

238. Karl Myrbäck und Elsa Leissner: Zuckerbestimmungen mittels Kupferacetats.

[Aus d. Organ.-chem. Institut d. Universität Stockholm.]

[(Eingegangen am 14. November 1942.)]

Die Zucker, welche stark alkalische Kupfer-Lösungen (Fehlingsche Lösung) reduzieren, zeigen auch eine mehr oder weniger ausgesprochene Wirkung gegenüber schwach sauren Kupferacetat-Lösungen. C. T. Barfoed¹⁾ fand, daß dabei ein wesentlicher Unterschied besteht zwischen Monosacchariden, z. B. Glucose einerseits und Disacchariden z. B. Maltose andererseits, indem die Ausfällung von Kupferoxydul im Glucoseversuch viel früher einsetzt. Die Ausfällung ist im Glucoseversuch unter geeigneten Bedingungen fast vollendet, wenn im Maltoseversuch erst Spuren von Oxydul ausgeschieden sind. Hierdurch ist eine Möglichkeit gegeben, jedenfalls halbquantitativ Mono- von Disacchariden zu unterscheiden. Über die Anwendbarkeit des Verfahrens haben sich später verschiedene Forscher geäußert; im allgemeinen wurden dabei Glucose und Maltose verglichen.

Bei Versuchen über die Spaltung der Stärke haben wir nach Methoden gesucht, die eine Unterscheidung von Glucose, Maltose und höheren Sacchariden ermöglichen sollten. Da die Stärke nicht unbeträchtliche Mengen von α -glykosidischen 1.6-Bindungen enthält, mußte auch untersucht werden, wie sich Zucker vom Typus der Isomaltose verhalten. Dabei wurde u. a. beobachtet, daß sich diese bei der Bestimmung mit dem Barfoedschen Reagens anders verhalten als die Maltose.

Das ursprüngliche Barfoedsche Reagens (Kupferacetat in sehr verdünnter Essigsäure) ist schon aus dem Grunde für genauere Arbeit wenig geeignet als die Essigsäure während der Erhitzung teilweise verdampft. Später wurde deshalb oft Milchsäure statt Essigsäure angewendet. Wir haben die Essigsäure durch einen starken Acetat-Essigsäure-Puffer ersetzt und die Erhitzung in siedendem Wasserbade unter Rückflußkühlung vorgenommen.

Noch bei p_H 5 ist in den Glucoseversuchen die Reduktion sehr stark, in saurer Lösung nimmt sie ab um bei p_H 4 aufzuhören (Tafel 1).

Die bei der Maltose oftmals beobachtete sehr schwache Reduktion ist nun für Disaccharide überhaupt nicht charakteristisch. Vielmehr zeigt sich, daß z. B. die Melibiose das Reagens fast so stark reduziert wie die Glucose (Abbild. 1). Langsam reduziert außer der Maltose auch die Lactose. Schnell reduziert, wie erwähnt, die Isomaltose²⁾ die durch Reversion aus Glucose dargestellt wurde, und die auch durch enzymatische Spaltung oder Säurehydrolyse³⁾ von Stärke gewonnen werden kann. In den Fällen, die bisher geprüft werden konnten, zeigt sich, daß die 1.4-Zucker schwach, die 1.6-Zucker stark reduzieren. Die Substitution in 6-Stellung hat also, wie ja auch erklärlich ist, einen geringeren Einfluß auf das Verhalten eines Zuckers als die Substitution in der 4-Stellung. Die vollständig substituierte 2.3.4.6-Tetramethyl-glucose reduziert bei p_H 5.7 Kupferacetat überhaupt nicht, was auffallend ist, da sie Fehlingsche Lösung zwar langsamer als Glucose, aber ausgiebig reduziert⁴⁾. In der stark alkalischen Kupfer-Lösung tritt also

¹⁾ Lehrb. d. qualit. org. Analyse, Kopenhagen 1881.

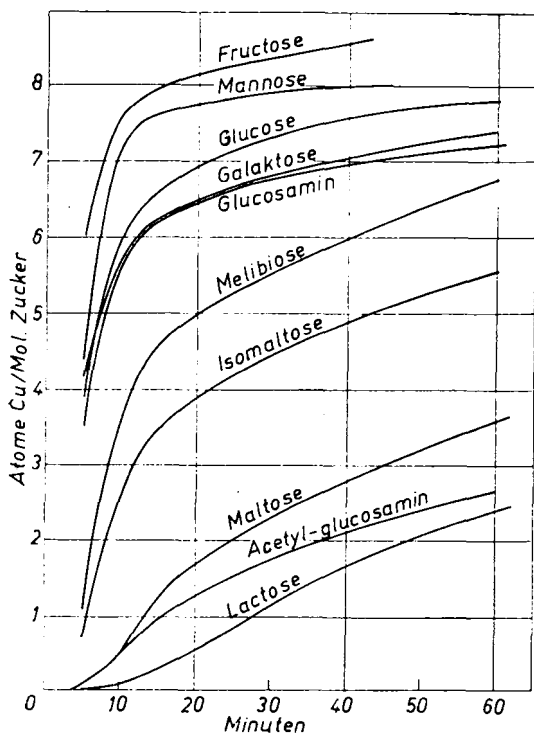
²⁾ K. Myrbäck, Svensk kem. Tidskr. **53**, 264 [1941].

³⁾ K. Ahlborg u. K. Myrbäck, Biochem. Ztschr. **308**, 187 [1941].

⁴⁾ K. Myrbäck u. E. Gyllensvärd, Svensk kem. Tidskr. **53**, 461 [1941].

allmählich der weitgehende Zerfall des Methylzuckers ein, der eine Voraussetzung für die Reduktion der „Cu-Lösung“ ist. In saurer Lösung bleibt dieser Zerfall aus, und es tritt keine Reduktion ein, obgleich an sich eine

„reduzierende Gruppe“ vorhanden ist. Eigentümlich ist in diesem Zusammenhang, daß z. B. die Diaceton-*D*-mannose, die auch eine unbesetzte 1-Stellung besitzt, nicht einmal Fehlingsche Lösung reduziert. Ein Zerfall des Zuckermoleküls tritt in diesem Falle auch nicht in alkalischer Lösung ein.



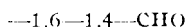
Abbild.

Bei der modifizierten Barfoed-Bestimmung (pH des Puffers 5.7) reduzieren die verschiedenen Zucker bei langem Erhitzen 6–9 Atome Cu. Die entsprechende Zahl für die Bertrand-Bestimmung ist rund 6. Dies bedeutet, daß auch in saurer Lösung ein sehr weitgehender Zerfall des Zuckers eintritt. Vergleicht man die Monosaccharide untereinander, so findet man schon gewisse Unterschiede: Die Hexosen reduzieren z. B. stärker als die Pentosen (Tafel 2). Besonders Interesse verdient das Verhalten des Glucosamins. Das freie Glucosamin reduziert Fehlingsche Lösung genau so stark wie die Glucose⁴⁾;

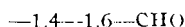
dagegen verhält es sich bei der Bestimmung mit Hypojodit nach Willstätter-Schudel gar nicht wie eine Aldose. Es verbraucht dabei 6–8 Atome Jod, zerfällt mit anderen Worten weitgehend. Das *N*-Acetyl-glucosamin verhält sich dagegen gegenüber Hypojodit wie eine normale Aldose; es wird zur Glucosaminsäure oxydiert. Dagegen reduziert das *N*-Acetyl-glucosamin die Fehlingsche Lösung nur ganz langsam, vielleicht in dem Maße wie die Acetylgruppe abgespalten wird. Die Substitution der Aminogruppe durch die Acetylgruppe stabilisiert also das Molekül, so daß die für die Kupferreduktion notwendige tiefgreifende Umwandlung verlangsamt wird. Dies zeigt sich auch im Verhalten gegenüber dem Kupferacetat-Reagens: Freies Glucosamin reduziert ungefähr wie die Glucose, *N*-Acetyl-glucosamin nur sehr langsam (Tafel 2).

Es ist nach dem obigen möglich, mittels des Kupferacetat-Reagens festzustellen, ob ein Disaccharid eine 1.4- oder eine 1.6-Bindung enthält, unter der Voraussetzung, daß man nur zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu wählen hat. Von größerem Interesse wäre, wenn es gelänge, durch das Reagens festzustellen, ob in einem Saccharid mit sowohl 1.4- als auch 1.6-Bindungen, z. B. in einem Stärkengrenzextrin, die Glykosidbindung, die den reduzierenden Glucoserest bindet (im folgenden die „erste Bindung“ genannt!) der einen oder anderen Art ist. Selbstverständlich ist nicht zu erwarten, daß man in dieser Weise etwas über die anderen Bindungen erfahren kann. Wenn man z. B.

nach Methylieren und Hydrolyse eines Trisaccharids je ein Mol. Tetramethyl-2.3.6-Trimethyl- und 2.3.4-Trimethyl-glucose isoliert⁵⁾, so weiß man, daß das Trisaccharid eine Maltose- und eine Isomaltosebindung enthält, dagegen nicht, ob das Trisaccharid die Formel (I) oder (II) hat. Findet man nun, daß das Trisaccharid die Barfoedsche Lösung ebenso langsam reduziert wie die Maltose, so muß man schließen können, daß es die Formel I hat. Reduziert es fast so schnell wie Glucose, so hat es die Formel II.



I.



II.

Eine Anzahl von Stärkeabbauprodukten wurde nun untersucht:

a) Durch Säurehydrolyse gewonnene Präparate.

Ein früher beschriebenes Produkt³⁾ mit dem (aus der Reduktion von Hypojodit berechneten) Mol.-Gew. 395 (Nr. 1): Die niedrige Hydrolysenkonstante und die niedrige spezif. Drehung (+100°) zeigt, daß das Präparat Isomaltosebindungen enthält. Nach Methylierung konnte durch Vakuumdestillation methylierte Isomaltose abgetrennt werden. Die Reduktion von Kupferacetat (Tafel 2) deutet an, daß auch in dem Trisaccharid die erste Glykosidbindung eine Isomaltosebindung ist.

Ein Produkt³⁾ mit dem Mol.-Gew. 540 (Nr. 2): Die normale Hydrolysekonstante und die normale spezif. Drehung (+156°) zeigen, daß die Substanz nur Maltosebindungen enthält. Die Substanz besteht also hauptsächlich aus Maltotriose. Gegenüber dem Barfoedschen Reagens verhält sich auch die Substanz genau wie Maltose (Tafel 2).

b) α -Dextrine.

Mit Dextrinogenamylase aus Kartoffelstärke⁶⁾ erhaltenes Produkt, Mol.-Gew. 1250 (Nr. 3): Die Spaltbarkeit durch Amylasen⁷⁾ zeigt, daß die Substanz fast normal gebaut sein muß. Sie enthält also fast nur Maltosebindungen. Im Versuch mit Kupferacetat verhält sie sich auch fast wie die Maltose.

Ähnliches Produkt mit dem Mol.-Gew. 975 (Nr. 4): Wird enzymatisch vollständig in Maltose zerlegt⁷⁾. Enthält nur Maltosebindungen. Reduziert Kupferacetat wie Maltose.

c) Mit Malzamyase erhaltene Grenzdextrine.

Alle enthalten Isomaltosebindungen, deren Lage im Molekül jedoch nicht bekannt ist.

Ein Grenzdextrin aus Maisstärke, unter der Bezeichnung MM IV früher beschrieben⁸⁾ (Nr. 5): Mol.-Gew. nach der Reduktion 680, nach Diffusionsversuchen 650. Ziemlich einheitliches Tetrasaccharid. Die Versuche mit Kupferacetat zeigen, daß die erste Bindung eine Maltosebindung ist.

⁵⁾ K. Myrbäck u. K. Ahlborg, *Biochem. Ztschr.* **307**, 69 [1941].

⁶⁾ B. Örtenblad u. K. Myrbäck, *Biochem. Ztschr.* **307**, 123 [1941].

⁷⁾ K. Myrbäck, *Biochem. Ztschr.* **307**, 132 [1941].

⁸⁾ B. Örtenblad u. K. Myrbäck, *Biochem. Ztschr.* **303**, 335 [1940].

Gleichartiges Dextrin, unter der Bezeichnung MM Vb beschrieben⁸⁾ (Nr. 6): Mol.-Gew. 600. Die Versuche zeigen, daß auch hier die erste Bindung eine Maltosebindung sein muß.

Gleichartiges Dextrin, unter der Bezeichnung MM Vi beschrieben⁸⁾ (Nr. 7): Mol.-Gew. nach der Reduktion 520, nach Diffusionsversuchen 540. Umfraktioniert; fast einheitliches Trisaccharid mit einer Maltose- und einer Isomaltosebindung. Die Versuche mit Kupferacetat zeigen, daß auch hier die erste Bindung eine Maltosebindung ist. Das Trisaccharid hat also die Formel (I).

Ein Grenzdextrin aus Arrowstärke (Nr. 8): Mol.-Gew. 760. Wird ebenso langsam oxydiert wie die Maltose, die erste Bindung ist eine Maltosebindung.

Ein Grenzdextrin aus Kartoffelstärke (Nr. 9): Mol.-Gew. 575. Wird genau so oxydiert wie die Maltose; erste Bindung eine Maltosebindung.

Gleichartiges Dextrin aus Kartoffelstärke (Nr. 10): Mol.-Gew. 600. Verhält sich wie Nr. 9.

d) Mit Takadiastase erhaltene Grenzdextrine.

Alle enthalten, soweit wir wissen, Isomaltosebindungen.

Ein Grenzdextrin aus Gerstenstärke, Mol.-Gew. 800 (Nr. 11): Wird ganz langsam oxydiert, woraus wir schließen können, daß die erste Bindung in fast allen Molekülen eine Maltosebindung ist.

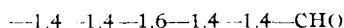
Gleichartiges Grenzdextrin, Mol.-Gew. 520 (Nr. 12): Verhält sich genau wie Nr. 11.

Ein aus Arrowstärke gewonnenes Grenzdextrin (Nr. 13): Umfraktioniert. Mol.-Gew. 500. Ziemlich einheitliches Trisaccharid. Verhält sich, wie die Tafel zeigt, gar nicht wie Maltose, sondern wie die Isomaltose. Wir können schließen, daß in diesem Falle das Trisaccharid die Formel II hat.

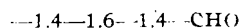
Die Grenzdextrine, die Trisaccharide sind, sind wahrscheinlich erst sekundär durch die Wirkung dextrinspaltender Fermente aus den primär entstandenen Grenzdextrinen hervorgegangen⁹⁾. Das primäre Grenzdextrin hat vielleicht vier oder sechs Glucoseeinheiten; Hexasaccharide kommen meistens sehr reichlich unter den Grenzdextrinen vor. Sie werden, wie die Grenzdextrine überhaupt, gebildet, weil die gewöhnlichen Amylasen nur normale, d. h. nach dem Maltosetypus gebaute Ketten in Maltose zerlegen. Es ist also anzunehmen, daß in den primären Grenzdextrinen die anomale Bindung etwa in der Mitte liegt, so daß z. B. ein Hexasaccharid die schematische Formel III und ein Tetrasaccharid die Formel IV hat. Die Formel IV könnten z. B. die oben unter Nr. 5, 6 und 10 beschriebenen Dextrine haben. Durch Abspaltung von Glucose oder unter Umständen auch von Maltose können aus Tetra- bzw. Hexasacchariden dieser Art Trisaccharide vom Typus I bzw. II entstehen, je nachdem, ob das dextrinspaltende Ferment die erste bzw. zweite oder die dritte bzw. vierte Bindung löst. Daß die dextrinspaltenden Fermente in verschiedenen Amylasepräparaten nicht überall identisch sind, ist bekannt⁹⁾. Deshalb erklärt sich, daß z. B. ein von Malzamyase erzeugtes Trisaccharid

⁹⁾ K. Myrbäck u. K. Ahlborg, *Biochem. Ztschr.* **311**, 213 [1942].

(Nr. 7) die Formel I, ein von Takaamylase erzeugtes (Nr. 13) dagegen die Formel II besitzt.



III.



IV.

Beschreibung der Versuche.

10 ccm Zucker-Lösung (10—100 mg Glucose entsprechend), 20 ccm Kupferacetat-Lösung (66.5 g kryst. Salz pro l) und 20 ccm 2-n. Nacetat-Essigsäure-Puffer wurden gemischt und erhitzt. Das Cu_2O wurde abfiltriert, gewaschen, in Ferrisulfat-Schwefelsäure nach Bertrand gelöst und mit Permanganat titriert.

Tafel 1.

Reduktion bei verschiedenen Aciditäten des Acetatpuffers. 50 mg Glucose. Auf dem Drahtnetz 5 Min. unter Rückfluß erhitzt.

pH des Puffers	4.05	4.45	4.98	5.31	5.98	6.40	Fehlingsche Lsg.
Atome Cu/Mol. Glucose..	0.90	2.31	5.05	5.32	5.62	5.51	5.40

Tafel 2.

Vergleich verschiedener Kohlenhydrate: 50 mg Glucose bzw. äquivalente Mengen der anderen Zucker. Von den Dextrinen wurde so viel genommen, daß die Reduktion bei der Bertrand-Bestimmung 100 mg Maltosemonohydrat entsprach. pH des Puffers 5.73. Erhitzen unter Rückfluß im siedenden Wasserbade.

	Atome Cu/Mol. Zucker						
	5	10	15	20	30	40	60
Erhitzungszeit in Min.	5	10	15	20	30	40	60
Glucose	3.87	5.99	6.68	6.93	7.35	7.64	7.84
Fructose	6.03	7.68	—	8.22	—	8.59	—
Mannose	4.37	7.04	—	7.82	—	8.01	—
Galaktose	4.13	5.75	6.35	6.59	6.69	7.13	7.42
Xylose	4.69	6.59	6.70	6.82	—	7.06	7.10
Arabinose	2.06	3.96	4.62	5.05	5.78	5.91	6.38
Rhamnose	1.65	4.28	5.05	5.63	—	6.46	7.01
Maltose	0.06	0.54	1.26	1.69	2.24	2.81	3.58
Lactose	0.01	0.07	0.33	0.50	1.09	1.68	2.42
Melibiose	1.06	3.56	4.66	4.90	5.53	6.00	6.85
Isomaltose	0.68	2.61	3.52	3.90	4.49	4.84	5.60
Glucosamin	3.45	6.01	6.33	6.41	6.96	7.09	7.26
Acetylglucosamin	0	0.51	—	1.26	1.80	1.99	2.65
Tetramethylglucose	0	0	—	0	—	0	0
Dextrin Nr. 1	—	—	—	4.48	—	5.73	6.65
Dextrin Nr. 2	—	—	—	2.10	—	3.34	3.84
Dextrin Nr. 3	—	—	—	2.32	—	3.42	4.31
Dextrin Nr. 4	—	—	—	2.29	—	3.63	4.66
Dextrin Nr. 5	—	—	—	1.73	—	3.04	3.89
Dextrin Nr. 6	—	—	—	1.92	—	3.21	4.07
Dextrin Nr. 7	—	—	—	1.96	—	2.95	3.85
Dextrin Nr. 8	—	—	—	1.89	—	3.10	4.02
Dextrin Nr. 9	—	—	—	1.64	—	2.78	3.56
Dextrin Nr. 10	—	—	—	1.79	—	3.02	3.87
Dextrin Nr. 11	—	—	—	2.18	—	3.30	4.32
Dextrin Nr. 12	—	—	—	2.46	—	3.64	4.19
Dextrin Nr. 13	—	—	—	3.32	—	4.56	5.15