

Nach dem Umkristallisieren wurde der Stoff von neuem analysiert: 0.2010 g Sbst.: 0.4115 g CO₂, 0.0825 g H₂O. — 0.2000 g Sbst.: 0.4090 g CO₂, 0.0830 g H₂O. — 0.2008 g Sbst.: 10.9 ccm N (23°, 738 mm). — 0.2000 g Sbst.: 10.5 ccm N (21°, 758 mm).

C₉H₉O₄N (Hellersche Formel). Ber. C 55.38, H 4.63, N 7.18.

C₁₁H₁₁O₅N (meine Formel). „ „ 55.69, „ 4.64, „ 5.91.

Gef. „ 55.82, 55.77, „ 4.56, 4.67, „ 5.90, 5.93.

III. Oxydation des *N*-Carbonsäure-äthylesters der *o*-Amino-benzoyl-ameisensäure (C₁₁H₁₁O₅N) mit Kaliumbichromat.

5 g Ester wurden in 250 ccm heißem Wasser gelöst. Zu der bis auf 60° abgekühlten Lösung wurden 2.7 g K₂Cr₂O₇ in 36.25 g 10-proz. Schwefelsäure zugegossen. Diese Mischung wurde ungefähr 1 Stde. bei 60° gehalten und dann 40—50 Min. auf ein siedendes Wasserbad gestellt. Hierbei trat teilweise Verharzung ein. Die heiße Flüssigkeit wurde vom Harz durch Glaswolle abfiltriert, das Harz wurde 3—4-mal mit Wasser ausgekocht und von neuem filtriert. Aus dem Filtrat krystallisierte beim Abkühlen ein weißer Stoff in Form von feinen Nadeln aus; diese wurden 2-mal aus heißem Wasser, dann aus Ligroin und nochmals aus Wasser umkristallisiert. Ausbeute an Anthranilsäure-*N*-carbonsäure-äthylester ca. 1.6 g. Schmp. 126—127°.

0.1696 g Sbst.: 0.3586 g CO₂, 0.0803 g H₂O. — 0.2016 g Sbst.: 12.5 ccm N (17°, 744.5 mm). — 0.2000 g Sbst.: 12.3 ccm N (21°, 740 mm).

C₁₀H₁₁O₄N. Ber. C 57.46, H 5.26, N 6.70. Gef. C 57.66, H 5.26, N 7.01, 6.77.

IV. Bildung von Anilin bei der Destillation des Esters C₁₀H₁₁O₄N mit Kalk.

1 g des Esters C₁₀H₁₁O₄N wurde mit 5 g CaO im Mörser gut verrieben und dann in einem Würtzschen Kolben erhitzt. Hierbei destillierte das entstehende Anilin sehr rasch über. Es wurde in Äther aufgenommen und die Lösung mit geschmolzenem Ätzkali getrocknet. Nach dem Abdestillieren des Äthers ging das Anilin bei 183° über.

Brechungsexponent: $n_D^{21} = 1.5785$; spez. Gew. 1.0190 (21°). — Beim Behandeln mit Furfurol und Essigsäure entstand ein intensiv roter Farbstoff. Beim Einleiten von trocknem Chlorwasserstoff in die Äther-Lösung schied sich salzaures Anilin vom Schmp. 193° ab. Das Chloroplatinat krystallisierte aus Alkohol in gelben Nadeln.

0.1191 g Sbst.: 0.0389 g Pt. — (C₆H₅.NH₂)₂.H₂PtCl₆. Ber. Pt 32.76. Gef. Pt 32.66.

288. Heinrich Kraut und Fritz Eichhorn: Über Hefegummi und über die Reinigung hochmolekularer Verbindungen durch Adsorption.

[Aus d. Chem. Laborat. d. Bayer. Akademie d. Wissenschaften in München.]

(Eingegangen am 28. Mai 1927.)

Die Reindarstellung hochmolekularer Verbindungen, die für die Erforschung ihrer Chemie von größter Bedeutung ist, begegnet bekanntlich ganz besonderen Schwierigkeiten. Chemische Methoden der Reinigung lassen nur dann fremde Begleitstoffe abtrennen, wenn zwischen den Bestandteilen des Gemisches deutliche Unterschiede im chemischen Verhalten bestehen. Aber sie versagen völlig, wenn es sich um die Trennung chemisch indifferenter Stoffe oder sehr nahe verwandter handelt, etwa um die Auflösung eines Gemisches von Eiweißkörpern oder von Polysacchariden. Mit denselben

Schwierigkeiten hat neben anderen die Erforschung der Enzyme zu kämpfen, zu deren Reinigung R. Willstätter mit so großem Erfolg die Adsorption herangezogen hat¹⁾. Wir haben den Versuch unternommen, dieses bewährte Verfahren am Beispiel des Hefegummis auf die Reinigung nicht-enzymatischer, hochmolekularer Verbindungen zu übertragen.

Hierzu ist es vor allem wichtig, einen Maßstab des Erfolges zu besitzen, d. h. das Vorhandensein von Verunreinigungen oder ihre Entfernung feststellen zu können. Bei der Untersuchung über das Adsorptionsverhalten des Invertins haben H. Kraut und E. Wenzel²⁾ einen solchen Maßstab im quantitativen Verlauf der Adsorption selbst aufgefunden. Während für die Adsorption eines einzelnen reinen Stoffes aus verd. Lösung die Beziehung der vom Adsorbens aufgenommenen Mengen zu den in der Lösung verbleibenden durch die Freundlichsche Adsorptions-Isotherme: A.-W. =

$\frac{1}{\alpha \times c^n}$ ausgedrückt wird, wo A.-W. (Adsorptionswert)³⁾ die von 1 g des Adsorbens aufgenommene Menge adsorbierten Stoffes in g, also seine Konzentration im Adsorbat, c die Konzentration des adsorbierten Stoffes in 1 Restlösung nach erfolgter Adsorption bedeutet (α und n sind Konstanten, n ist stets ≥ 1), zeigt die Kurve, welche für einen einzelnen Stoff aus einem Gemisch dieselbe Beziehung zwischen den adsorbierten und den in der Lösung verbleibenden Mengen darstellt, ganz willkürlichen Verlauf⁴⁾.

Für die Reinigung des Hefegummis sind wir von der Annahme ausgegangen, daß sich Beimengungen anderer Stoffe durch die Abweichung der Adsorptionskurve von der normalen Isotherme bemerkbar machen. Das Ziel der Reinigung muß dann die Erreichung der normalen Isotherme sein.

Zur Feststellung der Reinheit bietet das Adsorptionsverhalten noch einen weiteren Anhaltspunkt. Während es für die Aufnahme der Adsorptions-Isotherme eines reinen Stoffes einerlei ist, ob man ihre einzelnen Punkte durch Verdünnen der Ausgangslösung bei gleichbleibender Adsorbensmenge oder durch Wechsel der Adsorbensmenge bei gleicher Anfangs-Konzentration oder durch Variation beider Faktoren bestimmt, ist der Adsorptionsverlauf eines Gemisches sowohl von der Anfangs-Konzentration, als auch von den angewandten Adsorbensmengen abhängig. Derselben Restlösungs-Konzentration entspricht beim Gemisch, im Gegensatz zum Verhalten der reinen Stoffe, keineswegs immer derselbe Adsorptionswert der einzelnen Komponenten. Man kann daher einen reproduzierbaren Adsorptionsverlauf nur nach dem einen der beiden Verfahren erhalten. Wir haben die Adsorptionskurven in der Weise aufgenommen, daß wir eine bestimmte Menge Hefe-

¹⁾ siehe besonders B. 55, 3601 [1922] und B. 59, 1 [1926].

²⁾ Über Enzym-Adsorption I und II (VI. und VII. Abhandl. zur Kenntnis des Invertins von R. Willstätter und Mitarbeitern), Ztschr. physiol. Chem. 133, 1 [1924] und 142, 71 [1925]; ferner Habilitat.-Schrift von H. Kraut, München 1925.

³⁾ H. Freundlich (Capillarchemie, 2. Aufl., Leipzig 1922, S. 232ff.) bezeichnet mit „Adsorptionswert“ die Konstante α . In den Willstätterschen Abhandlungen über Enzyme wird aber zum Vergleich verschiedener Adsorptionsmittel die von der Einheit des Adsorbens aufgenommene Menge Adsorbendum als Adsorptionswert bezeichnet. Da unsere ersten Abhandlungen in der Reihe der Willstätterschen über Invertin publiziert sind, schließen wir uns dieser Definition an.

⁴⁾ s. H. Kraut und E. Bauer, Zur Kenntnis des Papains (III. Abhandl. über Enzym-Adsorption), Ztschr. physiol. Chem. 164, 10 [1927].

gummi mit wechselnden Mengen des Adsorbens stets auf dasselbe Volumen brachten und nach Abzentrifugieren des Adsorbats den Hefegummi-Gehalt der Restlösung durch Polarisation bestimmten. Man kann diese Abhängigkeit der Gemisch-Adsorption von der Anfangs-Konzentration als ein Kriterium der Reinheit einer Lösung verwenden: Ist das Ziel der Reinigung erreicht, so muß ein aus anderer Anfangs-Konzentration aufgenommener Punkt trotzdem auf dieselbe Kurve fallen. Unabhängig von der Anfangs-Konzentration müssen die Adsorptionswerte nun durch die Konzentration der Restlösungen eindeutig bestimmt sein.

Beschreibung der Versuche.

Das Ausgangsmaterial unserer Untersuchung war aus Münchner Löwenbräu-Hefe nach dem Verfahren von E. Salkowski⁵⁾ dargestellt, der die Hefe mit heißer 3-proz. Natronlauge zersetzt und den in Lösung gegangenen Hefegummi mit Fehlingscher Lösung fällt. Zur Reinigung der Gummi-Kupfer-Verbindung fällt man sie wiederholt durch Zusatz von Salzsäure und von Natronlauge um; dann löst man den Hefegummi in wenig verd. Salzsäure und fällt ihn mehrmals mit der 5-fachen Menge absolut. Alkohol. Das Produkt ist frei von stickstoff-haltigen Substanzen; es reduziert beim Kochen noch ein wenig Fehlingsche Lösung. Außer dieser Reaktion, die auf mitgerissene Spuren von niedrigen Zuckern deutet, ließ sich mit chemischen Methoden keine Verunreinigung des Hefegummis nachweisen. Das Adsorptions-Verhalten aber war von dem eines einheitlichen Stoffes völlig verschieden und verriet das Vorliegen eines Gemisches mehrerer Substanzen.

Als Adsorbenzien dienten gealtertes Ortho-aluminiumhydroxyd⁶⁾ und mit Salzsäure ausgekochtes Kaolin⁷⁾. Zur Aufnahme der Adsorptionskurven bestimmten wir den Gehalt der Restlösungen durch Polarisation. Dieses Verfahren liefert nur bei völlig reinem Hefegummi richtige Werte der adsorbierten Mengen, da auch die Begleitstoffe optisch aktiv sind. Eine Deutung der Abweichungen von der normalen Isotherme ist darum schwierig; aber zweifellos geht aus den Kurven der Figuren 1 (Adsorption an Tonerde) und 2 (Adsorption an Kaolin) hervor, daß nach Salkowski hergestellter Hefegummi von beträchtlichen Mengen nicht oder anders drehender Stoffe begleitet sein muß, deren Adsorption keineswegs derjenigen des Hefegummis parallel geht. Die Adsorptionskurve an Aluminiumhydroxyd zeigt einen komplizierten Verlauf, in dem sich deutlich zwei Stufen der A.-W.-Steigerung abheben. Die Kaolin-Kurve dagegen ist viel einheitlicher. 86% der angewandten Substanz werden nur mit sehr geringen Adsorptionswerten aufgenommen, sind also schlecht adsorbierbar. Die Adsorptionswerte der restlichen 14% steigen mit wachsender Restlösungs-Konzentration sehr steil an, was auf die Gegenwart gut adsorbierbarer Stoffe schließen läßt.

Es war zu erwarten, daß die Adsorption mit wenig Kaolin schon eine bedeutende Änderung in der Zusammensetzung des Gemisches bringen werde; die Toherde-Adsorption versprach keine günstige Fraktionierung. Wir benutzten daher zur Reinigung die Adsorption mit kleinen Mengen von Kaolin

⁵⁾ B. 27, 497 [1894] und Ztschr. physiol. Chem. 69, 470 [1910].

⁶⁾ R. Willstätter und H. Kraut, B. 56, 1117 [1923], und R. Willstätter, H. Kraut und O. Erbacher, B. 58, 2448 [1925].

⁷⁾ R. Willstätter und K. Schneider, Ztschr. physiol. Chem. 133, 193 [1924], und zwar S. 200.

und kontrollierten jedesmal den Erfolg der Reinigung durch Aufnahme einer Adsorptionskurve an Aluminiumhydroxyd⁸⁾. Nach einmaliger Adsorption mit Kaolin (z. B. 6.5 g Hefegummi mit 150 g Kaolin in 3.25 l Lösung) näherte sich die aus der Restlösung aufgenommene Kurve schon der normalen Isotherme, während aus dem Adsorbat reichliche Mengen reduzierender Zucker mit Ammoniak eluiert werden konnten. Nach zweimaliger Wiederholung dieses Verfahrens mit etwas geringeren Kaolin-Mengen entsprachen die Kurven an Tonerde (Nr. 2 der Fig. 1) und an Kaolin (Nr. 2 der Fig. 2) durchaus der normalen Adsorptions-Isotherme; die logarithmierten Kurven waren gerade.

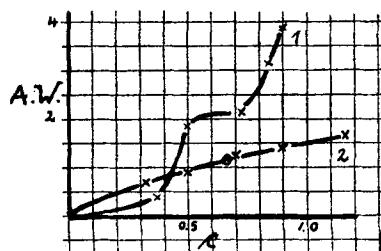


Fig. 1.

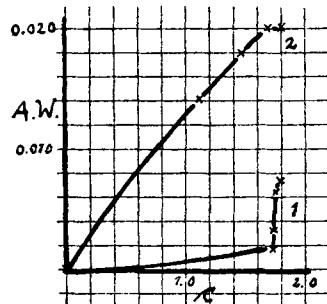


Fig. 2.

Fig. 1. Adsorption von Salkowskischem (Kurve 1) und von gereinigtem (Kurve 2) Hefegummi an Aluminiumhydroxyd.

	angewandte Mengen		Vol.	adsorb.	A.-W.	c
	g Hfg.	g Al ₂ O ₃	ccm	g Hfg.		
Kurve 1	0.100	0.130	100	0.063	0.48	0.37
	0.100	0.026	100	0.050	1.92	0.50
	0.100	0.013	100	0.027	2.08	0.73
	0.100	0.0052	100	0.016	3.08	0.84
	0.100	0.0026	100	0.010	3.85	0.90
Kurve 2	0.100	0.117	50	0.084	0.72	0.31
	0.100	0.078	50	0.075	0.96	0.50
	0.100	0.052	50	0.065	1.25	0.70
	0.100	0.039	50	0.055	1.41	0.90
	0.100	0.026	50	0.042	1.62	1.16
	0.040	0.0052	50	0.006	1.15	0.68

Fig. 2. Adsorption von Salkowskischem (Kurve 1) und von gereinigtem (Kurve 2) Hefegummi an Kaolin.

	angewandte Mengen		Vol.	adsorb.	A.-W.	c
	g Hfg.	g Kaol.	ccm	g Hfg.		
Kurve 1	0.100	7.35	50	0.014	0.0019	1.72
	0.100	4.59	50	0.014	0.0031	1.72
	0.050	1.15	25	0.007	0.0061	1.72
	0.100	1.53	50	0.011	0.0069	1.79
Kurve 2	0.100	2.98	50	0.043	0.014	1.14
	0.100	1.49	50	0.024	0.018	1.45
	0.100	0.77	50	0.015	0.020	1.69
	0.100	0.48	50	0.009	0.020	1.79

⁸⁾ Eine ausführliche Beschreibung aller Präparate findet sich in der Dissertation. F. Eichhorn, München 1925.

Zur Bestätigung der Reinheit des aus der letzten Restlösung mit Alkohol gefällten Hefegummis machten wir nun noch einen Adsorptionsversuch an Tonerde aus der $2\frac{1}{2}$ -fachen Anfangs-Konzentration. Im Gegensatz zu eben solchen Stichproben mit dem unreinen Hefegummi fiel dieser Punkt genau auf die ursprüngliche Kurve (in Fig. 1, Kurve 2, mit o bezeichnet). Dieser Hefegummi ist danach als rein anzusprechen.

Wir erhielten in dem angeführten Beispiel aus 6.5 g Salkowskischem Hefegummi 4.0 g reinen = 61.5 % des angewandten.

Mit dem gewonnenen reinen Material bestimmten wir die optische Aktivität des Hefegummis: 1.00 g wasser-freier Hefegummi drehte im 1.894-dm-Rohr bei $20^\circ + 1.67^\circ$, folglich $[\alpha]_D^{20} = 88.80$.

Die in der Literatur verzeichneten Drehungswinkel liegen zu beiden Seiten dieses Wertes, je nachdem unter den Verunreinigungen die niedriger drehenden Monosaccharide (Glucose und Mannose) oder die höher drehenden Hemi-cellulosen (113.50 ⁹) und das Hefe-Glykogen (226.70 ¹⁰) überwiegen. Von uns nach Salkowskis Methode dargestellte Präparate drehten zwischen 78° und 99° , in der Hauptsache höher als dem richtigen Wert entspricht. Die Angaben der Literatur sind auch deshalb schwer vergleichbar, weil über die Brutto-Zusammensetzung des Hefegummis große Unsicherheit besteht. E. Salkowski⁹) findet 42.12 % C und 6.48 % H, also eine Disaccharid-Formel ($[\alpha]_D = 90.10$); W. Meigen und A. Spreng¹⁰) bestimmten in ihren Präparaten noch mehr Wasser ($[\alpha]_D = 89.60$), während Hessenland¹¹) Werte entsprechend der Formel $C_6H_{10}O_5$ feststellte, aber bei einem Drehungswinkel von 98° .

Es scheint, daß den Forschern die große Hygroskopizität des Hefegummis entgangen ist, so daß sie willkürliche Zwischenwerte der Trocknung zur Analyse und zur Bestimmung der optischen Aktivität verwendeten. Erst nach mehrstündiger Trocknung im Hochvakuum bei der Temperatur des siedenden Acetons erreicht der Gummi konstante Trocknungswerte. Die Zusammensetzung stimmt nun genau auf die Formel $[C_6H_{10}O_5]_n$.

0.3290 g verloren in 3 Std. (Hochvak.; 56°) 0.0325 g $H_2O = 11.0\%$ und nahmen beim Liegen an der Luft 0.0342 g $H_2O = 11.6\%$ auf. Ber. für 1 H_2O auf $C_6H_{10}O_5$ 11.1 %.

0.2478 g Sbst. (trocken): 0.4022 g CO_2 , 0.1359 g H_2O .

$[C_6H_{10}O_5]_n$. Ber. C 44.44, H 6.17. Gef. C 44.27, H 6.14.

Es ist interessant, daß die Analyse über die Anwesenheit von Verunreinigungen keine Auskunft zu geben vermochte. Da die Beimengungen in der Hauptsache aus Polysacchariden bestehen, so fanden wir auch in einem Salkowskischen Präparat genau dieselbe Zusammensetzung von $C_6H_{10}O_5$. Ebensowenig hätte das chemische Verhalten zur Feststellung der Beimengungen dienen können, da sich die anderen Polysaccharide nur durch die zur Darstellung verwendete Fällung mit Fehlingscher Lösung von dem Hefegummi unterscheiden. Durch die Freundlichkeit des Hrn. Prof. E. Schmidt waren wir in der Lage, in seinem Laboratorium die Beständigkeit der reinen und der unreinen Hefegummi-Präparate gegen Chloroxyd prüfen zu lassen. Zwischen beiden zeigte sich kaum ein Unterschied, sie verbrauchten in Parallelversuchen je eine kleine Menge dieses Stoffes. Nur aus dem Adsorptions-Verhalten konnte man erkennen, daß nach Salkowski hergestellter Hefegummi aus einem Gemisch verschiedener Substanzen besteht.

⁹) B. 27, 497 [1894]. ¹⁰) Ztschr. physiol. Chem. 55, 49 [1908].

¹¹) Ztschr. Ver. Deutsch. Zuckerind. 42, 671 [1892].