

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 waren<sup>1)</sup>. 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 Mitteilungen<sup>2)</sup> 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 Green<sup>3)</sup> entdeckte Inulase findet sich bei höher organisierten Pflanzen mit dem als Reservematerial dienenden Inulin vergemeinschaftet z. B. in Dahlia- und Helianthus-Knollen.

<sup>1)</sup> Karrer, *Helv. chim. acta* 4, 994 [1921].

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

<sup>3)</sup> *Ann. Botany* 1, 223 [1888].

Bisher liegen keine Versuche vor, das Ferment aus derartigen Lagerstätten abzutrennen und ein gereinigtes Enzympräparat zu gewinnen. Da wir für unsere Zwecke jedoch eines Inulin-freien Fermentes benötigten, schien es angezeigt, auf niedrigere Organismen zurückzugreifen und sich der Inulin spaltenden Mycelpilze zu bedienen. Durch Behandeln mit Aceton und Äther lassen sich solche Pilzmycelien in geeignete, Inulase-haltige Aceton-Dauerpräparate verwandeln. So gelangten wir mit *Penicillium glaucum* unschwer in den Besitz eines Fermentes, das Inulin bei passender Temperatur in Gegenwart von Toluol kräftig zu Fructose aufspaltete; als wir dieses Ferment aber auf unser desacetyliertes Inulinacetat einwirken ließen, konnten wir keine Spaltung beobachten. Nun hat Dean<sup>1)</sup> beobachtet, daß *Penicillium*- und *Aspergillus*-Arten nur dann Inulase ausbilden, wenn sie auf einem Inulin-haltigen Nährboden herangezogen werden, ganz ähnlich wie diese Pilze die Tannase, das Tannin spaltende Ferment nur absondern, wenn sie auf Tannin oder Gallussäure zum Wachstum gelangen<sup>2)</sup>. Die Hervorrufung einer latenten Enzymwirkung durch ein Nährsubstrat<sup>3)</sup> ist demnach keine Sondererscheinung.

Wir kamen dementsprechend auf den Gedanken, unseren Pilz auf dem verseiften Inulinacetat heranzuzüchten: das so gewonnene Dauerpräparat hat, unserer Erwartung entsprechend, energisch spaltend auf das aus dem Acetat zurückgewonnene Inulin gewirkt. Die Spezifität der Fermentwirkung erwies sich also im gegebenen Falle als ein noch feineres Diagnosticum als die neue Methodik der Krystall-Durchstrahlung. Das auf dem verseiften Produkt gewonnene Fermentpräparat spaltete auch natürliches Inulin kräftig. Wir kennen also von demselben Pilz je nach der Auswahl des Nährsubstrates drei Dauerpräparate: ein auf Rohrzucker gewonnenes, das Inulin gar nicht hydrolysiert, ein auf natürlichem Inulin herangezogenes, welches nur dieses angreift, und ein auf dem verseiften Acetat gezüchtetes, dem beide Inuline fermentativ zugänglich sind. Die Wirkungskraft dieser Präparate verdient eine genauere Untersuchung.

Wenn nach den Ergebnissen des Ferment-Versuches nun auch feststeht, daß sich die Moleküle des polymeren Elementarkörpers

<sup>1)</sup> Am. 32, 69 [1904].

<sup>2)</sup> Fernbach, C. r. 131, 1214 [1900]; Pottévin, C. r. 131, 1215 [1900]; nachgeprüft von H. Pringsheim: Die Variabilität niederer Organismen, Berlin 1910, S. 82, 180.

<sup>3)</sup> vergl. auch H. Euler, Chemie der Enzyme, München-Wiesbaden 1920, I. Tl., S. 293.

nach der Verseifung aus dem Inulinacetat bei der Gel-Bildung aus der hydrophilen Phase zu einem Körper assoziieren, welcher für die Bindung mit der gewöhnlichen Pilz-Inulase, die der Spaltung voraus gehen muß, keine geeignete Orientierung bietet, so ist damit keineswegs gesagt, daß dem natürlichen Inulin und unserem Verseifungskörper ein verschieden großer Polymerisationsgrad zukommt. Wir werden im Gegenteil im Folgenden noch Beweise für die Berechtigung der Neunzahl der Fructose-Reste im Inulin beibringen.

Von verschiedener Seite sind Erörterungen über den mutmaßlichen Grundkörper des Inulin-Moleküls angestellt worden. Bisher hat bei der Hydrolyse des Inulins sowohl durch Säuren wie auch durch Fermente<sup>1)</sup> niemals ein Polysaccharid erster Ordnung, etwa ein Di- oder Trisaccharid, beobachtet werden können; Karrer und Lang<sup>2)</sup> deuten deshalb das Inulin als ein polymeres Anhydro-monosaccharid (Anhydro-fructose), während Irvine und Steele<sup>3)</sup> zwischen einer Anhydro-fructose und einem Tetrasaccharid aus Fructose-Resten als Grundkörper des Inulinmoleküls schwanken; die zuletzt genannten Autoren halten auch die Möglichkeit der langen Kettenstruktur aufrecht. Neuestens versuchen Karrer, Staub und Wälti<sup>4)</sup> die Schlußfolgerungen von Karrer und Lang durch neue Versuche zu stützen. Wir werden diese Versuche widerlegen.

Unsere Aufgabe mußte es sein, der Beantwortung dieser Frage experimentell nahe zu kommen. Die Tatsache, daß das Inulin durch hydrolysierende Agenzien so außerordentlich leicht gespalten wird, für die wir späterhin eine Erklärung anbieten, brachte uns auf den Gedanken, ein mögliches Zwischenprodukt schon im Entstehen abzufangen und festzuhalten. Die Osazon-Bildung schien uns hierzu als das geeignete Mittel: wenn wir eine Lösung von Inulin in heißem Wasser mit essigsauerm Phenyl-hydrazin bei Wasserbad-Temperatur behandelten, so beobachteten wir reichliche Bildung von Glucosazon, daneben aber das Auftreten eines in heißem Wasser löslichen, offenbar einem Körper aus mehreren Fructose-Resten entsprechenden Osazons. Die vielseitige Variation unserer Versuchsbedingungen, die im Versuchsteil beschrieben wird, gestattete uns jedoch nicht, das wasserlösliche Osazon in einer für die Analyse ausreichenden Menge zu fassen. Offenbar wurde das Zwischenprodukt-Osazon ebenso wie das Inulin schon durch die

<sup>1)</sup> Green, a. a. O.    <sup>2)</sup> Helv. chim. acta 4, 253 [1921].

<sup>3)</sup> Soc. 117, 1474 [1920].    <sup>4)</sup> Helv. chim. acta 5, 129 [1922].

heiße Essigsäure in Glucosazon und Fructose gespalten, die ihrerseits wieder in Glucosazon umgewandelt werden mußte. Diese Versuchsanstellung lieferte also nur einen anfänglichen Beweis für die Tatsache, daß im Inulin mehr als ein Fructose-Rest als Grundkörper vorhanden ist.

Es mußte also der Versuch gemacht werden, die Acetylierung des Inulins mit Pyridin und Essigsäure-anhydrid durch einen acetylytischen Abbau zu ersetzen, bei dem trotz entsprechender Depolymerisation der Verband der im Inulin durch Hauptvalenzen verketteten Fructose-Reste nicht oder nur zum Teil gesprengt werden durfte. Ein Wegweiser für solche Versuche stellte die Acetylolyse der Cellulose dar, bei der bekanntlich ein Disaccharid in Gestalt des Acetates der Cellobiose erhalten bleibt. Vielfach variierte Versuche mit verschiedenen Konzentrationen an Schwefelsäure führten jedoch, auch wenn die Temperatursteigerung durch Kühlung hintangehalten wurde, entsprechend dem labilen Charakter der Fructose immer zu Verkohlungen. Ein geeignetes Acetylierungsmittel wurde in einer Mischung von 2 Tln. Eisessig und 2 Tln. Essigsäure-anhydrid auf 1 Tl. Inulin gefunden; wird Inulin hiermit übergossen und schwach auf dem Wasserbade erwärmt, so setzt bald eine starke Reaktion ein, und das Inulin geht unter Aufnahme von Acetyl-Resten in Lösung. Das dabei gewonnene Acetat zeigt jedoch wenig schöne Eigenschaften; vor allem ist es durch seine Wasserlöslichkeit ausgezeichnet, die uns zwingt, das Anhydrid und den Eisessig im Vakuum abzdampfen. Es blieb dann ein Sirup zurück, der nicht erstarren wollte, und der, durch Aufnehmen mit Chloroform, Waschen der Lösung mit Natriumbicarbonat und Wasser gereinigt, wieder einen sirupösen Rückstand ergab. Zu einem entscheidenden Erfolge gelangten wir erst, als wir das Acetat verseiften. Geeigneter als alkoholische Kalilauge erwies sich hierzu Natriumalkoholat, das, unter Eiskühlung auf die alkoholische Lösung des Acetates in Reaktion gebracht, ein gut abnutzbares und nach Waschen mit absol. Alkohol alkalfreies Natriumsalz eines neuen Inulin-Spaltungsproduktes lieferte. Der diesem Salz zugrunde liegende Zucker ließ sich aus seiner wäßrigen Lösung nach der Neutralisation mit Essigsäure nicht mit Alkohol, wie z. B. die Cellobiose oder die »Polyamylosen« ausfällen, da er in Alkohol ebenso wie Fructose löslich ist. Bestimmten wir jedoch den Natriumgehalt des im Vakuum-Exsiccator getrockneten Salzes in wäßriger Lösung mit  $\frac{1}{10}$ -Salzsäure, so fanden wir in wiederholten Versuchen Werte, die auf die Zusammensetzung  $[C_6H_{10}O_5]_n, NaOH$  stimmten. Es muß also

das Acetat eines aus drei Fructose-Resten zusammengesetzten Zuckers zugrunde gelegen haben. Auch die Elementaranalyse gab für das Natriumsalz entsprechende Werte. Die Annahme war also berechtigt, daß der acetolytische Abbau zum Acetat einer Tri-fructose geführt hatte.

In scharfem Widerspruch zu diesem Ergebnis, wie auch zu dem unserer ursprünglichen Molekulargewichts-Bestimmung des Inulins stand die Tatsache, daß Pfeiffer und Tollens<sup>1)</sup> für Inulinnatrium die Zusammensetzung  $[C_6H_{10}O_5]_2, NaOH$  angeben, während nach Karrer<sup>2)</sup> der Grundkörper polymerer Anhydro-zucker aus ihren Verbindungen mit Alkalilauge zu ermitteln sein soll. Als wir uns jedoch das Inulinnatrium durch Fällen einer Lösung von Inulin in 10-proz. Natronlauge mit Alkohol herstellten, gab es nach geeigneter Reinigung wieder auf die Zusammensetzung  $[C_6H_{10}O_5]_3, NaOH$  stimmende Werte; überdies hat das von Tanret<sup>3)</sup> dargestellte Inulinbarium entsprechend der Zweiwertigkeit des Bariums die Zusammensetzung  $[C_6H_{10}O_5]_2, Ba(OH)_2$ . Wenn Karrer, Staub und Wälti<sup>4)</sup> beim Inulinnatrium zu einem anderen Resultat gelangen und angeben, daß seine Zusammensetzung  $[C_6H_{10}O_5, NaOH]_x$  sei, so müssen wir demgegenüber das Folgende bemerken: Die von Karrer angegebene Methode zur Bestimmung von Grundkörpern polymerer Anhydro-zucker<sup>2)</sup> ist von sehr zweifelhaftem Wert; wir werden an anderer Stelle<sup>5)</sup> zeigen, daß sie bei den aus Stärke gewonnenen Polyamylosen, auf deren Natriumhydroxyd-Verbindungen Karrer seine Methode aufbaute, im entscheidenden Falle versagt. Der Natriumgehalt aller Additionsverbindungen der Polysaccharide hängt ganz von der Konzentration der Natronlauge ab, aus der diese Körper mit Alkohol ausgefällt werden, resp. von der Menge Wasser, aus der sie umgelöst werden, um sie von der anhaftenden Natronlauge zu befreien. Die Dissoziation der Molekularverbindungen ist auch beim Inulin in Wasser eine bedeutende. Verwendet man zu starke Natronlauge, so kann man das Gleichgewicht zu Gunsten von Natriumhydroxyd-Additionsverbindungen, die mehr Natrium enthalten, als dem wahren Grundkörper des Inulins entspricht, verschieben. Das geht schon aus den von Karrer publizierten zweimal aus Wasser gefällten Natriumhydroxyd-Inulin-Präparaten hervor, die um 1.5% niedrigere Natriumwerte als seine Theorie ergaben; noch klarer zeigt sich die Unsicherheit bei den Kaliumverbin-

<sup>1)</sup> A. 210, 285 [1881].      <sup>2)</sup> Helv. chim. acta 4, 811 [1921].

<sup>3)</sup> Bl. [3] 9, 234 [1893].      <sup>4)</sup> Helv. chim. acta 5, 130 [1922].

<sup>5)</sup> H. Pringsheim u. Dernikos, B. 55, 1433 [1922].

dungen. Bei 9-proz. Kalilauge, also etwa derselben Konzentration wie der verwandten Natronlauge, findet Karrer um ca. 5% zu niedrige Kaliwerte, bei 15-proz. Kalilauge stimmt sein Resultat entsprechend seiner Theorie  $[\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]_3\text{KOH}$ , während 25-proz. Kalilauge um mehr als  $1\frac{1}{2}\%$  zu hohe Werte lieferte. Es ist klar, daß man die Konzentration des Alkalis nicht entsprechend der erwünschten Theorie verschieben kann.

Das Inulin ist ein in Wasser so schwer löslicher Körper, daß man in diesem Falle den Natriumgehalt nach unten begrenzen kann; verwendet man so verdünnte Natronlauge, daß das Inulin noch in Lösung gehalten wird, oder löst man das aus starker Natronlauge mit Alkohol gefällte Produkt in soviel Wasser auf, daß es gerade noch in Lösung bleibt und fällt daraus mit Alkohol, dann erhält man Werte, die auf die Zusammensetzung  $[\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]_3\text{NaOH}$  stimmen. Wir halten diesen Körper für den Repräsentanten der Natriumverbindung des Inulin-Grundkörpers; aber wir würden diesem Befund bei der Unsicherheit der ganzen Methode keine große Bedeutung beimessen, wenn nicht das in Wasser schwer lösliche Barium-inulin die entsprechende Zusammensetzung zeigte.

Anders liegen die Verhältnisse, wenn man eine Alkaliverbindung aus dem Acetat eines Zuckers durch Natriumalkoholat unter Vermeidung jeden Wasserzusatzes gewinnt und sie durch Waschen mit absol. Alkohol vom anhaftenden Alkoholat befreit; dann erhält man bei den Polyamylosen<sup>1)</sup> Resultate, die von der unkontrollierbaren Dissoziation der Alkaliverbindungen in Wasser oder verd. Alkohol frei sind. Das nach unserer Methode mit Pyridin gewonnene Inulinacetat gab nach der Verseifung mit Natriumalkoholat einwandfrei stimmende Werte eines Inulinnatriums von der Formel  $[\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]_3\text{NaOH}$ .

Schon diese Befunde im Zusammenhang mit unserer Molekulargewichts-Bestimmung des Inulins stellten die Bedeutung der Dreizahl für das Inulin-Molekül sicher. Das Inulinnatrium reduziert Fehlingsche Lösung natürlich ebenso wenig wie Inulin; das Natriumsalz der Trifruktose jedoch ziemlich bedeutend. Verglichen wir seine Reduktionskraft mit der von Fructosenatrium, so fanden wir sie fast genau den dritten Teil so groß, während das Fructosenatrium die seinem Gehalt an Fructose entsprechende Reduktionskraft zeigte. Dieses Ergebnis, das in seinem quantitativen Ausmaße nicht einmal gefordert werden konnte, stärkt

<sup>1)</sup> H. Pringsheim u. Dernikos, a. a. O.

jedenfalls den Beweis, daß uns durch die Acetolyse eine Depolymerisation des Inulins auf den dritten Teil seiner Molgröße unter Sprengung einer Anhydro-Sauerstoffbrücke und Erhaltung zweier Glucosid-Bindungen zu einem aus drei Fructose-Resten bestehenden Trisaccharid gelungen ist.

Wir versuchten nun, die Trifructose wenigstens in Gestalt eines Derivates zu fassen. Als geeignet erschien uns die Darstellung eines substituierten Hydrazons; wir wählten das Benzyl-phenylhydrazin, welches im Gegensatz zum gewöhnlichen Phenylhydrazin, wie bekannt, auch mit Disacchariden schwer lösliche Kondensationsprodukte gibt. Lobry de Bruyn und van Ekenstein<sup>1)</sup> geben an, daß ihnen die Darstellung des Fructose-Benzyl-phenylhydrazons in alkoholisch-wässriger Lösung nicht gelungen sei. Arbeitet man jedoch in rein alkoholischer Lösung, dann krystallisiert das Kondensationsprodukt bei mehrtägigem Stehen in schönen Nadeln aus. Als wir nun unser Trifructosenatrium in alkoholischer Lösung mit der berechneten Menge Benzyl-phenylhydrazin bei Gegenwart von Essigsäure zusammenbrachten, gelangten wir wieder nur zum Derivat der einfachen Fructose. Die Essigsäure hatte also schon beim Stehen in der Kälte spaltend auf das Trisaccharid eingewirkt.

Fassen wir die Ergebnisse unserer Untersuchungen zusammen, so kommen wir zu dem folgenden Schluß: Das Inulin stellte sich in fester Form, wie auch in seiner kolloidalen Lösung, als das Assoziationsprodukt einer dreifach polymerisierten Anhydro-trifructose dar. In dieser Anhydro-trifructose sind die Fructose-Reste nicht in Gestalt der in Lösung beständigen Fructose mit Butylenoxyd-Sauerstoffbrücke, sondern wie im Rohrzucker<sup>2)</sup> und höchstwahrscheinlich in der Raffinose, der Gentianose und der Stachyose, aus denen die Fructose schon durch schwache Säuren abgespalten wird, in Gestalt der sogenannten  $\gamma$ -Fructose vorhanden, der wahrscheinlich ein Äthylenoxyd-Ring zukommt. Dadurch erklärt sich die leichte Hydrolysierbarkeit des Inulins und die noch leichtere, schon durch verd. Essigsäure in der Kälte bewirkte Spaltung der Trifructose. Gestützt sind diese Anschauungen durch den Befund von Irvine und Steele<sup>3)</sup>, welche durch Spaltung des methylierten Inulins, auf dem Umwege über das Tetramethyl-methylfructosid fast quantitativ dieselbe Tetramethylfructose, wie aus Rohrzucker gewinnen konnten. Dazu sei bemerkt,

<sup>1)</sup> R. 15, 226 [1896].

<sup>2)</sup> Haworth u. Law, Soc. 109, 1314 [1917].

<sup>3)</sup> Soc. 117, 1474 [1920].

daß auch unser Trifructose-natrium Kaliumpermanganat schon in der Kälte entfärbte. Daß man durch die Spaltung von Inulin mit Acetylbromid unter den geschilderten Umständen nicht zu einem Derivat der Trifructose gelangen konnte<sup>1)</sup>, bedarf keiner weiteren Erörterung.

Der Aufbau des Inulins wäre danach in seinen Grundzügen ermittelt. Zur völligen Klärung des Inulin-Moleküls fehlt noch die Festlegung der gegenseitigen Haftstellen der drei Fructose-Reste in seinem Elementarkörper. Doch scheinen die englischen Forscher auf dem Wege zu sein, auch dieses Problem nach ihren bewährten Methoden zu lösen.

### Beschreibung der Versuche.

In der ersten Mitteilung<sup>2)</sup> ist uns bei der Elementaranalyse des Inulins im Kohlenstoff-Wert ein Fehler von ca. 1% unterlaufen, der mit einer falsch berechneten Theorie übereinstimmte. Wir stellen diese Analyse hiermit richtig. Da das Inulin den Wassergehalt nur schwer ohne Zersetzung abgibt, haben wir das verseifte Inulinacetat in lufttrockenem Zustande zur Analyse gebracht, in dem es auf je einen  $C_6H_{10}O_5$ -Rest ein Molekül Wasser enthält.

0.1703 g Sbst.: 0.2463 g  $CO_2$ , 0.1000 g  $H_2O$ .

$C_6H_{10}O_5, H_2O$  (180.08). Ber. C 39.99, H 6.71.

Gef. » 39.45, » 6.57.

Alle Versuche müssen mit einem nicht zu lange gelagerten Inulin angestellt werden, das Fehlingsche Lösung gar nicht reduziert. Wir beobachteten, daß sowohl das Inulin wie das verseifte Acetat sich bei längerem Aufbewahren verändert: Es nimmt dann zuerst eine schwache, dann eine sich vermehrende Reduktionskraft an und gibt sowohl im Ferment-Spaltungsversuch, wie auch bei den Acetylierungsversuchen abweichende und zu großen Fehlern Veranlassung gebende Resultate.

#### 1. Ferment-Spaltungsversuche.

Das Aceton-Dauerpräparat wurde folgendermaßen gewonnen: Eine Lösung von 2% Inulin resp. verseiftem Acetat in Leitungswasser, die als Nährsalze 0.2% Ammoniumsulfat, 0.05% saures Kaliumphosphat, 0.01% Magnesiumsulfat enthielt, wurde in einer Schichthöhe von 3—4 cm in Erlenmeyer-Kolben sterilisiert und nach dem Beimpfen mit Sporen von *Penicillium glaucum* bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Die Dauer des Mycel-Wachstums

<sup>1)</sup> Karrer, Staub u. Wälti, *Helv. chim. acta* 5, 129 [1922].

<sup>2)</sup> B. 54, 1286 [1921].



bis zur Sporenbildung betrug ca. 10 Tage; dann wurde der auf der Nutsche gut mit Wasser gewaschene Pilz, in einer Schraubenschraube stark entwässert und fein zerschnitten, in Aceton eingetragen; darin wurde er durch 10 Min. langes Schwemmen gut verteilt, dann abgesaugt und möglichst trocken gut zerkleinert in einer Schale 2 Min. mit Aceton durchgerührt und von neuem abgesaugt. Jetzt wurde in grob zerkleinertem Zustande in Äther eingetragen und darin 3 Min. verrührt. Das von Äther abgesaugte Produkt trocknete darauf, in fein gepulvertem Zustande in dünner Schicht auf Filtrierpapier ausgebreitet, 1 Stde. an der Luft. Die endgültige Trocknung erfolgte im Brutschrank während 24 Stdn. bei 48°.

0.2 g dieses auf Inulin gezüchteten Dauerpräparates gaben wir zu 200 ccm einer 2-proz. Inulin-Lösung und hielten bei Gegenwart von Toluol bei 45° im Brutschrank. Die an verschiedenen Tagen entnommen 20 ccm Lösung gaben folgende Werte, da 4 g Inulin 4.44 g Fructose entsprachen

Nach	1 Tag	0.0485 g Cu entspr.	0.0296 g Fructose =	5.16 % Spalt.
»	2 Tagen	0.0878 »	»	» 12.07 »
»	3 »	0.1309 »	»	» 17.80 »
»	4 »	0.1542 »	»	» 21.20 »
»	7 »	0.2704 »	»	» 37.4 »
»	10 »	0.3840 »	»	» 52.9 »
»	14 »	0.4310 »	»	» 59.3 »

Das auf Inulin gewonnene Dauerpräparat wirkte also stark hydrolysierend auf Inulin. Wir wollen den Zeitwert der Reaktion in einer späteren Untersuchung festlegen.

0.25—0.5 g desselben Dauerpräparates üben auf 1 g verseiftes Inulinacetat, in 10 ccm Wasser gelöst, selbst bei Ausdehnung des Versuches über 14 Tage hinaus keine Spaltung aus. Dagegen gab dieselbe Menge eines auf verseiftem Inulinacetat in genau der gleichen Weise herangezogenen und in ein Dauerpräparat verwandelten Pilzmycels schon nach 3 Tagen und von da an dauernd stärkere Reduktion von Fehlingscher Lösung, gleichgültig, ob es mit natürlichem Inulin oder mit verseiftem Acetat in Berührung gebracht wurde. Auch diese Spaltung wollen wir in ihrer quantitativen Zeitwirkung verfolgen. Wir haben diese Spaltungsversuche auch bei einer analogen Wasserstoff-ionen-Konzentration in gepufferten Lösungen durchgeführt und trotzdem keine Wirkung des Inulin-Präparates auf das verseifte Acetat feststellen können.

## 2. Osazon-Versuch.

2 g Inulin wurden in 20 ccm Wasser gelöst und mit einer Lösung von 4 g Phenyl-hydrazin in 8 g 50-proz. Essigsäure versetzt. Nachdem 1 Stde. im siedenden Wasserbade erwärmt worden war, wurde erkalten gelassen und das ausgeschiedene Osazon-Gemisch zuerst mit etwas kaltem Wasser,

dann mit Benzol gewaschen. Wurde nach dem Trocknen mit wenig heißem Wasser aufgekocht, so fiel aus der filtrierten Lösung eine nicht große aber doch scharf als lösliches Osazon erkennbare Menge eines gelben Körpers aus. Durch weiteres Erhitzen der vom Osazon-Gemisch abgetrennten Lösung konnte wieder ein solches Gemisch erhalten werden; der Versuch ließ sich noch mehrfach fortsetzen.

### 3. Acetolyse-Versuch mit Essigsäure-anhydrid und Schwefelsäure.

0.5 g Inulin wurden mit 2 ccm Essigsäure-anhydrid übergossen, die die folgenden Mengen konz. Schwefelsäure enthielten: 0.15, 0.1, 0.08, 0.06 und 0.04 ccm. Die Mischung wurde in einem Kältegemisch abgekühlt auf das Inulin gebracht; auch bei der Einwirkung sorgten wir mehrere Stunden lang für starke Kühlung. Beim Stehen über Nacht im Eisschrank waren die vier ersten Proben stark verkohlt, in der letzten blieb das Inulin zum Teil ungelöst, während die Braunfärbung der Lösung schon wieder einsetzende Verkohlungen anzeigte.

### 4. Acetolyse mit Essigsäure-anhydrid und Eisessig.

5 g Inulin wurden mit einem Gemisch aus 10 ccm Essigsäure-anhydrid und 10 ccm Eisessig übergossen. Beim Erwärmen auf dem Wasserbade begann das Inulin nach einiger Zeit gewissermaßen zusammenzuschmelzen; wird in diesem Moment vom Wasserbad weggenommen und umgeschüttelt, so setzt unter starkem Aufschäumen der Lösung eine heftige Reaktion ein, bei der das Inulin in Lösung geht. Die Reaktion erfolgt nur mit einem einwandfreien, nicht reduzierenden Inulin. Die Reinigung des Acetats geschah entweder durch Abdampfen der verbleibenden Mengen Essigsäure-anhydrid und Eisessig im Vakuum, mehrfaches Lösen in absol. Alkohol und Abdampfen unter vermindertem Druck oder Eingießen in Wasser, Aufnehmen mit Chloroform, Waschen mit Bicarbonat und Wasser und Abdampfen nach dem Trocknen über Chlorcalcium.

### 5. Trifructose-natrium.

Das aus 5 g Inulin gewonnene Acetat wurde in 50 ccm absol. Alkohol gelöst und unter starker Kühlung nach und nach mit Natriumalkoholat, bereitet aus 2.5 g Natrium und 50 ccm absol. Alkohol, versetzt. Bei genügender Zugabe trat zuerst Trübung ein, und in diesem Augenblick erstarrte die ganze Flüssigkeit zu einem Brei, der dann noch  $1\frac{1}{2}$  Stdn. unter Eiskühlung stehen blieb. Dann wurde abgesaugt, wobei dafür gesorgt wurde, daß der Niederschlag dauernd mit absol. Alkohol bedeckt war. Darauf wuschen wir gründlichst unter Aufschwemmen und Dekantieren mit absol. Alkohol und trockneten zur Analyse über Schwefelsäure und Stangenkali.

0.1639 g Sbst.: 0.2469 g C O<sub>2</sub>, 0.0914 g H<sub>2</sub>O — 0.4726 g Sbst. verbraucht zur Neutralisation 8.6 ccm  $n_{10}$ -HCl. — 0.5310 g Sbst. verbraucht zur Neutralisation 10.85 ccm  $n_{10}$ -HCl.

(C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>)<sub>3</sub>, Na OH (526.24). Ber. C 41.05, H 5.93, Na 4.37.

Gef. » 41.10, » 6.24, » 4.42, 4.48.

## 6. Reduktion mit Fehlingscher Lösung.

- a) Fructose-natrium: Zur Darstellung des Fructose-natriums wurden zuerst 10 g Inulin und 50 ccm  $\frac{1}{2}$ -proz. Schwefelsäure 1 Stde. auf dem Wasserbade erwärmt, die Schwefelsäure durch Kochen mit Bariumcarbonat entfernt und das Filtrat im Vakuum zur Trockne verdampft. Den sirupösen, aus Fructose bestehenden Rückstand nahmen wir mit Alkohol auf und verwandten einen Teil der so erhaltenen Lösung zur Fällung mit Natriumalkoholat. Das ausgefällte Fructose-natrium wurde entsprechend mit absol. Alkohol gewaschen und getrocknet.

Die Reduktionskraft wurde nach der Methode von Bertrand bestimmt. 1) 0.3352 g entsprachen 0.4788 g Cu. — 2) 0.1556 g entsprachen 0.2241 g Cu.

Legt man den Wert von 93 ccm Fehlingscher Lösung auf 0.5 g Fructose zugrunde, der übrigens etwas schwankend angegeben wird, so entsprechen 0.5 g Fructose 0.8193 g Cu und 1) 0.2922 g Fructose, 2) 0.1369 g Fructose.

Ber. für Fructose-natrium 88.92% Fructose.

Gef. 1) 87.16%, 2) 88.02%.

- b) Trifructose-natrium:

1) 0.1694 g entsprachen 0.0758 g Cu. — 2) 0.2946 g entsprachen 0.1378 g Cu, also gaben 0.5 g Sbst. 1) 0.2236 g Cu. — 2) 0.2338 g Cu und 0.5 g der darin enthaltenden Trifructose 1) 0.2334 g Cu. — 2) 0.2441 g Cu; d. h. die Trifructose zeigt ca. 30% der Reduktionskraft der Fructose.

## 7. Inulin-natrium.

- a) 5 g Inulin wurden in 25 ccm 10-proz. Natronlauge gelöst. Die Lösung wurde mit absol. Alkohol gefällt, der Niederschlag in kaltem Wasser gelöst und daraus wieder mit absol. Alkohol gefällt. Nach entsprechendem Waschen mit absol. Alkohol wurde im Vakuum-Exsiccator getrocknet.

1) 0.6150 g Sbst. verbraucht 11.8 ccm  $n_{10}$ -HCl. — 2) 1.2200 g Sbst. verbraucht 22.9 ccm  $n_{10}$ -HCl.

(C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>)<sub>3</sub>, Na OH: Ber. Na 4.37.

Gef. » 1) 4.41, 2) 4.32.

- b) 2.5 g Inulinacetat wurden in fein gepulvertem Zustande mit 25 ccm Natriumalkoholat, enthaltend 2 g Natrium, mehrere

Stunden in einer Stöpselflasche auf der Maschine geschüttelt. Dann wurde abgesaugt, wobei der Niederschlag dauernd mit absol. Alkohol bedeckt blieb. Es wurde dann mit viel absol. Alkohol geschwemmt und gewaschen, bis der Alkohol Phenolphthalein nicht mehr färbte. Dann wurde im Vakuum-Exsiccator getrocknet.

1) 0.4684 g Sbst. verbrauchten 9.0 ccm  $n_{10}$ -HCl. — 2) 0.2618 g Sbst. verbrauchten 5.0 ccm  $n_{10}$ -HCl.

( $C_6H_{10}O_5$ )<sub>3</sub>, Na OH. Ber. Na 4.37.

Gef. » 1) 4.41, 2) 4.56.

### 8. Fructose-Benzyl-phenyl-hydrazon.

Ein Teil der bei der Hydrolyse des Inulins gewonnenen alkoholischen Fructose-Lösung (6) wurde mit der molekularen Menge Benzyl-phenyl-hydrazin und dem gleichen Gewicht Eisessig versetzt und mehrere Tage kalt aufbewahrt. Nach und nach fiel die Substanz in Nadeln aus. Sie wurde aus Alkohol umkrystallisiert, bis der Schmp.  $190^{\circ}$  (unkorr.) erreicht war. Dieselbe Substanz gewannen wir, als wir das Trifruktosenatrium durch Zusatz der berechneten Menge Eisessig in Alkohol in Lösung brachten und dann entsprechend mit Benzyl-phenyl-hydrazin und Eisessig versetzten.

Die Daten der Stickstoff-Bestimmung sind uns abhanden gekommen wir werden sie nachliefern.

## 166. Hans Pringsheim und Walter Persch: Über Methyl- und Acetylprodukte der »Polyamylosen«. (Beiträge zur Chemie der Stärke, V.)

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

(Eingegangen am 30. März 1922.)

Wie wir vor kurzem zeigten<sup>1)</sup>, gelingt es, in die Tetraamylose für je einen Glucose-Rest zwei Methylgruppen einzuführen und so zu einer nicht depolymerisierten, krystallinischen Methylo-tetraamylose zu gelangen; die dritte Hydroxylgruppe hat der Methylierung hartnäckig widerstanden. Es wurde deshalb die Frage aufgeworfen, ob sie in irgendwelcher Weise für den Zusammenhang der Diamylose-Komplexe in der Tetraamylose verantwortlich gemacht werden könne. Um das zu entscheiden, mußte einmal das dritte Hydroxyl durch den Acetylrest besetzt und

<sup>1)</sup> Pringsheim u. Persch, B. 54, 3162 [1921].