

164. Hans Pringsheim und Max Laßmann: Über Inulin und Glykogen. (Zweite Mitteilung über Inulin.)

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

(Eingegangen am 30. März 1922.)

Die im vorigen Jahre ermittelte Molekulargröße des Inulins¹⁾ stellt die erste verlässliche Bestimmung des Molekulargewichtes eines Polysaccharides dar, das wie die Cellulose, die Stärke, das Glykogen u. a. früher für äußerst hochmolekular gehalten wurde. Das Ergebnis, welches das Inulin als aus neun Fructose-Resten zusammengesetzt erkannte, fällt mit der Entwicklung der Polysaccharid-Chemie zusammen, die in den vorgenannten Naturprodukten nicht mehr langgezogene Ketten aneinandergereihter Zuckerreste, sondern Polymere relativ niedrig molekularer Anhydro-zucker sieht. Die Beziehung zu den schon mit den gewöhnlichen Laboratoriumshilfsmitteln als krystallinisch erkennbaren, in Wasser echte Lösungen gebenden Di-, Tri-, Tetra- usw. -Sacchariden wird so in gewisser Beziehung eine engere. Aus diesen Gründen scheint es kaum angängig, die letztgenannten Körper in eine gesonderte Klasse einzuordnen: wir wollen sie deshalb als Polysaccharide erster Ordnung bezeichnen, während die polymeren Anhydro-zucker von geringem Dispersionsgrad und entsprechend kolloidalen Eigenschaften als Polysaccharide zweiter Ordnung zusammengefaßt werden sollen.

Die Wichtigkeit des von uns ermittelten Befundes zwingt uns, ihn nach Möglichkeit zu sichern; wenn unsere kryoskopischen Bestimmungen am Inulinacetat auch in drei verschiedenen Lösungsmitteln Werte der gleichen Größenordnung ergaben, so schien es doch angezeigt, in unseren Bestrebungen noch weiter zu gehen und zum Vergleich auch die von Barger²⁾ angegebene und neuerdings von Rast³⁾ handlich gemachte Methode zur Molekulargewichts-Bestimmung heranzuziehen. Wir wählten als Lösungsmittel Eisessig und arbeiteten bei einer Verdünnung, die sowohl der Löslichkeit des Inulinacetats entsprach als auch der Gefahr der Assoziation vorbeugte. So kamen wir bei der Vergleichslösung, die wir mit Azobenzol herstellten, auf Konzentrationen von nur $\frac{1}{80}$ - und $\frac{1}{100}$ -normal. Die von uns abgelesenen

¹⁾ H. Pringsheim u. A. Aronowsky, B. 54, 1281 [1921].

²⁾ B. 37, 1754 [1904]; Soc. 85, 286 [1904].

³⁾ B. 54, 1979 [1921].

Ausschläge genügten, um die Molekulargröße des Inulinacetats erneut festzulegen; das Ergebnis entsprach dem früheren Befunde. Dadurch ist gleichzeitig bewiesen, daß die Barger-Rastsche Methode auch für die Bestimmung relativ hoher Molekulargrößen, in unserem Falle handelte es sich ja um ca. 2600, geeignet ist. Bei einer derartigen Molekulargröße ist im allgemeinen die Grenze für eine exakte Bestimmbarkeit auf kryoskopischem Wege erreicht¹⁾; leider scheint, wie wir sehen werden, bei der auf isothermer Destillation beruhenden Methode von Barger eine Bestimmung von Molekulargrößen über 3000 praktisch ebenfalls nicht mehr durchführbar.

Der am Inulin gezeitigte Erfolg ermutigte uns, die Methode auch auf das Glykogen und die lösliche Stärke zu übertragen, welche sich im Gegensatz zur Cellulose und zur Naturstärke leicht mit Pyridin und Essigsäure-anhydrid acetylieren lassen. Schützenberger²⁾ gewann durch Erhitzen von Glykogen mit Essigsäure-anhydrid auf 155° das Acetat eines stark abgehauten Glykogens; auch der Acetylierungsversuch von v. Knaffl-Lenz³⁾ mit Essigsäure-anhydrid, das mit Chlorwasserstoff gesättigt war, führte zu einem Glykogen-Dextrin-Derivat. Wir erhielten zum ersten Male Acetylierungsprodukte, aus denen sich Glykogen und lösliche Stärke ohne jede Spur von reduzierenden Beimengungen zurückgewinnen ließen; sie gaben die entsprechenden Jodfärbungen wie die Ausgangsstoffe und wurden wie diese durch Diastase fermentativ aufgespalten.

Der auffallende Unterschied in der Jodfärbung von Glykogen und Stärke ist noch ungeklärt. Karrer⁴⁾ hat diesbezüglich soeben eingehende Erwägungen vorgetragen: er kommt zu der Auffassung, daß die Differenz in der Jodfärbung nicht auf eine Verschiedenheit des Polymerisationsgrades zurückzuführen sei, welche das Glykogen den Erythro-dextrinen an die Seite stellen würde, die sich mit Jod ebenfalls braunrot färbten; wahrscheinlicher sei die Abweichung von der Blaufärbung der Jodstärke auf gewisse Beimengungen zurückzuführen, da nachweislich dem phosphorhaltigen Amylopektin keine Blaufärbung, sondern eine violettrote und nicht, wie Karrer schreibt⁴⁾, eine weinrote Farbe zukommt⁵⁾. Unsere desacety-

¹⁾ vergl. E. Fischer u. K. Freudenberg, B. 46, 1136 [1913].

²⁾ A. 160, 74 [1872]. ³⁾ v. Knaffl-Lenz, H. 46, 293 [1905].

⁴⁾ Helv. chim. acta 4, 994 [1921].

⁵⁾ Samec u. v. Hoeft, Kolloidchem. Beihefte 5, 141 [1913]; weitere Literatur bei Karrer, a. a. O.

lierten Glykogen- und Stärke-acetate waren sicher von solchen Asche- und anderen Bestandteilen frei. Daß sie ihre Jodfärbungen in charakteristischer Weise beibehielten, scheint gegen die obige Annahme zu sprechen, zumal auch das elektrolytfreie Amylopektin, das Samec Erythro-amylose nennt, keine blaue sondern eine weinrote Jodreaktion gibt. Die Frage nach der Ursache der Verschiedenheit der Jodfärbung ist nach unserer Meinung noch nicht spruchreif¹⁾.

Leider ist es uns nicht gelungen, die Molekulargröße des Glykogenacetats festzustellen. Wir versuchten Eisessig und Bromoform für die kryoskopische, Aceton für die ebullioskopische Bestimmung, ohne eine Erniedrigung des Gefrierpunkts oder Erhöhung des Siedepunkts feststellen zu können; auch waren die Lösungen nicht ganz klar, sondern etwas opaleszierend. Nicht besser ging es uns bei der Anwendung der Bangerschen Methode, für die wir neben Eisessig und Benzol in 3-proz. Objektlösung, Pyridin in 3½-proz. Lösung versuchten. Trotzdem die Lösungen in Pyridin ganz klar erschienen, verhielten sie sich wie reine Lösungsmittel: eine isotherme Destillation war auch Pyridin allein gegenüber nicht zu bemerken.

Zum Vergleich stellten wir uns auf analogem Wege ein Acetal der löslichen Stärke her und versuchten, die Molekulargröße zu ermitteln: doch sind wir auch hier zu keinem Ergebnis gelangt. Das Assoziationsvermögen dieser Acetate scheint demnach, entsprechend den kolloidalen Eigenschaften von Glykogen und Stärke, ein recht großes zu sein. Auch Karrer²⁾ will sich nicht auf eine enge Grenze des Molekulargewichts seines Methyloglykogens festlegen, während er für Methylo-stärken 900—1200 angibt³⁾.

Beschreibung der Versuche.

Molekulargewichts-Bestimmung des Inulinacetats nach Barger-Rast.

Für die Molekulargewichts-Bestimmung verwandten wir das nach der früheren Vorschrift⁴⁾ hergestellte Inulinacetat. An Stelle des von Rast vorgeschlagenen Haares eignet sich wegen der schärferen Ränder noch besser ein Haar von Glaswolle als

¹⁾ Bezüglich des Vergleiches zwischen Glykogen und Erythro-amylose vergl. H. Pringsheim u. Goldstein, B. 55, 1116 [1922].

²⁾ Helv. chim. acta 4, 994 [1921].

³⁾ Helv. chim. acta 3, 620 [1920]; 4, 185 [1921].

⁴⁾ B. 54, 1284 [1921].

Strichmarke. Zum Festkleben der Capillarröhren auf der Meßplatte fanden wir feine Streifen von Leukoplast geeigneter als Wachs, da sich letzteres bei längerem Verweilen in Wasser oft löslöste. Der Einfachheit wegen haben wir auch das Glaswollhaar mit Leukoplast festgeklebt. Das Äquivalentgewicht des Inulinacetats ist gleich 288. Wir stellten uns zunächst eine Lösung von 2.88 g in 100 ccm Eisessig her. Als Vergleichslösungen verwandten wir $\frac{1}{80}$ - und $\frac{1}{100}$ -n. Azobenzol-Lösung in Eisessig. Nach 24 Stdn. war das Volumen der Objektlösung der $\frac{n}{80}$ -Lösung gegenüber (als der stärkeren) um 22 Teilstriche unseres Okularmikrometers kleiner und gegen die $\frac{n}{100}$ -Lösung um 24 Striche größer geworden. Bei $\frac{1}{2}$ -mal so großer Konzentration, also bei 4.32 g Inulinacetat in 100 ccm Eisessig und $\frac{1.5}{80}$ - und $\frac{1.5}{100}$ -n. Azobenzol-Lösungen, waren die Ausschläge allerdings kleiner, und zwar nur 3.5 resp. 2.5 Striche. Die Genauigkeit der Methode mag für so hohe Molgrößen und entsprechend große Verdünnungen versagen. Im Prinzip kommt es aber nur darauf an, den Umkehrpunkt der Ausschläge festzustellen: das ist uns in unzweifelhafter Weise gelungen. Das Molekulargewicht unseres Inulinacetats war dementsprechend größer als 8-mal 288 und kleiner als 10-mal 288 und kann nur 9-mal 288 sein. Damit ist die Molekulargröße des Inulinacetats definitiv bewiesen und zwar umsomehr, als wir für sie in der nächsten Abhandlung über Inulin noch andere Beweise beibringen werden.

Glykogenacetat.

Käuflich war einwandfreies Glykogen überhaupt nicht zu erhalten. Unser Glykogen wurde aus der Leber von Kaninchen gewonnen, die 2—3 Stdn. vor der Tötung 10 g Traubenzucker mit der Schlundsonde erhalten hatten¹⁾. Die Aufarbeitung geschah nach der Methode von Brücke; aus einer Leber gewannen wir so im Durchschnitt 7 g eines weißen, staubförmigen Glykogens, das sich im Wasser zu einer opaleszierenden Flüssigkeit löste. 3 g Glykogen wurden mit einem Gemisch von 20 ccm über Kali destilliertem Pyridin und 14 ccm Essigsäure-anhydrid übergossen und auf dem Wasserbade bis zur Lösung erwärmt. Das Einsetzen einer Acetylierungsreaktion wie beim Inulin konnte hier nie beobachtet werden. Die Lösung wurde in Eiswasser einge-

¹⁾ Diese Operationen wurden von Frau Dr. Lichtenstein und Hrn. Dr. Dieter vom hiesigen Physiologischen Institut vorgenommen, wofür wir auch hier bestens danken.

gossen und das ausfallende Produkt, nach mehrfachem Waschen mit Wasser und Dekantieren auf der Nutsche, gesammelt und im Vakuum-Exsiccator getrocknet. Die Reinigung geschah durch Lösen in Essigester und Ausfällen mit Alkohol, in dem das Glykogenacetat ebenso wie in Methylalkohol praktisch unlöslich ist. Der Schmelzpunkt lag unscharf bei 165° .

Da das Produkt stark hygroskopisch ist, mußte es für die Analyse im Schiffchen bei 78° über Phosphorpentoxyd und 14 mm Druck im zusammenschiebbaren Wägegläschen bis zur Gewichtskonstanz getrocknet werden.

0.1456 g Sbstl.: 0.2661 g CO_2 , 0.0741 g H_2O .

$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_8$ (288.12). Ber. C 50.00, H 5.60.

Gef. » 49.85, » 5.72.

Zur Acetyl-Bestimmung wurden 0.4664 g mit 10 ccm $n\text{-NaOH}$, 20 ccm Alkohol und 30 ccm Wasser bis zur Lösung auf dem Wasserbade erwärmt und dann mit $n_{10}\text{-HCl}$ und Lackmus als Indicator titriert.

Verbraucht 51.3 ccm $n_{10}\text{-HCl}$. Durch die Acetylgruppen neutralisiert 48.7 ccm $n_{10}\text{-Na(OH)}$.

Ber. COCH_3 44.73. Gef. COCH_3 44.93.

$$[\alpha]_{\text{D}}^{18} = \frac{+2.4 \times 7.2637}{1 \times 0.1121 \times 0.9752} = +159.6^{\circ} \text{ (in Pyridin).}$$

$$[\alpha]_{\text{D}}^{18} = \frac{+1.6 \times 6.9097}{1 \times 0.0717 \times 0.9710} = +158.8^{\circ} \text{ (in Pyridin).}$$

Das Acetat gab bei der Verseifung mit alkoholischer Kalilauge wieder ein weißes, staubförmiges Glykogen, das sich mit Jod braunrot färbte und in Gegenwart von Toluol ebenso wie das ursprüngliche Glykogen nach 10-stündigem Stehen bei 37° durch das Diastase-haltige Präparat Fermasol D.S. der Schweizer Ferment A.-G., Basel, zu einer Fehlingsche Lösung stark reduzierenden Flüssigkeit aufgespalten wurde.

Stärkeacetat.

Zur Anwendung gelangte durch Erhitzen in Glycerin auf 190° nach der Methode von Zulkowsky¹⁾ löslich gemachte Stärke, die Fehlingsche Lösung nicht reduzierte. Die Verarbeitung geschah wie beim Glykogen, das Verhalten war das gleiche; die Reinigung geschah durch Ausfällen der Chloroform-Lösung mit Petroläther. Da wir das Molekulargewicht nicht bestimmen konnten, sind wir in keine weiteren Details gegangen. Die Löslichkeitsverhältnisse des Acetats wichen von denen des Glykogenacetats etwas ab; es war auch schwer löslich in Alkohol und

¹⁾ B. 13, 1395 [1880].

leicht löslich in Eisessig und Essigester, dagegen in Aceton im Gegensatz zum Glykogenacetat nur in der Hitze etwas löslich. Beim Acetylieren entsteht also aus löslicher Stärke ein anderes Produkt als aus Glykogen, während die Methylierungsprodukte identisch befunden worden waren¹⁾. Jedoch wurde festgestellt, daß das verseifte Stärkeacetat ebenso wie die lösliche Stärke durch das Schweizer Ferment gespalten wurden.

165. Hans Pringsheim und Alexander Aronowsky: Über Inulin. (Dritte Mitteilung.)

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

(Eingegangen am 30. März 1922.)

In den beiden ersten Mitteilungen²⁾ konnte der Beweis erbracht werden, daß dem durch Acetylierung mit Pyridin und Essigsäureanhydrid gewonnenen und auf besondere Weise gereinigten Triacetyl-inulin neun Fructose-Reste zugrunde liegen. Es galt nun, dieses Ergebnis weiter zu festigen und den Grundkörper des Inulin-Moleküls aufzufinden; denn es konnte wohl keinem Zweifel unterliegen, daß auch dieses Polysaccharid, wie das für die Stärke bewiesen worden ist, aus polymeren Komplexen eines niedriger molekularen Anhydro-zuckers besteht, die, durch Nebenvalenzen zusammen gehalten, das Inulin-Molekül ausmachen.

Fürs erste lag uns daran, den Beweis, den wir bisher der Röntgen-spektroskopischen Untersuchung verdanken, daß das verseifte Inulinacetat mit dem ursprünglichen Inulin identisch ist, weiter zu erhärten. Da anderen, als den von uns erbrachten, rein chemischen Vergleichsmöglichkeiten in diesem Falle nicht auf die Spur zu kommen war, dachten wir daran, die exakte Messung der fermentativen Spaltung bei gleicher Wasserstoff-ionen-Konzentration bezüglich ihres Zeitwertes zu prüfen und so die beiden Präparate zu identifizieren. Bisher hat uns jedoch der Spaltungsversuch mit »Inulase« ein überraschendes Resultat geliefert.

Die von Green³⁾ entdeckte Inulase findet sich bei höher organisierten Pflanzen mit dem als Reservematerial dienenden Inulin vergemeinschaftet z. B. in Dahlia- und Helianthus-Knollen.

¹⁾ Karrer, *Helv. chim. acta* 4, 994 [1921].

²⁾ Pringsheim u. Aronowsky, *B.* 54, 1281 [1921]; H. Pringsheim u. Laßmann, *B.* 55, 1409 [1922].

³⁾ *Ann. Botany* 1, 223 [1888].