

61. A. Kiesel und N. Semiganowsky: Cellulose-Bestimmung durch quantitative Verzuckerung.

[Aus d. Phytochem. Abteil. d. Chem.-pharmazeut. Instituts in Moskau.]

(Eingegangen am 6. Dezember 1926.)

Die höchste Ausbeute von Glykose bei der Verzuckerung von Cellulose, die bis jetzt erhalten wurde, blieb immer noch hinter der theoretischen zurück. In den Versuchen von Willstätter und Zechmeister¹), H. Ost²), sowie Irvine und Hirst³) betrug die Differenz zwischen Theorie und Ausbeute etwa 4%. Dabei konnte es sich entweder um eine teilweise Zerstörung der Glykose, um Reversions-Erscheinungen oder endlich auch darum handeln, daß Cellulose neben Glykose-Gruppen auch andersartig gebaute, nicht kohlehydrat-artige Gruppierungen enthält.

Während der Untersuchung eines anderen, schwer hydrolysierbaren, deutlich von Cellulose unterscheidbaren Polysaccharids beobachtete der eine von uns⁴) bei Vergleichsversuchen mit Cellulose, daß letztere unter gewissen Bedingungen ganz quantitativ verzuckert werden kann. Die angewandte Verzuckerungs-Methode war eine Modifikation der alten Methode von E. Flechsig⁵), die auch den Untersuchungen von Ost und Wilkening²), sowie von G. W. Monier-Williams⁶) zugrunde lag.

Die Modifikation bestand darin, daß statt 70-proz. Schwefelsäure 80-proz. angewendet wurde, und das Digerieren bei Zimmer-Temperatur mit dieser möglichst kurzzeitig war, um bei völligem Auflösen der Cellulose die nach längerem Einwirken eintretende Färbung (zuerst rosa, dann bräunlich) zu vermeiden. Diesem Digerieren folgte nach entsprechendem Verdünnen mit Wasser eine Hydrolyse im kochenden Wasserbade.

Auf Grund zahlreicher Versuche, bei welchen als reine Cellulose runde Filter Nr. 597 von Schleicher & Schüll, mit Korrektion auf Wasser- und Asche-Gehalt verwendet wurden, kamen wir zu folgendem Verfahren der quantitativen Verzuckerung der Cellulose, das gleichzeitig zur quantitativen Cellulose-Bestimmung in pflanzlichen Objekten und Materialien sehr zu empfehlen ist, da es Zeit und Mühe spart und wohl genauere Resultate gibt, als die meisten üblichen Cellulose-Bestimmungsmethoden.

Das cellulose-haltige, trockne Material wird mit der 7-10-fachen Menge 80-proz. Schwefelsäure $2\frac{1}{2}$ Stdn. bei Zimmer-Temperatur stehen gelassen, wobei bei schlechterem Benetzen die Zuhilfenahme eines Glaßstabes zu empfehlen ist. Auf je 1 ccm gebrauchter Schwefelsäure werden sodann 15 ccm Wasser zugesetzt. Die bei Anwendung reiner Cellulose vollständig farblose und klare Lösung wird 5 Stdn. am Rückfluß-Luftkühler im kochenden

¹) B. **46**, 2401 [1913].

²) H. Ost und L. Wilkening, Chem.-Ztg. **34**, 461 [1910]; H. Ost, B. **46**, 2995 [1913].

³) Journ. chem. Soc. London **121**, 1585 [1922]; H. Pringsheim, Die Polysaccharide, 1923, S. 70-71.

⁴) A. Kiesel, Ztschr. physiol. Chem. **150**, 102 [1925]; Arch. wiss. Bot. (Planta) **2**, 44 [1926].

⁵) Ztschr. physiol. Chem. **7**, 523 [1883].

⁶) Journ. chem. Soc. London **119**, 803 [1921].

Wasserbade erwärmt. Die Cellulose geht bei dieser Behandlung quantitativ in Glykose über und kann durch Multiplikation mit dem Faktor 0.9 nach der in beliebiger Weise bestimmten Glykose berechnet werden.

Unter Umständen tritt bei gutem Benetzen die Auflösung der Cellulose auch früher als in $2\frac{1}{2}$ Stdn. ein; praktisch ist es aber bequemer, die angegebene Zeit einzuhalten. Auch kann reine Cellulose trotz dabei auftretender schwacher Rosafärbung der Lösung ohne Gefahr 4–5 Stdn. mit Säure digeriert werden, was jedoch als überflüssig befunden wurde. Bedeutend verlängertes Digerieren führt zum Abfall der Glykose-Ausbeute wegen Zerfalls unter allmählicher Schwärzung. Schon 4-stdg. Erwärmen nach dem Verdünnen gab uns die nämlichen Resultate, doch ist ein 5-stdg. der Sicherheit wegen mehr zu empfehlen. Der bei der Hydrolyse von Filtrerpapier oft in Spuren auftretende, weiße Niederschlag röhrt vom Asche-Gehalt des Materials her und wirkt bei direkter Zucker-Bestimmung keineswegs störend.

Um Sicherheit darüber zu erlangen, daß bei dieser Behandlung die Cellulose tatsächlich Glykose gibt und keine Zufälligkeiten Einfluß haben, mußten die von uns nach der Methode der Kupfer-Reduktion nach G. Bertrand erhaltenen Glykose-Zahlen noch anderweitig nachgeprüft werden.

Zuerst wurden die nach der Reduktions-Methode erhaltenen Zahlen durch jodometrische Bestimmungen nach Willstätter und Schudel¹⁾ verifiziert, wobei ganz übereinstimmende Resultate erhalten und im Bereich der üblichen Fehlergrenzen auch nach dieser Methode aus Cellulose stets der theoretische Wert (111.1%) an Glykose gefunden wurde.

Weiter wurden zwei größere Verzuckerungs-Versuche mit Cellulose vorgenommen und in dem einen Versuch neben polarimetrischen Messungen Glykose auch in Substanz erhalten.

I. 5.2851 g Rundfilter Nr. 597 von Schleicher & Schüll, die nach Abzug vom Wasser- und Asche-Gehalt (zusammen 6.52%) 4.9405 g Reincellulose enthalten mußten, wurden mit 50 ccm 80-proz. Schwefelsäure $3\frac{1}{2}$ Stdn. stehen gelassen. Dabei wurde mit Hilfe eines Glasstabes für gute Benetzung gesorgt. Die Cellulose löste sich vollständig im Laufe von $2\frac{1}{2}$ Stdn. auf. Nach Zusatz von 750 ccm Wasser wurde die Lösung dann 5 Stdn. im kochenden Wasserbade erwärmt. Es resultierte eine schwach gelblich gefärbte Lösung mit einer geringen Trübung, die wiederum nur durch die Asche-Bestandteile der Filter bedingt war. Verkohlte Teilchen waren nur in Spuren vorhanden und mußten von Beimengungen in den Filtern herstammen. Die filtrierte Lösung war optisch vollständig klar und ließ sich direkt nach Auffüllen bis zu 1 l zur polarimetrischen Untersuchung verwenden.

Zwei Bestimmungen in je 15 ccm ergaben nach der Reduktions-Methode nach G. Bertrand 0.0816 und 0.0825 g, im Mittel 0.0821 g Glykose. Für die ganze Menge berechnen sich daraus 5.467 g statt der theoretischen 5.489 g, d. h. 99.6% der Theorie.

Drehung im 220-mm-Rohr +0.62⁰, $[\alpha]_D^{20} = 51.3^0$.

Bei der geringen Zucker-Konzentration konnte die Bestimmung der spez. Drehung selbstverständlich nicht genügend genau sein.

Die Schwefelsäure wurde mit Baryt ausgefällt, der ganz geringe Überschuß von Baryt mit Kohlensäure abgestumpft und entfernt, die Lösung und das Waschwasser nach getrenntem Einengen auf dem Wasserbade vereinigt, das noch ausgeschiedene Bariumcarbonat abfiltriert und die Lösung auf 25 ccm gebracht.

¹⁾ B. 51, 780 [1918].

Die Drehung im 220-mm-Rohr ergab den Ablesungswinkel $+19.65^\circ$, $[\alpha]_D^{21.5} = 42.54^\circ$.

Die polarisierte Lösung wurde weiter zum orange-farbigen, klaren, dicken Sirup eingeengt, welcher schon am nächsten Tage eine reichliche Krystallisation aufwies. In 48 Stdn. war die Krystallisation des ganzen Sirups vollendet. Es bildete sich eine harte, körnige Krystallmasse.

Diese leichte, rasche und vollständige Krystallisation aus wäßriger Lösung ist ein deutlicher Beweis für die Reinheit und Einheitlichkeit der erhaltenen Glykose und zugleich für die alleinige Beteiligung von Glykose-Gruppen am Aufbau des Cellulose-Moleküls. Schon früher wurde von H. Ost auf die leichte Krystallisierbarkeit der aus Cellulose erhaltenen Glykose aus Wasser hingewiesen. Die bedeutend vom üblichen Gleichgewicht von α - und β -Glykose abweichende spezif. Drehung ist vermutlich dem Einengen in Gegenwart von Bariumcarbonat zuzuschreiben. Ost erhielt $[\alpha]_D^{20}$ -Werte, die sogar zwischen 29.4° und 44.8° lagen.

II. 6.9750 g derselben Filter, die nach Abzug von 6.54 % Wasser- und Asche-Gehalt 6.5188 g Cellulose enthielten und theoretisch 7.2431 g Glykose geben mußten, wurden zum Vermeiden größerer, ein stärkeres Verdünnen verlangender Schwefelsäure-Mengen nur mit 25 ccm 80-proz. Schwefelsäure ange setzt und weiter in üblicher Weise behandelt. Selbstverständlich erforderte in diesem Fall die Auflösung der Cellulose größere Aufmerksamkeit und Mühe. In der auf 500 ccm aufgefüllten Lösung wurde Glykose nach der Reduktionsmethode nach G. Bertrand und nach dem jodometrischen Verfahren von Willstätter und Schudel bestimmt.

5 ccm enthielten nach der Reduktionsmethode 0.0725 g Glykose, das Ganze mit hin 7.25 g. 20 ccm enthielten nach der jodometrischen Methode 0.2909 g (= 32.3 ccm $\frac{1}{10}\text{-n. J.}$), das Ganze dementsprechend 7.27 g. Somit wurden in beiden Fällen Zahlen erhalten, die den theoretischen sehr nahe kommen.

Die polarimetrische Bestimmung im 220-mm-Rohr bei 21° ergab für die erhaltene, nicht neutralisierte, schwefelsaure Lösung 1.58° , demnach $[\alpha]_D^{21} = 49.42^\circ$.

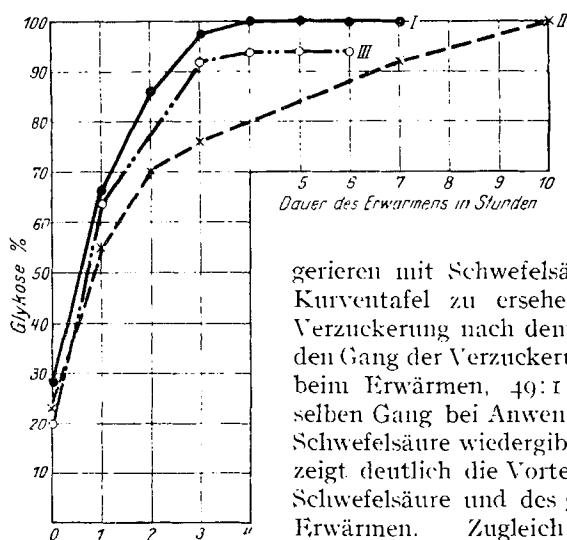
Das Ergebnis dieser Versuche scheint die quantitative Umwandlung von Cellulose in Glykose bei der angegebenen Behandlung außer Zweifel zu stellen; bei dieser Behandlung verläuft die Umwandlung leicht, ohne daß dabei unerwünschte sekundäre Nebenprodukte, wenigstens in nachweisbarer Menge, erscheinen.

Ohne die zahlreichen Bestimmungen hier anzuführen, die uns schließlich zu dem oben beschriebenen Verfahren der quantitativen Verzuckerung von Cellulose geführt haben, wollen wir doch einige Einzelheiten hervorheben, die uns im Laufe der Arbeit entgegentraten.

60-proz. Schwefelsäure löst Cellulose bei mehrtägigem Stehen nicht vollständig auf. 70-proz. löst zwar Cellulose in $2\frac{1}{2}$ Stdn. auf, gibt jedoch bei nachträglicher Hydrolyse im Wasserbade nach 15-fachem Verdünnen nur etwa 94 % d. Th., was gut mit den früheren Angaben von Ost (95.3 % bei stärkerem Verdünnen und Erwärmen unter Druck) übereinstimmt⁸⁾. 90-proz. Schwefelsäure gibt bei $2\frac{1}{2}$ -stdg. Stehenlassen eine geringe Schwärzung, jedoch wurden nach Verdünnen 15:1 und 2-stdg. Erwärmen im Wasserbade 99.3 % der Theorie erhalten. 95-proz. Schwefelsäure gibt unter den gleichen Bedingungen eine dunkle Färbung mit nachträglicher Abscheidung von schwarzen Flocken. Die Ausbeute an Glykose war hier nur 79.8 % der Theorie.

⁸⁾ B. 46, 2995 [1913].

Der Gebrauch von größeren Mengen 80-proz. Schwefelsäure (20:1 und 30:1) ergibt keine besonders in Betracht kommende Beschleunigung der Verzuckerung, ist dabei unbeliebt, da die resultierende Glykose-Lösung in demselben Maße verdünnt wird und die Bestimmungen ohne lästiges Einengen weniger genau werden.



gerieren mit Schwefelsäure ist aus nebenstehender Kurventafel zu ersehen, in der I den Gang der Verzuckerung nach dem empfohlenen Verfahren, II den Gang der Verzuckerung bei größerer Verdünnung beim Erwärmen, 40:1 statt 15:1, und III denselben Gang bei Anwendung von 70- statt 80-proz. Schwefelsäure wiedergibt. Ein Vergleich der Kurven zeigt deutlich die Vorteile der Anwendung 80-proz. Schwefelsäure und des geringeren Verdünnens beim Erwärmen. Zugleich sehen wir, daß schon während des Digerierens bei Zimmer-Temperatur mit der starken Säure gegen 20-28% reduzierenden Zuckers in der Lösung, wohl neben Hydro-cellulose und Cellulose-Dextrinen, erscheinen.

Versuche, durch Digerieren mit 80-proz. Schwefelsäure bei etwas erhöhter Temperatur (37°) eine Beschleunigung der Verzuckerung hervorzurufen, schlugen fehl: Die Ausbeute an Glykose wurde stark vermindert, was durch Zerfall derselben unter Schwärzung der Lösung bedingt war.

Nachdem die Bedingungen der bequemsten und vollständigsten Überführung von Cellulose in Glykose festgestellt waren, mußte untersucht werden, ob und wie diese Verzuckerung der Cellulose zu einer Cellulose-Bestimmungsmethode ausgebildet werden kann. Dabei war an die Beimengungen zu denken, mit denen man es bei jeder Cellulose-Bestimmung zu tun hat, besonders an andere Kohlehydrate und an Eiweiß.

Da sich beim Erwärmen von Zuckerarten mit Amino-säuren und Eiweiß nach vielen Angaben komplizierte Kondensationsprodukte bilden, welche die aus der Cellulose entstammende Glykose in Beschlag nehmen und dadurch für Cellulose zu niedrige Zahlen ergeben können, wurden einerseits Versuche mit Filtrierpapier, das mit einer bekannten Menge Gelatine durchtränkt war, und andererseits Versuche unter Zugabe von Casein angestellt. Es erwies sich dabei, daß unter diesen Bedingungen kein Verlust an Glykose eintritt und somit Eiweißstoffe kein Hindernis bei Anwendung der Verzuckerungs-Methode für die Cellulose-Bestimmung bilden, selbst wenn die zugesetzte Eiweiß-Menge der Cellulose-Menge gleichkommt. Selbstverständlich wurden gleichzeitig Kontrollversuche mit Eiweiß ohne Cellulose angestellt.

Weiter wurde das Verhalten einer Reihe der wichtigsten Kohlehydrate zu Schwefelsäure unter den in Betracht kommenden Bedingungen geprüft. Nach $2\frac{1}{2}$ -stdg. Digerieren bei Zimmer-Temperatur mit 80-proz. Schwefel-

säure und darauffolgendem 5-stdg. Erwärmen im Wasserbade nach Zusatz von 15 Tln. Wasser, ergaben Glykose (Merck) 99.7 %, Mannose (Kahlbaum) 97.7 %, Galaktose (Merck) 99.9 %, Lävulose (Merck) 26.0 %, Invertzucker 66.06 %, Xylose⁹⁾ 72.2 %, Arabinose¹⁰⁾ 84.5 % ihres ursprünglichen Wertes. Deinnach werden außer den bekanntlich sehr säureempfindlichen Ketosen noch die für säure-fest gehaltenen¹¹⁾ Pentosen stark durch die verwendete 80-proz. Schwefelsäure angegriffen.

Das Ergebnis dieser Versuche ist überzeugend genug, um die Unmöglichkeit einer Cellulose-Bestimmung in pflanzlichen Objekten durch Berechnung der Cellulose aus der Differenz zwischen Gesamt-kohlehydraten (direkte Behandlung des Materials mit 80-proz. Säure) und leichter hydrolysbaren Kohlehydraten (z. B. durch Kochen mit 2-proz. Salzsäure) klar zu legen, wenn Ketosen und Pentosen im Material anwesend sind (s. unten). Bei deren Abwesenheit läßt sich jedoch die Cellulose-Bestimmung in einfacherster Weise ausführen.

Freilich bleibt auch bei der vorgeschlagenen Verzuckerungs Methode immer noch die Schwierigkeit, eine streng gezogene Grenze zwischen Cellulosen und Hemi-cellulosen zu finden. Beide Körpergruppen sind durch eine Reihe von Zwischengliedern in Bezug auf Säure-Resistenz verbunden, so daß sich wohl keine Säure-Konzentration feststellen läßt, bei der nur die eigentliche Cellulose unangegriffen bleibt. Andererseits ist Cellulose auch nicht vollständig säure-fest, selbst bei geringer Säure-Konzentration, wie dies schon mehrfach gezeigt worden ist und wovon auch wir uns selbst überzeugen konnten.

Während eines 25-stdg. Erwärmens des in Rede stehenden Cellulose-Materials mit jedesmal nach 5 Stdn. erneuten Säuremengen im kochenden Wasserbad wurde bei Anwendung von 2-proz. Salzsäure ein stetiges Auftreten von 0.3 %, bei Anwendung von 3.6-proz. (norm.) Salzsäure von 1.5 % des Materials in Form reduzierenden Zuckers in der Lösung nachgewiesen, wobei außerdem in den ersten 5 Stdn. eine 4.4–4.6 % betragende Zuckermenge, die aus dem leichter hydrolysbaren Anteil der Filter stammen mußte, auftrat¹²⁾.

Praktisch kann die Verzuckerungs-Methode zur Bestimmung von Cellulose in folgenden Arten angewendet werden:

I. Pflanzliche Objekte.

a) Nach 3-5-stdg. Erwärmen des Materials im Wasserbade mit etwa 100 Tln. 2-proz. Salzsäure wird der ungelöste Rückstand im Gooch-Tiegel auf Asbest gesammelt, mit heißem Wasser, Alkohol und Äther zum Entfernen der Fett-Reste ausgewaschen und dann getrocknet¹³⁾. Der am Boden des Tiegels haftende Rückstand wird samt dem Tiegel in ein Kölbchen gestellt, mit etwa 10 Tln. 80-proz. Schwefelsäure im Tiegel übergossen und mit einem Glasstab nach einiger Zeit mit der Säure gut verrieben. Nach

⁹⁾ Aus Olivenkernen von A. Kiesel, dargestellt.

¹⁰⁾ Aus Kirschgummi von A. Kiesel dargestellt.

¹¹⁾ E. v. Lippmann, Chemie d. Zuckerarten, S. 71 und 134.

¹²⁾ Leider ist es wohl nicht möglich, den gleichen Versuch mit einem garantiert einheitlichen Präparat von Cellulose anzustellen. Jedes Rohmaterial kann neben Cellulose andere Polysaccharide in derselben Art enthalten. Ein aus Kupferoxyd-Ammoniak-Lösung dargestelltes Präparat von Cellulose ist noch weniger anwendbar, da die Cellulose durch dieses Reagens stark verändert wird (s. Pringsheim, Die Polysaccharide, 1923).

¹³⁾ Eine absolute Trocknung ist nicht ratsam.

$2\frac{1}{2}$ Stdn. folgt Verdünnen mit 15 ccm Wasser auf je 1 ccm Säure und 5-stdg. Erwärmen im kochenden Wasserbade, wobei der Tiegel nicht entfernt zu werden braucht. Das zuzufügende Wasser dient zugleich zum Abspülen des Glasstabes, eventuell auch des Tiegels im Falle seiner Entfernung. Der Asbest bleibt in jedem Falle während des Erwärmens in der Lösung und wird später samt dem Ungelösten nach Auffüllen bis zum passenden Volumen abfiltriert. Die klare Flüssigkeit wird direkt oder, wenn nötig, nach Enteisung für eine der bekannten Zucker-Bestimmungen verwendet. Durch Multiplikation mit dem Faktor 0.9 berechnet sich die Cellulose.

b) Die nach einer der üblichen Methoden erhaltene „Rohfaser“ wird in der beschriebenen Weise verzuckert und die Rein-cellulose aus der Glykose-Menge berechnet ($\times 0.9$).

II. Cellulose-haltige Produkte.

Direkte Verzuckerung nach Ia. Abzug der durch Hydrolyse mit 2-proz. Salzsäure erscheinenden Glykose, wenn nötig.

Zur Veranschaulichung der Anwendbarkeit der Verzuckerungs-Methode und zum Vergleich mit anderen Methoden der Cellulose-Bestimmung mögen hier einige Beispiele angeführt werden.

Cellulose-Gehalt in %.

	Rohfaser			Reine Cellulose nach Koenig	Verzuckerungs-Verfahren						
	nach Henneberg und Stohmann		nach F. Schulze		der Rohfaser nach Ia			nach F. Schulze			
	nach Henneberg	nach Stohmann			Rohfaser nach Henneberg und Stohmann	Rohfaser	nach Koenig	Rohfaser	nach Koenig	nach F. Schulze	
Roggenkleie	8.3	8.2	—	3.93	5.70	4.61	—	5.70	2.52		
Kiefernholz	63.4	46.0	36.7	29.5	37.98	30.0	33.2	37.3	37.5		
Frucht von Lappa vulg.	6.1	—	—	—	3.3	—	—	—	3.2		
Maisstengel	—	28.3	—	—	—	—	—	—	—	14.1	
Blatt von Victoria regia	16.8	16.3	16.6	15.2	14.9	16.2	—	15.0	14.6		
Rhizom von Taraxacum off.	—	14.3	—	—	—	—	—	—	13.6	6.30	
Baumwolle	—	—	—	—	—	—	—	—	—	98.44 ¹⁴⁾	
Papier (Packpapier)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	80.45 ¹⁴⁾	

Aus den angeführten Zahlen ist deutlich die Anwendbarkeit der Methode Ia und Ib in allen, der Methode II nur in ganz speziellen Fällen ersichtlich. Nur bei Abwesenheit von in Betracht kommenden Ketosen- und Pentosen-Mengen ist die vereinfachte Methode II anzuwenden.

¹⁴⁾ Direkte Verzuckerung ohne Korrektion.