lange in Elberfeld dazu am geeignetsten ist, nicht quantitativ entfernen. Brachen wir die Reaktion in dem angegebenen Moment ab, so erhielten wir mehrfach neben noch vorhandener α -Tetraamylose, angezeigt durch die grüne Jodfällung, β -Hexaamylose, die sich aus der konz. wäßrigen Lösung in ihrer charakteristischen Krystallform ausschied, eine braune Jodfällung gab und die spezifische Drehung $+157.5^{\circ}$ zeigte. Die Ausbeuten waren schwankend, betrug aber bis zu 25% der angewandten Tetraamylose.

Methylierung der Amylobiose mit Dimethylsulfat und Natronlauge.

Die Methylierung wurde in engster Anlehnung an die von Haworth und Leitch²⁰⁾ für die Methylierung der Maltose angegebene Vorschrift durchgeführt. Ausgehend von 6 g Amylobiose wurde die Vormethylierung über Nacht mit den entsprechenden Reagensmengen vorgenommen; die Hauptmethylierung erfolgte am anderen Tage während $1\frac{1}{2}$ Stdn. bei 65° . Das überschüssige

¹⁹⁾ J. C. Irvine, H. Pringsheim und Macdonald, Soc. **125**, 942 [1924].

²⁰⁾ Soc. **115**, 809 [1919].

Dimethylsulfat wurde durch $\frac{1}{2}$ -stdg. Erhitzen auf 100° zerstört, die Lösung mit Chloroform ausgeschüttelt und schließlich der nach dem Waschen, Trocknen und Abdestillieren des Chloroforms im Vakuum verbleibende sirupöse Rückstand mit Petroläther fest gemacht. Die auf dem Wasserbad eingeengte wäßrige Mutterlauge gab nach erneuter Methylierung mit den gleichen Reagensmengen und in derselben Reaktionszeit nochmals beträchtliche Mengen Methylokörper an das Chloroform ab, so daß die Gesamtausbeute ca. 80% der angewandten Amylobiose betrug. Der Methoxylgehalt des so gewonnenen, gelblich-weißen Pulvers entsprach etwa dem der Tetramethylstufe.

0.1232 g Sbst.: 13.30 ccm n_{10}° -AgNO₃ (nach Kirpal-Bühn).

C₁₂H₁₈O₇(OCH₃)₄ (298.24). Ber. OCH₃ 31.2. Gef. OCH₃ 33.5.

Nachmethylierung mit Jodmethyl und Silberoxyd²¹⁾.

5 g obiger Methylo-amylobiose (1 Mol.) wurden mit 22 g Jodmethyl (12 Mol.) — in denen sie sich gerade lösten — und 15.5 g Silberoxyd (6 Mol.) ca. 16 Stdn. am Rückflußkühler zum Sieden erhitzt. Nach dem Abdampfen des Jodmethyls, mehrmaligem Ausziehen des Silbergemenges mit siedendem Chloroform, Abdestillieren des Chloroforms im Vakuum und Verreiben des zurückbleibenden Sirups mit Petroläther erhielten wir ein gelblich-weißes Pulver, das im Hochvakuum bei 0.04 mm Druck bis 350° Außenbad-Temperatur nicht überging. Es reagierte mit Fehling'scher Lösung nicht, gab aber einen Silberspiegel und reduzierte verdünnte alkalische Permanganat-Lösung in der Kälte momentan. Es war löslich in kaltem Wasser, Chloroform, Methyl- und Äthylalkohol und in Benzol, schwerlöslich in Äther, unlöslich in heißem Wasser und Petroläther. Die Ausbeute betrug 66% der angewandten Methylo-amylobiose, d. i. 55% der ursprünglich angewandten Amylobiose.

Wie man aus nachstehender Tabelle ersieht, wächst durch wiederholte Anwendung dieser Methylierungs-Operation auf die erhaltenen Körper deren Methoxylgehalt in unregelmäßiger Weise — wie häufig bei derartig schwer methylierbaren Zuckern.

Anzahl der Irvine-Methylierungen	Methylokörper verschiedener Ansätze % OCH ₃					
1				39.99	41.7	41.0
2	40.4	40.3	43.0	41.3		
3	41.9	41.1		43.0		

C₁₂H₁₈O₅(OCH₃)₆ (426.27). Ber. OCH₃ 43.7.

Wir sind jedoch annähernd zum theoretischen Wert für das Hexamethyl-derivat gelangt und verdanken die nachstehende Bestimmung der von Heß und Weltzien²²⁾ modifizierten Methoxyl-Bestimmungsmethode.

0.1104, 0.0978 g Sbst.: 0.2079, 0.1848 g CO₂, 0.0765, 0.0681 g H₂O. — 0.0889, 0.0569 g Sbst.: 0.2869, 0.1866 g AgJ.

C₁₂H₁₈O₅(OCH₃)₆ (426.27). Ber. C 50.70, H 7.98, OCH₃ 43.7.

Gef. „ 51.37, 51.55, „ 7.75, 7.79, „ 42.6, 43.3.

²¹⁾ vergl. Purdie und Irvine, Soc. 83, 1021 [1903], 85, 1049 [1904].

²²⁾ A. 442, 46, und zwar S. 48 [1925]. — Wir sagen Hrn. Prof. K. Heß für die Ausführung dieser Bestimmungen auch an dieser Stelle unseren herzlichsten Dank.

Acetylierung der Hexamethyl-amylobiose.

Bei der Acetylierung in Pyridin erhielten wir ein wasserlösliches Produkt, welches nach dem Ausschütteln mit Chloroform in einer Ausbeute von 60% des angewandten Materials gewonnen wurde und nach der Acetyl-Bestimmung nur einen Essigsäure-Rest aufgenommen hatte. Da von einer nicht völlig methylierten Amylobiose ausgegangen war ($\text{OCH}_3 = 41.0\%$), fiel auch der Methoxylwert des Acetats zu niedrig aus.

0.1312 g Sbst.: 0.2473 g CO_2 , 0.0902 g H_2O . — 0.1682, 0.0928 g Sbst.: 19.65, 11.30 ccm n_{10}^2 - AgNO_3 . — 0.0644, 0.0800 g Sbst.: 0.30, 0.35 ccm n_{10}^2 - NaOH .
 $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{O}_4(\text{OCH}_3)_6(\text{C}_2\text{H}_5\text{O}_2)$ (468.29).
 Ber. C 51.28, H 7.69, (OCH_3) 39.8, $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O}_2)$ 12.6.
 Gef. „ 51.42, „ 7.69, „ 36.2, 37.8, „ 13.7, 12.9.

Methylierung der Acetyl-hexamethyl-amylobiose.

Bei der Methylierung wurde genau nach dem von Heuser und Hiemer⁴⁾ für die Methylierung der Dimethyl-acetyl-cellulose angegebenen Verfahren gearbeitet. Wir erhielten schließlich wieder ein weißes Pulver in einer Ausbeute von 60% der angewandten Substanz.

0.1248 g Sbst.: 0.2355 g CO_2 , 0.0870 g H_2O . — 0.0982 g Sbst.: 13.9 ccm n_{10}^2 - AgNO_3 .
 $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_5(\text{OCH}_3)_6$ (426.27). Ber. C 50.70, H 7.98, (OCH_3) 43.7.
 Gef. „ 51.29, „ 7.80, „ 43.9.

Der Methoxylgehalt des Produkts war also jedenfalls nicht über die 6-Methylostufe hinausgestiegen.

Spaltung der Hexamethyl-amylobiose mit 5-proz. Schwefelsäure.

4 g des Körpers lösten wir in 300 ccm kalter 5-proz. Schwefelsäure und ließen über Nacht im Brutraum stehen. Dann wurde einige Stunden bis zum Verschwinden der eingetretenen Trübung auf dem Wasserbade erwärmt und schließlich 2 Stdn. am Rückflußkühler gekocht, wobei starke Gelbfärbung eintrat. Die Schwefelsäure wurde hierauf mit Bariumhydroxyd quantitativ entfernt und die Lösung im Vakuum eingedampft. Hierbei krystallisierte meistens die Tetramethyl-glucose von selbst aus. Sie wurde jedoch nicht isoliert, sondern der sirupöse Rückstand mit 4 g absol. Alkohol und 4 g Anilin 4 Stdn. am Rückflußkühler gekocht. Nach dem Abdestillieren der flüssigen Bestandteile im Vakuum und Abtreiben des Anilins mit Wasserdampf nahmen wir den tief braun gefärbten Rückstand mit Äther auf. Der äther-lösliche Bestandteil krystallisierte in schönen weißen Nadeln aus, die aus Alkohol umkrystallisiert wurden. Ausbeute ca. 1.5 g reines Produkt.

Tetramethyl-glucose-anilid. Schmp. 133—134⁰ (unkorr.).

$[\alpha]_D = (+2.78^0 \times 0.0272)/(0.5 \times 0.7920 \times 0.9048) = +233.5^0$ (Aceton).
 Gef. von J. C. Irvine und A. M. Moodie²³⁾: Schmp. 135⁰; $[\alpha]_D$ (Aceton) = 229.5⁰.
 0.1733 g Sbst.: 4.7 ccm N (21⁰, 763 mm).
 $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{O}_5\text{N}$ (311.20). Ber. N 4.50. Gef. N 4.60.

Spaltung der Hexamethyl-amylobiose mit 0.8-proz. methylalkoholischer Salzsäure.

2 g Hexamethyl-amylobiose wurden in 60 ccm trockner 0.8-proz. methylalkoholischer Salzsäure gelöst und im Bombenrohr 6 Stdn. auf 100⁰ erhitzt.

²³⁾ Soc. 93, 103 [1908].

Die Drehung der Lösung war dann konstant. Die Lösung wurde mit Bariumhydroxyd versetzt, abfiltriert und das Filtrat mit Tierkohle entfärbt. Nach dem Abdestillieren des Methylalkohols hinterblieb ein Sirup, aus dem im Hochvakuum bei 0.3 mm und 100–120° das Gemisch der beiden isomeren Methylglucoside der Tetramethylglucose abdestilliert wurde.

Methoxyl-Bestimmung des Destillats. 0.0878 g Sbst.: 17.6 ccm n_{10} -AgNO₃.
 $C_8H_7O(OCH_3)_5$ (250.18). Ber. (OCH₃) 62.0. Gef. (OCH₃) 62.2.

Der zurückbleibende, stark dunkel gefärbte Sirup wurde mit Äther gewaschen. Er war außerordentlich hygroskopisch, wurde erst nach mehrstündigem Trocknen in der Pistole über P₂O₅ bei 80° gewichtskonstant und ließ sich nur durch Einwägen in Stanniol zur Analyse bringen. Wie das von Irvine und Scott⁷⁾ beschriebene 3-Methyl-methylglucosid zeigte es nur annähernd stimmende Analysenwerte.

0.1304 g Sbst.: 0.2228 g CO₂, 0.0908 g H₂O. — 0.0654 g Sbst.: 5.7 ccm n_{10} -AgNO₃.
 $C_8H_{10}O_4(OCH_3)_2$ (208.13). Ber. C 46.15, H 7.69, (OCH₃) 29.8.
 Gef. „ 46.60, „ 7.81, „ 27.03.

Methylierung des Trihexosans²⁴⁾.

4 g Trihexosan, gelöst in 15 ccm 30-proz. Natronlauge, wurden bei 30–40° unter fortwährendem Rühren mit 24 g Dimethylsulfat und 58 g 30-proz. Natronlauge versetzt; Dauer der Methylierung ca. 4 Stdn. Das ölförmig ausgeschiedene Reaktionsprodukt wurde mit Chloroform extrahiert; der nach dem Verdampfen des Lösungsmittels verbleibende Rückstand erstarrte beim Verreiben mit Petroläther zu einem weißen Pulver. Dieses wurde für die weiteren, in derselben Weise durchgeführten Methylierungen verwandt.

Methoxyl-Bestimmung nach Kirpal-Bühn.

Anzahl der Methylierungen	g Substanz	ccm n_{10} -AgNO ₃	% CH ₃ O
1	0.2420	24.50	31.36
1	0.0938	9.27	30.63
3	0.0992	11.07	34.60

Ber. für $[C_6H_8O_3(OCH_3)_2]_3$: 32.64; ber. für $[C_6H_7O_2(OCH_3)_3]_3$: 45.60.

An der Ausführung dieser Arbeit hat sich Hr. Dr. Leibowitz beteiligt. Ihm, wie der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft sind wir sehr zu Dank verpflichtet.

²⁴⁾ ausgeführt von Hrn. E. Schapiro.