

197. H. Brintzinger, Kurt Maurer und J. Wallach:
Messungen mit Hilfe der Dialysen-Methode. Untersuchungen über
das Molekulargewicht und den thermischen Abbau des Inulins
und Inulans in wäßriger Lösung.

[Aus d. Chem. Laborat. d. Universität Jena.]

(Eingegangen am 9. Mai 1932.)

Das in vielen Pflanzen die Stärke als Reservematerial vertretende Inulin hat der Forschung noch zahlreiche Fragen zur Beantwortung offen gelassen. So stehen z. B. bezüglich der Molekulargröße des Inulins in wäßriger Lösung so verschiedene Angaben einander gegenüber, daß sich diese Unterschiede nicht lediglich durch die Verschiedenheit des Inulins je nach der Herkunft desselben aus verschiedenen Pflanzenarten erklären lassen. Einige in der Literatur angegebene Werte für das Molekulargewicht des Inulins finden sich in der nachstehenden Aufstellung:

Molekulargewicht	Entsprechend der Zusammensetzung	Autor
etwa 1000	$6. (C_6H_{10}O_5) + H_2O$	Kilian ¹⁾
„ 1134	$7. C_6H_{10}O_5$	Pringsheim u. Fellner ²⁾
„ 2000	$12. (C_6H_{10}O_5) + 2H_2O$	Brown u. Morris ³⁾
„ 2950	$18. (C_6H_{10}O_5) \cdot H_2O$	Düll u. Lintner ⁴⁾
„ 4900	$30. (C_6H_{10}O_5) + 5H_2O$	Tanret ⁵⁾
„ 18000		Jackson u. Mac Donald ⁶⁾
kolloid-dispers		Drew u. Haworth ⁷⁾

Nun ist vor einiger Zeit von H. Brintzinger⁸⁾ eine neue Methode zur Bestimmung des Molekulargewichts in Wasser löslicher Stoffe ausgearbeitet worden, die — gerade im Hinblick auf die außerordentlich verschiedenen Angaben über das Molekulargewicht des Inulins — eine erneute Bestimmung der Molekulargewichte verschiedener Inulin- und Inulan-Präparate, sowie der Abbauprodukte derselben als verlockend erscheinen ließ.

Diese Methode beruht auf der einfachen Beziehung zwischen dem Molekulargewicht M eines Stoffes und dem bei der Dialyse einer Lösung dieses Stoffes gegen das reine Lösungsmittel sich ergebenden Dialysenkoeffizienten λ und einer ebenfalls experimentell zu ermittelnden Konstanten K :

$$M = (K/\lambda)^2.$$

Steht ein Stoff ähnlicher Art mit ähnlichem, aber bekanntem Molekulargewicht M_1 zum Vergleich zur Verfügung, so erhält man das unbekannte Molekulargewicht genauer nach:

$$M = (\lambda_1/\lambda)^2 M_1.$$

Der Dialysenkoeffizient λ eines Stoffes wird bei Anwendung einer beliebigen spezifischen Oberfläche F [spez. Oberfläche = Membranfläche/Volumen d. zu dialys. Lösung] berechnet nach $\lambda = -\frac{1}{F \cdot t} \ln \frac{c_t}{c_0}$, worin c_0 und c_t die Konzentrationen der zu dialy-

¹⁾ A. 205, 145 [1880].

²⁾ A. 462, 231 [1928].

³⁾ B. 24, Ref. 723 [1891].

⁴⁾ Chem.-Ztg. 19, 166 [1895].

⁵⁾ Compt. rend. Acad. Sciences 116, 514 [1893]; Bull. Soc. chim. France [3] 9, 229 [1893] (zitiert nach 4).

⁶⁾ C. 1931, I 1595.

⁷⁾ Journ. chem. Soc. London 130, 2690 [1928].

⁸⁾ Ztschr. anorgan. allgem. Chem. 196, 33 [1931], 168, 145, 150 [1927].

sierenden Lösung nach o bzw. t Stunden Dialysen-Dauer bedeuten. Da wir aus praktischen Gründen stets mit der spezifischen Oberfläche $F = 1$ arbeiteten, vereinfachte sich die Berechnung des Dialysenkoeffizienten zu $\lambda = -\frac{1}{t} \ln \frac{c_t}{c_0}$ bzw. $\lambda = \frac{\log c_0 - \log c_t}{t \cdot \log e}$,
hierin ist e die Basis des natürlichen Logarithmus.

Damit der Dialysenkoeffizient in dieser Weise richtig berechnet werden kann, ist erforderlich, daß die Dialyse unter bestimmten Bedingungen durchgeführt wird, wie Konstanz der Temperatur, völlige Homogenität der zu dialysierenden Lösung während der Dauer der Dialyse und praktische Einhaltung der Konzentration o in der Außenflüssigkeit in Bezug auf den zu dialysierenden Stoff; denn nur unter diesen Voraussetzungen verläuft die Diffusion durch eine Membran nach dem Abklingungsgesetz $c_t = c_0 \cdot e^{-\lambda t}$ ⁸⁾. Die benutzte Apparatur ist früher bereits eingehend beschrieben und abgebildet worden⁸⁾. Als Membran diente Cellophan, Qual. 300. Die Messungen der Konzentrationen erfolgten interferometrisch. Die Konstante K wurde durch Eichung der Membran mit Raffinose, Maltose und Fructose ermittelt.

Die Brauchbarkeit der neuen Methode der Molekulargewichts-Bestimmung wurde zuerst an zahlreichen niedermolekularen Stoffen erprobt, aber auch höhermolekulare Substanzen konnten damit untersucht werden. So ergab die Bestimmung der Ionen-Gewichte höher aggregierter Isopolysäuren gute Resultate. Von größeren organischen Molekülen diente das Tannin als Beispiel, das nach Reinigung mittels der Essigester-Methode E. Fischers und nach Dialyse ein Molekulargewicht von 1780 ergab, während sich für Penta-*m*-digalloyl-glucose 1700 berechnet. Diese guten Resultate veranlaßten H. und W. Brintzinger⁹⁾ zu dem Versuch, den enzymatischen Stärke-Abbau durch alle Phasen hindurch zu verfolgen. Ob allerdings die für die Stärke, sowie deren Spaltprodukte gefundenen hohen Molekulargewichte der Wirklichkeit entsprechen, ist mangels eines genügend großen Vergleichsmaterials bzw. genauer Methoden zur Ermittlung des Molekulargewichtes derart großer Moleküle noch nicht völlig erwiesen. Immerhin stimmt der von Samec¹⁰⁾ osmometrisch gefundene Wert für Stärke von 117000 größenordnungsmäßig überein mit dem von uns beobachteten Wert von 140000. Die im Verlauf des enzymatischen Stärke-Abbaues festgestellten beständigen Zwischenprodukte — gemessen wurde 23000, 3800 und 660 — stehen in guter Übereinstimmung mit den aus Zähigkeitsmessungen durch W. Biltz¹¹⁾ erhaltenen Werten von 22600 und 3700.

Ein ganz besonderer Vorteil der Dialysen-Methode besteht darin, daß den großen Molekülen beigemengte niedermolekulare Verunreinigungen leicht erkannt werden können. Diese veranlassen Inkonzanz der λ -Werte in den ersten Stunden der Dialyse, bis schließlich nach vollständigem Herausdialysieren der kleinen Moleküle die λ -Werte konstant werden. Als Beispiel hierfür sei später das Inulin angeführt.

I. Inulin.

Zur Untersuchung wurden 2 verschiedene Inulin-Präparate verwendet, als erstes ein älteres Präparat „Kahlbaum“, das nach den Angaben von Irvine und Steele¹²⁾ 4-mal gereinigt wurde, sowie ein Inulin „Schuchard“ reinst, das ohne weitere Reinigung benutzt wurde.

Überraschenderweise wurden für beide Präparate wesentlich höhere Micelgewichte gefunden als nach den Literatur-Angaben zu erwarten war,

⁸⁾ Ztschr. anorgan. allgem. Chem. 196, 39 [1931].

¹⁰⁾ Kolloidchemie d. Stärke, S. 466ff. [1927].

¹¹⁾ B. 46, 1532 [1913].

und zwar für das erste Präparat etwa 80000, für das letztere über 100000. Für den Abbau der Inulin-Micelle kommen verschiedene Methoden in Betracht, u. a. die thermische Spaltung durch Erhitzen der wäßrigen Lösung auf 100°, sowie die fermentative Aufspaltung durch Inulase. Auf Grund der Erfahrungen, die H. und W. Brintzinger¹²⁾ bei den entsprechenden Versuchen mit Stärke gewonnen hatten, haben wir von vornherein erwartet, daß beim thermischen Abbau in der Lösung während des Abbaues keine einheitlichen Spaltprodukte, sondern stets ein Gemisch verschiedener großer Moleküle zu finden sein würde. Die thermische Spaltung derartig großer Moleküle scheint nämlich nicht stufenweise so vor sich zu gehen, daß jeweils nur die größten Moleküle angegriffen werden, und die Spaltung der nächstkleineren erst dann erfolgt, wenn alle größeren gespalten sind usw., sondern es hat den Anschein, als ob die zur Spaltung notwendige Energie für die verschiedenen, sehr großen Moleküle nicht sehr verschieden wäre, so daß kleinere Moleküle schon weiter abgebaut werden, so lange die Hydrolyse der größeren noch nicht beendet ist.

Günstiger für das Erhalten einheitlicher Spaltprodukte scheinen die Verhältnisse bei dem enzymatischen Abbau zu liegen. Da der Abbau hochmolekularer Stoffe durch Enzyme so erfolgen dürfte, daß jeweils die größten Moleküle vor den kleineren von dem im kolloiden Zustand sich befindenden Enzym bevorzugt adsorbiert und dann gespalten werden, und daß erst dann die entstandenen kleineren Moleküle angegriffen werden, wenn größere nicht mehr vorhanden sind, besteht die Möglichkeit, bei Anwendung relativ kleiner Enzym-Mengen den Abbau stufenweise so durchzuführen, daß innerhalb bestimmter Zeit-Abschnitte einigermaßen einheitliche Spaltprodukte in der Lösung festgestellt werden können.

Der enzymatische Abbau des Inulins ist bisher von uns noch nicht durchgeführt worden mangels eines geeigneten Inulase-Präparates. Es wird deshalb im folgenden über die Hydrolyse des Inulins in heißem Wasser und die dabei gemachten Erfahrungen berichtet.

Die Hydrolyse des Inulins mit heißem Wasser ohne irgendeinen Zusatz ist unseres Wissens bisher nicht quantitativ verfolgt worden, doch ist die Unbeständigkeit unter den genannten Bedingungen schon öfter betont worden. Ein Vorversuch, in welchem die Spaltung durch Änderung der Drehung und Zunahme des Reduktionsvermögens gemessen wurde, lehrte, daß die Hydrolyse in 30–40 Stdn. praktisch beendet ist. Die erste Tabelle gibt die erhaltenen Werte wieder, der Versuch wurde mehrere Male wiederholt.

I. 2 g Inulin puriss. (Schuchard) wurden zu 100 ccm dest. Wasser gelöst und am Rückflußkühler im siedenden Wasserbade erhitzt. p_H der Lösung = 6.3.

I.			II.		
Zeit in Stdn.	$[\alpha]_D =$	% reduz. Zucker nach Bertrand	Zeit in Stdn.	$[\alpha]_D =$	% reduz. Zucker
0	—36.6°	—	0	—30.0°	—
10	—45.7°	20	10	—37.2°	—
15	—54.0°	38.5	15	—42.2°	33
20	—66.0°	69.0	20	—51.4°	51.6
25	—77.7°	82.5	25	—60.0°	68.0
30	—79.2°	94.0	30	—64.6°	73.6
35	—78.9°	94.0	40	—77.8°	93.6

¹²⁾ Journ. chem. Soc. London **117**, 1474 [1920].

¹³⁾ Ztschr. anorgan. allgem. Chem. **196**, 50 [1931].

II. Derselbe Versuch, wie unter I mit Inulin „Kahlbaum“. 0.50-proz. Lösung; $\text{pH} = 5.8$.

Anschließend wurde die Änderung der Molekulargröße durch Dialyse gemessen, die Tabellen im experimentellen Teil zeigen das Ergebnis. Es ist hervorzuheben, daß keine einheitlichen Zwischenprodukte von meßbarer Lebensdauer bei dieser Art des Abbaues festgestellt werden konnten. Die langsame Abnahme der Molekülgröße läßt aber keinen Zweifel an dem hochmolekularen Charakter des Inulins. Auch diese Versuche wurden mehrere Male mit dem gleichen Resultat durchgeführt. Daß der Endwert der Drehung $[\alpha]_D = -92^\circ$ für reine Fructose-Lösung nicht erreicht wurde, kann verschiedene Gründe haben. Wahrscheinlich verschuldet die Uneinheitlichkeit des Materials diese Abweichung. So konnte beispielsweise von H. H. Schlubach und H. Elsner¹⁴⁾ aus mit Säure hydrolysiertem Inulin Traubenzucker als Pentaacetat herausgearbeitet werden. Pringsheim und Hensel¹⁵⁾, ferner Jackson und MacDonald¹⁶⁾ fanden in den Rückständen der Inulin-Hydrolyse sehr beständige Di-fructose-anhydride, die positive Drehung zeigten. Einigen Versuchen, den etwa vorhandenen Aldose-Gehalt der Endlösung nach Willstätter-Schudel zu bestimmen, kann vorerst kein Vertrauen geschenkt werden, da in Blindversuchen mit geeigneten Mischungen von Fructose und Glucose keine übereinstimmenden Werte erhalten wurden¹⁷⁾. Der Aschengehalt des verwendeten Inulins war sehr gering (gef. 0.025 %); die Analyse zeigte, daß der Berechnung die Formel $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$ zugrunde zu legen war (gef. C 40.02, H 6.8).

Beschreibung der Versuche.

I. Inulin.

Ein Inulin „Kahlbaum“ älterer Herkunft, das nach Irvine und Steele 4-mal gereinigt wurde, sowie ein Inulin „Schuchard“ reinst wurden jeweils zu 0.5-proz. Lösungen gelöst. Die Auflösung erfolgte nach längerem Quellen des Inulins in Wasser von Raum-Temperatur durch Erwärmen der Suspension im Wasserbade auf 45° , wodurch nach kurzer Zeit eine klare Lösung erhalten wurde. Die Lösungen wurden im siedenden Wasserbade belassen; nach bestimmten Zeitabschnitten wurden ihnen Proben entnommen, die nach rascher Abkühlung untersucht wurden, und zwar durch Bestimmung des Dialysenkoeffizienten nach 1 und 3 Stdn., λ_1 und λ_3 , hinsichtlich der etwaigen Einheitlichkeit der vorhandenen Spaltstücke, sowie des mittleren Molekulargewichtes dieser Spaltstücke; außerdem wurden Drehung und Reduktionsfähigkeit nach Bertrand (% reduzierend. Zucker) bestimmt. Der K-Wert der Membran war 3.90. Zur Eichung diente eine Fructose-Lösung.

II. Inulan.

Nachdem die dargelegten Versuche ergeben hatten, daß 1. das Inulin ein hochmolekulares Gebilde ist, 2. daß es sich durch 30–40-stdg. Erhitzen

¹⁴⁾ B. 62, 1493 [1929].

¹⁵⁾ B. 64, 1431 [1931].

¹⁶⁾ Bureau Standards Journ. Research 5, 1151 [1930].

¹⁷⁾ H. Pringsheim, B. 63, 2636 [1930].

Tabelle 1

(Inulin Kahlbaum, gereinigt).

Dauer d. thermisch. Ab- baus Stdn.	λ_1	λ_2	Mittler. Mol.- Gew.	$[\alpha]_D$	Reduzierend. Zucker in %
0	0.018	0.013	67600	—30.0	—
2	0.025	0.019	31400	—31.5	—
4	0.041	0.028	12600	—35.0	—
6	0.044	0.038	9000	—47.1	—
8	0.044	0.044	7800	—48.0	—
10	0.069	0.060	3600	—	—
12	0.089	0.084	2100	—59.0	—
14	0.111	0.097	1400	—65.0	—
16	0.125	0.113	1070	—65.0	33.2
18	0.154	0.142	694	—68.0	—
20	0.180	0.165	514	—68.0	51.6
24	0.226	0.213	317	—	68.0
32 ¹⁸⁾	0.298	0.288	177	—70.0	93.6

Tabelle 2

(Inulin Schuchard, puriss.).

Dauer d. thermisch. Ab- baus Stdn.	λ_1	λ_2	Mittler. Mol.- Gew.	$[\alpha]_D$	Reduzierend. Zucker in %
0	0.009	0.009	164000	—38.2°	—
6	0.017	0.016	49000	—45.0°	—
9	0.039	0.035	9700	—	—
12	0.063	0.057	3700	—	18.0
15	0.089	0.082	1800	—	—
18	0.135	0.126	780	—61.0°	47.5
21	0.183	0.176	410	—	—
24	0.216	0.216	301	—	—
27	0.244	0.242	224	—	—
30	0.275	0.271	178	—78.2°	96.0
34	0.273	0.273	178	—80.0°	97.0

in rein wäßriger Lösung quantitativ zu Fructose hydrolysieren läßt, wie durch Bestimmungen des Molekulargewichtes, der zunehmenden Reduktionskraft und der sinkenden Drehung nachgewiesen wurde, erfolgte eine Paralleluntersuchung des Inulans, das als Depolymerisationsprodukt des Inulins aufgefäßt wird. Es besitzt die gleiche Drehung wie das Inulin, die gleiche

¹⁸⁾ Bei allen Abbaueversuchen mit dem älteren Präparat Kahlbaum wurden in der Endlösung keine konstanten λ -Werte erhalten. Das Präparat scheint demnach eine Verunreinigung zu enthalten, die nicht, bzw. nicht zu einem Monosaccharid, abgebaut wird.

Kinetik der Ferment-Spaltbarkeit und ist erstmalig auf direktem Wege aus Inulin durch H. Vogel¹⁹⁾ dargestellt worden. Wir stellten es nach der Vorschrift von Vogel her — Erhitzen von Inulin in der 5-fachen Menge Glycerin im Vakuum auf 90–95° — und untersuchten es genau wie das Inulin. Die zu Beginn der Dialyse für das sorgfältig gereinigte Inulan erhaltenen Werte für λ waren verhältnismäßig hoch gegenüber den beim Inulin gefundenen λ -Werten, aber viel kleiner als sie bei den in der Literatur für das Molekulargewicht von Inulan angegebenen Werten hätten ausfallen müssen. Schon nach etwa 2–3-stdg. Dialysen-Dauer stellte sich Konstanz der Dialysenkoeffizienten ein — sofern zur Berechnung nicht von der dem Beginn der Dialyse entsprechenden Konzentration c_0 ausgegangen wurde, sondern wenn die nach 2 bzw. 3 Stdn. sich einstellende Konzentration als c_0 eingesetzt wurde, mit anderen Worten, wenn der der Ausrechnung zugrunde gelegte Dialysen-Beginn erst auf 2 oder 3 Stdn. nach dem eigentlichen Beginn der Dialyse gelegt wurde. Dann waren die beigemengten kleineren, rasch diffundierenden Moleküle (Glycerin, Alkohol) im wesentlichen entfernt. Die so gefundenen Dialysenkoeffizienten entsprachen nun praktisch einem Molekulargewicht, wie es für das zur Herstellung des Inulans verwendete Inulin gefunden worden war. Eine Depolymerisation war demnach durch den Glycerin-Abbau überhaupt nicht eingetreten. Die kryoskopische Molekulargewichts-Bestimmung zeigte ein scheinbares Molekulargewicht von 680, während Vogel²⁰⁾ Werte von 389, 354, 366 angibt.

Diese niedrigen Molekulargewichte und die auf sie zurückzuführende Annahme einer Aufspaltung des Inulins durch den Glycerin-Abbau zu dem niedrigmolekularen Inulan sind, worauf schon E. Berner²¹⁾ hingewiesen hat, nur vorgetäuscht durch hartnäckig anhaftende Reste von Lösungsmitteln von sehr niedrigem Molekulargewicht, wie Glycerin und Alkohol.

Der thermische Abbau des Inulans verläuft ähnlich wie der des Inulins, er dauert ein klein wenig länger als dieser und führt wie dieser letzten Endes zu Fructose. Infolge der dem Inulan anhaftenden Lösungsmittelreste sind die λ -Werte, auch der Endlösung, und damit auch die daraus errechneten Molekulargewichte kleinen Schwankungen unterworfen.

Folgende Tabelle gibt Auskunft über die Hydrolyse des Inulans in heißem Wasser. 0.50-proz. Lösung. Erhitzen im siedenden Wasserbade am Rückflußkühler.

Zeit in Stdn.	$[\alpha]_D =$	% reduzierend. Zucker nach Bertrand
15	—40.0°	16 %
20	—45.6°	22 %
25	—53°	40.4 %
30	—59°	64 %
35	—68.5°	80 %
40	—75.8°	92 %
45	—77°	97 %

¹⁹⁾ H. Vogel, B. 62, 2980 [1929].

²⁰⁾ B. 62, 2980 [1929].

²¹⁾ B. 64, 842 [1931]; siehe auch J. R. Katz u. A. Weidinger, Rec. Trav. chim. Pays-Bas 50, 1133 [1931].

Ta-
K-Wert der

Dauer des ther- misch. Abbaus Std.	c_0	c_1	c_2	c_3	$\lambda_1 =$ $\frac{\log c_0 - \lg c_1}{1. \log e}$	M aus λ_1
0	1435	1404	1383	1367	0.022	35500
10	1420	1380	1348	1321	0.029	20500
15	1440	1376	1324	1280	0.046	8100
20	1452	1351	1269	1199	0.073	3200
25	1465	1303	1171	1064	0.119	1200
30	1472	1230	1041	881	0.183	510
35	1505	1172	921	729	0.255	260
40	1537	1155	867	—	0.291	203
45	1535	1126	828	608	0.316	173
50	1532	1130	832	601	0.310	179
55	1548	1142	839	603	0.310	179

198. Helmuth Scheibler: Über die Einwirkung von Natriumalkoholat auf Säure-ester, über Ester-Kondensation und Substitutions-Reaktionen der Metallverbindungen der Säure-ester (XIV. Mitteil. über die Metallverbindungen der Enol-Formen von Mono-carbonylverbindungen).

[Aus d. Organ. Laborat. d. Techn. Hochschule Berlin.]

(Eingegangen am 11. Mai 1932.)

F. Adickes¹⁾ hat kürzlich auf meine Ausführungen über die Anlagerung von Natriumalkoholat an Säure-ester²⁾ erwidert, die ich vor 5 Jahren im Anschluß an eine Untersuchung „Zur Kenntnis der Essigester-Kondensation“ gemacht hatte. Er hat sich der Mühe unterzogen, „45 Äthylester der aller-
verschiedensten Konstitutionen“ daraufhin zu untersuchen, ob sie befähigt sind, „mit alkohol-freiem Natriumäthylat in ätherischer Suspension stabile Anlagerungsverbindungen zu bilden“³⁾, oder vielmehr, ob solche Anlagerungsverbindungen isolierbar sind. Nach seinen Untersuchungen trifft dies nur für eine verhältnismäßig geringe Zahl von Estern (Ameisensäure-ester, Oxalsäure-ester, Trifluor-essigsäure-ester und die α -Ketosäure-ester) zu. Eine Abhängigkeit der Anlagerungsfähigkeit von der Konstitution konnte er nicht festzustellen.

Diese Frage scheint mir weniger wichtig zu sein, als die Untersuchung der verschiedenartigen Reaktionsfähigkeit von Natriumäthylat mit Säureestern. Hierüber enthält die ausführliche Experimental-untersuchung von Adickes nur wenige Angaben, da sie sich auf die Einwirkung von Natriumäthylat auf die ätherischen Lösungen der Ester bei Zimmer-Temperatur beschränkt. Der Augenschein lehrt schon ein auffallendes Nachlassen der Reaktionsfähigkeit vom Ameisensäure-ester zum Essigester und weiterhin zum Propionsäure-ester und zum Isobuttersäure-ester. Deshalb ist es nicht

¹⁾ B. 65, 522 [1932].

²⁾ H. Scheibler u. E. Marhenkel, A. 458, 9 [1927].

³⁾ Journ. prakt. Chem. [2] 133, 305 [1932].