

# Über den hydrolytischen Abbau von Inulin zu niedrigeren Polysacchariden und zur Frage des Glukosegehaltes desselben\*

V. Mitteilung: Über Inhaltsstoffe der Zichorie\*\*

Von

**K. Holzer, H. Wittmann-Zinke und A. Zinke**

Aus dem Institut für Organische und Pharmazeutische Chemie der Universität  
Graz

Mit 2 Abbildungen

(Eingegangen am 5. November 1956)

In einer Kurzmitteilung<sup>1</sup> berichteten wir bereits über Untersuchungsergebnisse, die das Vorhandensein von Glukose als Baustein des Inulinmoleküls wahrscheinlich erscheinen lassen. Außerdem wurde auch ein teilweise abgebautes Inulin erwähnt.

Diese Arbeit ergänzt unsere Kurzmitteilung in theoretischer und experimenteller Hinsicht und bringt außerdem weitere Untersuchungsergebnisse, aus denen ziemlich eindeutig hervorgeht, daß Glukose im Inulin eingebaut ist.

In einer Arbeit über „Die Molekular-Komplexität des Inulins“ beschreiben *Drew* und *Haworth*<sup>2</sup> ein durch Einwirkung von Kohlensäure auf eine wäßrige Inulinlösung bzw. von dampfförmigem Äthylchloroform auf Inulinpulver erhaltenes Inulin „Laevulin“, das in kaltem Wasser löslich sein soll; sie geben Molekulargewichte zwischen 900 und 1800 an und einen Drehwert von  $[\alpha]_D^{21} = -45,8^\circ$ . Wir haben schon vor Jahren versucht<sup>3</sup>, die Versuche mit Kohlendioxyd zu reproduzieren, was uns jedoch nicht gelang. Zufällige Anwesenheit von geringen Salz-

\* Herrn Prof. Dr. A. Pongratz zum 60. Geburtstag gewidmet.

\*\* Bisherige Mitteilungen: I: Mh. Chem. 84, 212 (1953); II: 84, 901 (1953); III: 87, 592 (1956); IV: 87, 794 (1956).

<sup>1</sup> K. Holzer, H. Wittmann und A. Zinke, Mh. Chem. 87, 592 (1956).

<sup>2</sup> H. D. K. Drew und W. N. Haworth, J. Chem. Soc. London 1928, 2690.

<sup>3</sup> G. Schmerlaib, Diss. Univ. Graz, 30 (1954).

säuremengen im verwendeten Kohlendioxyd dürften für die Entstehung obigen „Laevulins“, das offenbar mit unserem „Abbauinulin“ identisch ist, verantwortlich gewesen sein; bei Äthylchloroform wurde dies von den Autoren bestätigt.

Durch sehr vorsichtig geleitete Säurehydrolyse läßt sich Inulin zu Produkten einer polymerhomologen Reihe abbauen. Es zeigte sich, daß mit zunehmender Hydrolysedauer die Wasserlöslichkeit der mit Alkohol ausgefällten „Abbauinuline“ zunimmt, der Drehwert stets größere negative Werte ( $-39^\circ$  bis  $-43^\circ$ ) annimmt und die Ausbeute rasch absinkt, da die zunehmenden Fruktose-, Disaccharid- und Oligosaccharidmengen in der Mutterlauge verbleiben (siehe Abb. 1). Eine übersichtliche Darstellung dieser Befunde findet sich in Tabelle 1 und 2.

Tabelle 1. Hydrolyseversuch mit Inulin einer nicht näher bekannten Charge,  $[\alpha]_D^{20} = -35,9^\circ$

Probe- entn. nach Min.	Probe ccm	Alkohol- zusatz ccm	Fällung nach Alkoholzusatz	Ausbeute	$[\alpha]_D^{20-23}$	Löslichkeit im kalten Wasser
5	5	50	sofort	0,88 g = 98%	$-36,9^\circ$	nicht vollst.
10	5	50	„	0,78 g = 87%	$-38,0^\circ$	„ „
15	5	50	„	0,83 g = 92%	$-38,7^\circ$	„ „
20	5	50	„	0,75 g = 83%	$-38,5^\circ$	„ „
25	5	50	„	0,68 g = 76%	$-39,7^\circ$	vollständig
30	10	100	„	1,12 g = 62%	$-40,5^\circ$	„
35	10	100	„	1,01 g = 55%	$-41,5^\circ$	„
40	20	200	leichte Trübung	1,46 g = 40%	$-42,6^\circ$	„
45	25	250	nach längerer Zeit	1,35 g = 30%	$-42,4^\circ$	„
50	50	500	nach längerer Zeit	2,50 g = 28%	$-43,0^\circ$	„

Tabelle 2. Hydrolyseversuch mit Inulin einer anderen Charge

Probe- entn. nach Min.	Probe ccm	Alkohol- zusatz ccm	Fällung nach Alkoholzusatz	Ausbeute	Löslichkeit im kalten Wasser
5	5	50	sofort	0,70 g = 79%	nicht vollst.
10	5	50	„	0,57 g = 63%	„ „
15	5	50	„	0,42 g = 47%	vollständig
20	5	50	schwach	0,26 g = 29%	„
25	5	50	keine sofortige Fällung	0,15 g = 17%	„
30	5	50	„ „ „	0,08 g = 9%	„

Zur weiteren Untersuchung dieser Abbauprodukte, die *Fehlingsche* Lösung reduzieren, wurde eine größere Menge Inulin der Tabelle 2 ver-

wendet und zu Abbauinulin mit 50% Ausbeute hydrolysiert. Versuche, das mittlere Molekulargewicht der erhaltenen, kaltwasserlöslichen Abbauprodukte in wäßriger Lösung auf kryoskopischem Wege zu bestimmen, führten zu überraschend niedrigen Werten: Ein Präparat lieferte die Werte 839 bzw. 765, ein anderes die Werte 975 und 1009. Diese Befunde sprechen für eine mittlere Kettenlänge von 5 bis 6 Fruktoseresten. Wie weit diese Werte der Wirklichkeit entsprechen, bleibt fraglich, da bei unseren Bestimmungen stets auch Substanz ausfror.

In der Annahme, daß Abbauinulin keine einheitliche Substanz ist, sondern eine polymerhomologe Reihe von höheren Abbauprodukten des Inulins darstellt, versuchten wir eine fraktionierte Ausfällung des selben mit zunehmenden Mengen Alkohol aus einem Inulinteilhydrolysat. Wir erhielten drei Fraktionen, deren Drehwert, Molekulargewicht und Wasserlöslichkeit in Tabelle 3 verzeichnet sind:

Tabelle 3. Fraktionierung von Abbauinulin

Reihenfolge der Ausfällung	Menge	$[\alpha]_D^{19}$	MG	Wasserlöslichkeit
Fraktion I . . . . .	4,4 g	— 38,9°	936, 985	
Fraktion II . . . . .	2,7 g	— 39,8°	936, 1081	steigend
Fraktion III . . . . .	3,2 g	— 40,4°	1575, 1475	↓

Während die Zunahme der negativen Drehwerte und die steigende Wasserlöslichkeit eine Abnahme des Molekulargewichtes in Richtung Fraktion I bis III erwarten lassen, weisen die gefundenen Molekulargewichte die entgegengesetzte Tendenz auf. Offenbar sind die in wäßriger Lösung ermittelten Molekulargewichte infolge verschiedener Fehlerquellen nicht zutreffend (eventuell Alkoholgehalt der Substanz, zu geringe Löslichkeit in Wasser und Mitaufrieren von Substanz).

Auf dem Papierchromatogramm ist Abbauinulin auch bei sehr langer Laufstrecke der Vergleichszucker Saccharose und Fruktose kaum von Inulin zu unterscheiden. Es tritt nur eine sehr kurze und kaum bemerkbare Streifenbildung auf, die mit zunehmender Hydrolysedauer stärker wird. Bei sehr lang hydrolysierten Abbauinulinen, die schon an der Grenze der Ausfällbarkeit mit Alkohol liegen, tritt schwach das charakteristische Bild eines Inulinteilhydrolysats auf (Abb. 1), das allerdings nur vom Inulin bis zum Tri- oder Tetrasaccharid reicht. Daraus kann geschlossen werden, daß Abbauinulin ziemlich frei von niederen Oligosacchariden ist und aus Bruchstücken besteht, die sich papierchromatographisch dem Inulin sehr ähnlich verhalten, das heißt, vom Startfleck nicht wegwandern, was etwa von einem Hexa- bzw. Heptasaccharid aufwärts der Fall sein dürfte. Daraus muß man folgern, daß ein Papierchromatogramm

von Inulin wegen dessen Ähnlichkeit mit Abbauinulin kaum zur Feststellung eines etwa stattgefundenen geringen Abbaues bei irgendeinem Prozeß herangezogen werden kann, es sei denn, man vermutet bereits einen teilweisen Abbau bis zur Fruktose oder niedrigeren Oligosacchariden.

Die papierchromatographische Untersuchung der Mutterlauge von Abbauinulinen, die einer Hydrolysenreihe ähnlich der von Tabelle 1 entstammen, zeigt Abb. 1. Man erkennt die stetig zunehmenden Fruktose-

Hydrolysedauer: 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 Min.

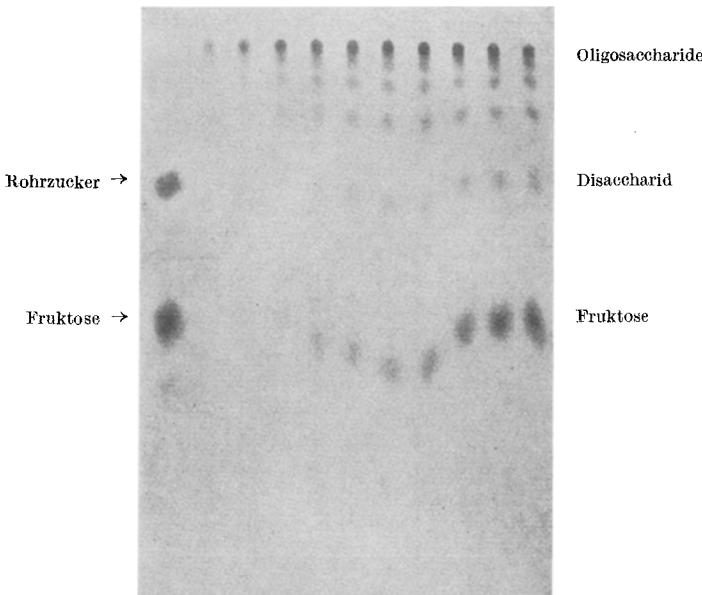


Abb. 1

mengen, während die Oligosaccharide zunächst allmählich anwachsen und im weiteren Verlauf der Hydrolyse wieder auf Kosten der entstehenden Fruktose abklingen.

Beim Aufbewahren ursprünglich klarer, kalt herstellter wäßriger Lösungen von Abbauinulin machten wir die Erfahrung, daß nach einiger Zeit, meistens nach mehrätigem Stehen, Trübung und schließlich Abscheidung von gelöster Substanz eintritt, die jedoch mengenmäßig weit unter der Ausscheidung von Inulin aus wäßriger Lösung nach derselben Zeit liegt. So schied z. B. eine bei 30° hergestellte, klare, 10%ige wäßrige Abbauinulinlösung nach 8tätigem Stehen bei Zimmertemperatur 28% Substanz aus, während die gleiche Menge 10%iger Inulinlösung nach derselben Zeit 93% Inulin ausschied.

In der Literatur finden sich Angaben von namhaften Autoren<sup>4</sup>, wonach kaltwasserlösliches „depolymerisiertes Inulin“, erhalten durch Ausfällung aus Lösungen in Glycerin, Acetamid, Formamid u. dgl., mit Alkohol oder Äther beim Altern Molekülaggregation zeigt, womit das Unlöslichwerden in kaltem Wasser erklärt werden sollte. In zwei Publikationen „Über die vermeintliche Depolymerisation des Inulins“ versucht *Berner*<sup>5</sup> zu zeigen, daß es sich nicht um einen Abbau, sondern lediglich um eine Überführung in den amorphen Zustand handelt, in welchem das Inulin leicht wasserlöslich sein soll; durch Anreiben mit einem Glasstab oder längeres Stehenlassen der Lösung soll sich wieder die kristalline, schwer lösliche Form abscheiden. Untersuchungen des kristallinen ( $\beta$ -) und nach *Berner* dargestellten amorphen ( $\alpha$ -)Inulins im Röntgenlicht wurden von *Katz* und Mitarbeitern<sup>6</sup> durchgeführt. Die kryoskopisch ermittelten tiefen Molekulargewichte (250 bis 1700) sollen nach *Berner* nicht einer Depolymerisation, sondern einem äußerst zähen Festhalten von Lösungsmitteln durch das amorphe Inulin zuzuschreiben sein.

Wir haben amorphes Inulin nach *Berner* durch Ausfällung aus einer heißen, konzentrierten, wäßrigen Lösung mit viel Alkohol dargestellt und dasselbe mit unserem Abbauinulin verglichen. Je 0,2 g der beiden Substanzen wurden mit 2 ccm Wasser bei zirka 30° geschüttelt; während Abbauinulin bereits nach kurzer Zeit klar in Lösung ging, blieb beim amorphen Inulin bei dieser Konzentration ein beträchtlicher Teil als Bodenkörper ungelöst zurück. Wir haben jedoch stets auch die Möglichkeit in Betracht gezogen, daß unser Abbauinulin einen gewissen Anteil an unverändertem, durch die Partialhydrolyse noch nicht erfaßtem Inulin enthält, das nach *Berner* durch die angewandte Fällungsmethode amorph herauskommen müßte. Damit wären in Übereinstimmung mit den von diesen Autoren beschriebenen Eigenschaften des amorphen Inulins die oben beschriebenen teilweisen Ausfällungen aus länger stehenden Abbauinulinlösungen erklärlieh.

Abbauinulin fügt sich auch gut in die von *Schlubach* und *Sinh*<sup>7</sup> aufgestellte Regel ein, nach der in der Inulingruppe mit zunehmender Differenz ( $A - K$ ) zwischen den Drehungen der freien Polyfruktosane ( $A$ ) und denjenigen ihrer Acetylverbindungen ( $K$ ) die Teilchengröße abnimmt. Abbauinulin würde sich mit  $A - K = 39,2 - 31,0 = 8,2$  zwischen

<sup>4</sup> *H. Vogel* und *A. Pictet*, Helv. Chim. Acta **11**, 215 (1928). — *H. Pringsheim*, *J. Reilly* und *P. P. Donowan*, Ber. dtsch. chem. Ges. **62**, 2378 (1929). — *H. Vogel*, Ber. dtsch. chem. Ges. **62**, 2980 (1929). — *H. H. Schlubach* und *H. Elsner*, Ber. dtsch. chem. Ges. **63**, 362 (1930).

<sup>5</sup> *E. Berner*, Ber. dtsch. chem. Ges. **63**, 1356 (1930); **64**, 842 (1931).

<sup>6</sup> *J. R. Katz* und Mitarbeiter, Rec. trav. chim. Pays-Bas **50**, 248, 1133 (1931).

<sup>7</sup> *H. H. Schlubach* und *Q. Ketu Sinh*, Ann. Chem. **544**, 114 (1940).

dem Inulin und Asparagosin in seiner Tabelle<sup>8</sup> einordnen. Die Teilchengröße würde mit 18 bis 19 (siehe nachfolgende Molekulargewichtsbestimmungen) ungefähr der des Asparagosins *Schlubachs* (20) entsprechen.

Infolge der guten Löslichkeit von Abbauinulin in Pyridin gelang dessen Acetylierung mit Acetanhydrid bei Zimmertemperatur überraschend leicht in einer Ausbeute bis zu 95% d. Th. Nach mehrmaliger Reinigung durch Umfällung aus Aceton-Eiswasser hatte das Produkt einen Drehwert von  $[\alpha]_D^{23} = -31^\circ$  in Chloroform und einen Acetylgehalt von 44,8%. Während der Acetylwert mit dem für ein Triacetat berechneten von 44,8% übereinstimmt, liegt der Drehwert um ein geringes niedriger, als in der Literatur für Triacetylinulin angegeben ist ( $-32^\circ$  bis  $-34^\circ$ ). Molekulargewichtsbestimmungen unseres acetylierten Abbauinulins in Benzol ergaben die Werte 5200 bzw. 5500, was einem Molekulargewicht von zirka 3000 beim Abbauinulin entspricht.

Die vollständige Methylierung von Abbauinulin führten wir nach der Vorschrift von *Haworth* und *Streight*<sup>9</sup> für Inulin durch. Das Triacetat wird in Aceton gelöst, bei zirka  $50^\circ$  mit Dimethylsulfat und Natronlauge in die Trimethylverbindung übergeführt. Obwohl die Rohausbeuten mit etwa 90% d. Th. sehr gut liegen, sind doch die Verluste bei der darauf folgenden Reinigung, vor allem beim Umfällen aus Alkohol-Wasser ziemlich groß, weil offenbar die Wasserlöslichkeit der methylierten Verbindung nicht ganz unbedeutend ist.

Für gereinigtes Trimethylabbauinulin fanden wir einen Drehwert von  $[\alpha]_D^{23} = -53,5^\circ$ ; er differiert also um  $1,5^\circ$  vom Methylinulin ( $-55^\circ$ ). Die Methoxylbestimmung ergab 43,2% Methoxyl; der berechnete Wert für die vollmethylierte Verbindung beträgt 45,6%. Nach der Nachmethylierung mit Methyljodid und Silberoxyd<sup>10</sup> stieg der Methoxylgehalt auf 45,9% an, während der Drehwert gleich blieb. Molekulargewichtsbestimmungen von Methylabbauinulin in Benzol ergaben die Werte 4351, 3355 und 4226, im Mittel 3977; dem würde ein Molekulargewicht des Abbauinulins von 3150 entsprechen, was in guter Übereinstimmung mit dem Wert 3000 steht, der sich bei der Umrechnung von Molekulargewichtsbestimmungen von Acetylabbauinulin ergibt. Hieraus errechnet sich im Gegensatz zu den Molekulargewichtsbestimmungen des Abbauinulins in Wasser eine mittlere Kettenlänge von 18 bis 19 Fruktoseresten für dieses Abbauprodukt.

Bei der Hydrolyse des Methylabbauinulins fanden wir papierchromatographisch als Hauptmenge Trimethylfruktose, dann noch Tetramethylfruktose und auch Dimethylfruktose. Die Auftrennung des

<sup>8</sup> *H. H. Schlubach* und *H. Müller*, Ann. Chem. **578**, 200 (1952).

<sup>9</sup> *W. N. Haworth* und *H. R. L. Streight*, Helv. Chim. Acta **15**, 609 (1932).

<sup>10</sup> *T. Purdie* und *J. C. Irvine*, J. Chem. Soc. London **83**, 1028 (1903).

Gemisches der verschiedenen hoch methylierten Fruktosen, das bei der Hydrolyse von nach *Haworth* und *Streight* dargestelltem Trimethylabbauinulin (43,2%  $\text{OCH}_3$ ) anfällt, auf Kieselgelsäulen nach *Schlubach*<sup>11</sup> verlief sehr zufriedenstellend. Wir isolierten Di-, Tri- und Tetramethylhexosen aus 0,6 g Trimethylabbauinulin im Milligrammverhältnis von 97,0 : 450,6 : 54,6. Die Auftrennung des Hydrolysats von mit Methyljodid und Silberoxyd nachmethyliertem Methylabbauinulin (45,9%  $\text{OCH}_3$ ) ergab aus 0,3 g ein Milligrammverhältnis von 29,7 : 217,5 : 20,1. Auf dem Papierchromatogramm zeigte sich, daß die Dimethylhexosenfraktion ein Gemisch von 3,4-Dimethylfruktose und Trimethylglukose darstellt, was auch aus dem Drehwert ( $-14^\circ$ ; 3,4-Dimethylfruktose  $-44^\circ$  bei  $c = 1$  in Wasser<sup>12</sup>) hervorgeht. Die Titration dieser Fraktion nach *Willstätter* und *Schudel* auf Aldosen ergab die Anwesenheit von 33,3% Trimethylglukose. Demnach beträgt das Milligrammverhältnis von 3,4-Di- : 3,4,6-Tri- : 1,3,4,6-Tetramethylfruktose : Trimethylglukose = = 64,7 : 450,6 : 54,6 : 32,3 oder umgerechnet auf die freien Zucker 56 : 365 : 41,5 : 26,2. Daraus ergibt sich, daß im Abbauinulin auf zirka 18 Fruktosereste 1 Glukoserest käme, das sind zirka 5,3% Glukose. Bei der papierchromatographischen quantitativen Bestimmung des Glukosegehaltes des Abbauinulins und dessen Mutterlauge wurden in ersterem 2%, in letzterer 2,8% Glukose (bezogen auf Trockensubstanz) gefunden. Seinerzeit fanden wir im Inulin 2,5 bis 3% Glukose<sup>13</sup>, das heißt, das Abbauinulin und die Mutterlaugenprodukte weisen denselben Glukosegehalt wie der Ausgangsstoff auf. Dies kann eine weitere Stütze für die Annahme sein, daß die Glukose im Inulinmolekül eingebaut ist. Der bei der Hydrolyse von Trimethylabbauinulin oben erhaltene Glukosewert (5,3%) ist dem gegenüber zu hoch; der Glukoseüberschuß stammt wahrscheinlich von der durch Epimerisation von 3,4,6-Trimethylfruktose zusätzlich entstandenen Trimethylglukose her. Außerdem müßte bei der Spaltung des Inulins zu Abbauinulin dieses auch zu zirka 50% aus glukosefreien Anteilen bestehen und demnach nicht wie oben angegeben, auf 18 Fruktosereste, sondern auf 36 Fruktosereste (= 2 Fruktofuranoseketten) 1 Glukoserest kommen.

Trimethylglukose wurde bereits von *Irvine* und *Montgomery*<sup>14</sup> in einer Ausbeute von 1 bis 3,3% aus Trimethylinulin isoliert; diese Autoren fanden jedoch experimentell, daß sich im sauren Milieu unter den Hydrolysebedingungen des Trimethylinulins die entstehende Trimethylfruktose bis zur Erreichung eines Gleichgewichtes zu Trimethylglukose epimerisiert,

<sup>11</sup> *H. H. Schlubach* und *A. Heesch*, Ann. Chem. **572**, 114 (1951).

<sup>12</sup> *H. H. Schlubach* und *K. Holzer*, Ann. Chem. **578**, 212 (1952).

<sup>13</sup> Siehe Anm. 3, S. 26, 59.

<sup>14</sup> *J. C. Irvine* und *T. N. Montgomery*, J. Amer. Chem. Soc. **55**, 1988 (1933).

wobei ungefähr ein Gehalt von 1% an letzterer erreicht wird. Aus diesem Grunde zählen *Irvine* und *Montgomery* die gefundene Trimethylglukose nicht zu den Bausteinen des Methylinulins und verneinen die Anwesenheit von Glukose im Inulinmolekül. Während obige Autoren die Epimerisation von 3,4,6-Trimethylfruktose in oxalsaurer Lösung untersuchten, haben wir diese Versuche in salzsaurer Lösung wiederholt und können deren Ergebnisse bestätigen.

In einer Untersuchung von *Bell* und *Palmer*<sup>15</sup> über die Struktur von Inulin aus *Inula Helenium* finden dieselben im Hydrolysat des Trimethylinulins 1 Mol 1,3,4,6-Tetramethylfruktose, 32,7 Mol 3,4,6-Trimethylfruktose, 1,5 Mol Dimethylfruktose und 0,54 Mol Trimethylglukose, die in der Hauptsache aus 2,4,6-Trimethylglukose bestehen soll. Die Autoren vermuten, daß die Glukose aus saccharoseartig gebundenen Endgruppen stammt. Weiters fanden sie im hydrolysierten Inulin 2,9 Mol-% Glukose und errechnen für Inulin eine Kettenlänge von 36 Radikalen mit einem Molekulargewicht von 5800.

Aus dem Ergebnis *Bell* und *Palmers*, daß in der gefundenen Trimethylglukose die 2,4,6-Trimethylverbindung vorherrschen soll, geht hervor, daß dieses Glukosederivat infolge Besetzung des C-Atoms 2 durch eine Methoxylgruppe nicht durch Epimerisation entstanden sein kann. Wir haben die Art unserer aus methyliertem und hydrolysiertem Abbauinulin entstehenden Trimethylglukose nicht näher untersucht. Dem  $R_{TG}$ -Wert auf dem Papierchromatogramm zufolge (0,82 bis 0,84) könnte es sich um 2,3,6-, 2,3,4- oder 3,4,6-Trimethylglukose handeln<sup>16</sup>. Die von *Bell* und *Palmer* im hydrolysierten Inulin gefundenen 2,9 Mol-% Glukose stimmen gut mit unseren Werten (2,5 bis 3%) überein und deren Annahme, daß dieselbe aus gebundenen Endgruppen des Inulins stammt, dürfte demnach zutreffen, wie wir seinerzeit<sup>17</sup> schon annahmen.

Die Befunde von *Hirst*, *McGilvray* und *Percival*<sup>18</sup>, die bei der Hydrolyse von Trimethylinulin auch Tetramethylglukose, aber keine Dimethylfruktose finden, können wir nicht bestätigen. Das Auftreten von Trimethylglukose und 3,4-Dimethylfruktose läßt sich ähnlich wie *Schlubach*<sup>19</sup> dies für Loliin und Phlein mittels eines Difruktoseanhydrids formuliert, eventuell durch Annahme einer leicht spaltbaren Glukopyranose-fruktofuranose-dianhydrid-Bindung (siehe Fig. 1) erklären. Auch könnte man das Vorkommen von Glukose innerhalb der Kette einer Verzweigung von Fruktofuranoseresten weg annehmen.

<sup>15</sup> *D. J. Bell* und *A. Palmer*, J. Chem. Soc. London **1952**, 3763.

<sup>16</sup> Tabelle bei *F. Cramer*, Papierchromatographie, 3. Aufl., S. 73. 1954.

<sup>17</sup> Siehe Anm. 3, S. 26.

<sup>18</sup> *E. L. Hirst*, *D. J. McGilvray* und *E. G. V. Percival*, J. Chem. Soc. London **1950**, 1297.

<sup>19</sup> Siehe Anm. 12, S. 217.

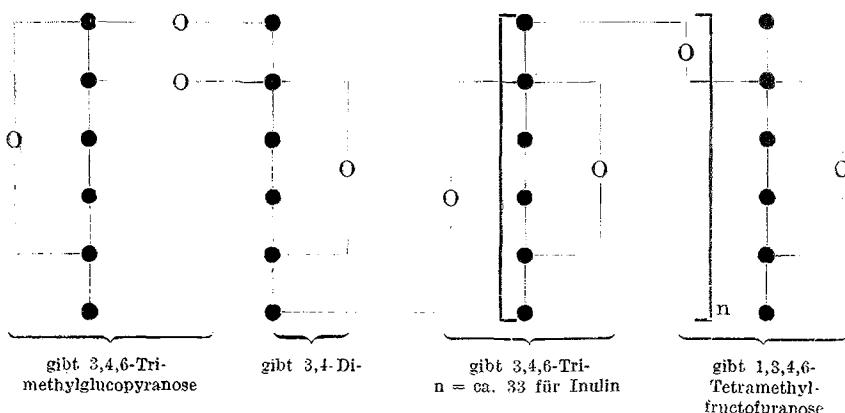


Fig. 1. Formelschema für Inulin

Wir haben uns eingehender mit der Epimerisation Fruktose zu Glukose beschäftigt und gefunden, daß eine 20%ige, 0,01 n salzsäure Fruktoselösung bei 80° nach 30 Min. sehr geringe und durch Anreicherung kaum feststellbare Glukosemengen gibt, die offensichtlich weit hinter den bei der Inulinhydrolyse unter denselben Bedingungen entstehenden Mengen liegen. Während sich also 3,4,6-Trimethylfruktose relativ leicht zu Trimethylglukose epimerisiert, scheint dies bei der freien Fruktose schwieriger zu gelingen. Als Erklärung hierfür könnte man annehmen, daß in der 3,4,6-Trimethylfruktose die beiden, die Epimerisation eingehenden Hydroxylgruppen an den C-Atomen 1 und 2 ungestört durch benachbarte Hydroxylgruppen ihr Gleichgewicht ausbilden können und sich letzteres vielleicht rascher einstellt und mehr auf die Glukoseseite verschiebt.

Um eine endgültige Entscheidung über die Frage zu treffen, welche Rolle die Epimerisation von Fruktose zu Glukose unter den Hydrolysebedingungen des Inulins spielt, haben wir einen Parallelversuch, ausgehend von reinster Fruktose und einem Abbauinulinpräparat aus reinstem Inulin, angesetzt. Wir hielten es für zweckmäßiger, hierbei vom Abbauinulin und nicht vom Inulin auszugehen, weil letzteres bei der Darstellung des Abbauproduktes noch eine chemische Reinigung erfährt und nur zirka 50% desselben als Abbauinulin wiedergewonnen werden. Dadurch werden sicher auch die oft vermuteten und durch die normale Reinigung angeblich nur schwer entfernbaren Reste glukosehaltiger Verunreinigungen (Glukosane) im Inulin purissimum ausgeschieden: Das Abbauinulin und die Fruktose wurden in 0,01 n Salzsäure gleichzeitig und im gleichen Wasserbad 1 Std. auf 80° erhitzt und ein Großteil der Fruktose durch Kristallisation entfernt. Von den so an den übrigen Substanzen angereicherten Mutterlängen beider Ansätze wurden nach Verdünnung auf gleiches Volumen gleiche Mengen papierchromatographisch unter-

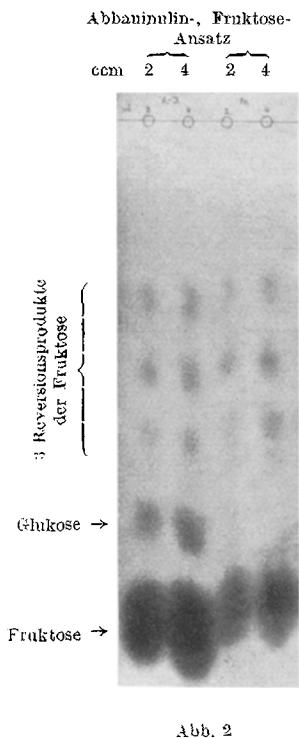


Abb. 2

sucht. Das Ergebnis zeigt Abb. 2. Glukose tritt einwandfrei nur beim Abbauinulinansatz auf; beim Fruktoseansatz ist eine solche nicht erkennbar. Reversionsprodukte der Fruktose, die sogenannten Difruktosodianhydride bzw. Diheterolävulosane, entstehen bei beiden Ansätzen in ungefähr gleicher Menge.

Dieses Versuchsergebnis spricht wohl dafür, daß die Glukose bei der Inulinhydrolyse nicht durch Umwandlung aus Fruktose entsteht, es sei denn, man nimmt eine begünstigte Umwandlung im Augenblick der Aufspaltung der 1,2-Brücken der Fruktofuranosereste im Inulinmolekül an, gewissermaßen im „Status nascendi“ der Fruktose. Die Epimerisation von Fruktose zu Glukose unter obigen Hydrolysebedingungen spielt im Verhältnis zu der im Inulin aufgefundenen Glukosemenge (2,5 bis 3%), wenn überhaupt, dann nur eine ganz untergeordnete Rolle. Unter Außerachtlassung der oben angedeuteten sehr problematischen und unseres Wissens nach in der Literatur bisher nicht

angeführten Möglichkeit einer bevorzugten Umwandlung im Status nascendi müssen wir daher den Schluß ziehen, daß Glukose einen Baustein des Moleküls des Zichorieninulins darstellt.

### Experimenteller Teil

#### Hydrolysenreihe des Inulins (Tabelle 1 und 2)

50 g chem. reines Inulin einer nicht näher bekannten Charge (Tabelle 1) bzw. einer bestimmten Charge (Tabelle 2) werden in 200 ml Wasser heiß gelöst, mit 40 ml 0,01 n HCl versetzt und 50 Min. bei 85° hydrolysiert. Alle 5 Min. wurde eine Probe entnommen, mit der 10fachen Menge Alkohol versetzt und die nach längerem Stehen abgesaugten und mit Alkohol gut ausgewaschenen Ausfällungen der Abbauinuline auf Drehwert, Ausbeute und Wasserlöslichkeit geprüft.

#### Darstellung von Abbauinulin

100 g lufttrockenes Inulin der Tabelle 2 werden in 400 ml heißem Wasser gelöst und bei 87° mit 80 ml 0,01 n HCl versetzt. Nach 15 Min. Hydrolysezeit bei obiger Temperatur wird mit 80 ml 0,01 n NaOH neutralisiert, abgekühlt und im Vak. bei 25 bis 30° zum Sirup eingeengt; derselbe (200 ml) wird mit einem gleichen Volumen Methanol verrührt, worauf alsbald das Abbauprodukt ausfällt. Nach dem Absaugen, gründlichem Auswaschen mit

Methanol und Trocknen wurden 45 g Abbauinulin erhalten; dies entspricht einer Ausbeute von zirka 50%. Abbauinulin ist rein weiß, von stärkeähnlichem Aussehen, in kaltem Wasser gut löslich und bei schwachem Erwärmen auch leicht in Pyridin; es reduziert *Fehlingsche* Lösung.  $[\alpha]_D^{22} = -39,2^\circ$  in Wasser ( $c = 4,75$ ).

*Molekulargewichtsbestimmungen des Abbauinulins nach der kryoskopischen Methode in wäßriger Lösung*

Die Einwaage wurde bei 40 bis 50° in 20 ml reinstem Wasser gelöst und in einer Eis-Kochsalz-Kältemischung das  $\Delta t$  als Differenz des Wertes der Lösung und des reinen Lösungsmittels ermittelt:

1.  $E = 2,0995$  g,  $\Delta t = 0,229^\circ$ ,  $M = 839$
  2.  $E = 1,0207$  g,  $\Delta t = 0,124^\circ$ ,  $M = 765$
  3.  $E = 1,1376$  g,  $\Delta t = 0,108^\circ$ ,  $M = 975$
  4.  $E = 1,0571$  g,  $\Delta t = 0,097^\circ$ ,  $M = 1009$
1. Abbauinulinpräparat ;  
2. Abbauinulinpräparat.

*Versuch zur Fraktionierung von Abbauinulin (Tabelle 3)*

25 g Inulin der Tabelle 2 wurden nach der oben angegebenen Vorschrift zu Abbauinulin hydrolysiert. Die neutralisierte Lösung wurde mit der 1,5fachen Menge Alkohol versetzt, nach 3 Stdn. die Fraktion I (4,4 g) abgesaugt. Die Mutterlauge wurde mit weiteren 70 ml Alkohol versetzt und nach mehrstündigem Stehen Fraktion II (2,7 g) abgesaugt. Das Filtrat schied nach Zusatz von weiteren 400 ml Alkohol über Nacht Fraktion III aus (3,2 g). Alle 3 Fraktionen wurden gut mit Alkohol gewaschen und getrocknet. Die Molekulargewichte wurden wie oben beschrieben, bestimmt und die Drehwerte in wäßr. Lösung gemessen (Tabelle 3).

*Papierchromatographische Untersuchung von Abbauinulin*

Von 2%igen wäßr. Lösungen wurden je 2,5 cmm. (= 50  $\gamma$ ) auf Papier von Schleicher und Schüll 2043 a aufgetragen und im absteigenden Verfahren in Butanol-Äthanol-Wasser (45 : 5 : 50) laufen gelassen. Nach dem Entwickeln mit Naphthoresorcin rote Flecke am Start, wie sie auch unverändertes Inulin zeigt. Die Mutterlasuren der Abbauinuline wurden ebenfalls wie oben chromatographiert (Abb. 1).

*Abscheidung von Abbauinulin aus wäßrigen Lösungen*

5 g Abbauinulin wurden bei zirka 30° in 45 ml Wasser klar gelöst. Nach 8tägigem Stehen bei Zimmertemp. wurde der ausgeschiedene Niederschlag abgesaugt und getrocknet: 1,4 g = 28%. Vergleichsversuch: 5 g lufttrockenes Inulin wurden in 45 ml Wasser siedend gelöst; nach 8tägigem Stehen bei Zimmertemp. Abscheidung von 4,2 g, das sind 93% Inulin.

*Acetylierung von Abbauinulin*

20 g lufttrockenes Abbauinulin wurden in 100 ml Pyridin unter Erwärmen gelöst, die Lösung abgekühlt und unter Rühren und Eiskühlung allmählich aus einem Tropftrichter mit 55 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Nach 15 Stdn. gießt man unter kräftigem Rühren in 1,5 l Eiswasser, saugt den ausgefallenen Niederschlag ab und wäscht mit Wasser. Das zunächst an der Luft und später im Vak. über  $P_2O_5$  und KOH getrocknete Rohprodukt riecht nach Pyridin: 33,9 g = 95,6% Ausbeute der Theorie. Reinigung durch

3maliges Umfällen aus Aceton-Eiswasser: Lösen in 100 ml Aceton, filtrieren und eingleßen in 1,5 l Eiswasser. Reinweißes Produkt, Schmelzintervall 80 bis 95°;  $[\alpha]_D^{23} = -31^\circ$  in Chloroform ( $c = 5$ ).

Ber.  $\text{CH}_3\text{CO}$  44,8. Gef.  $\text{CH}_3\text{CO}$  44,8.

Molekulargewicht: kryoskopisch in 20 ml reinstem Benzol:

$$E_1 = 1,9489 \text{ g}, \Delta t_1 = 0,109^\circ, M = 5200; \\ E_2 = 2,4949 \text{ g}, \Delta t_2 = 0,132^\circ, M = 5500.$$

#### *Methylierung von Abbauinulin*

Die Methylierung wurde nach der Vorschrift von Haworth und Streight<sup>9</sup> für Inulin über dessen Triacetylverbindung durchgeführt. Nach dem Abdestillieren des Acetons hinterbleibt im Gegensatz zu den Angaben dieser Autoren für Inulin ein Öl, das beim Stehen über der Reaktionsflüssigkeit nach mehreren Stunden erstarrt. Das zerriebene, mit Wasser ausgewaschene und getrocknete Rohprodukt (90% d. Th.), das noch stark nach Acetonzersetzungsprodukten riecht, wurde in Äther aufgeschlämmt, wobei es in ein feines, weißes Pulver zerfiel. Nach dem Absaugen, Waschen mit Äther und Trocknen erhält man ein weißes, stark elektrisches, feines Pulver. Zur Reinigung wird dasselbe entweder aus Alkohol-Wasser oder aus Alkohol allein umgefällt.

1. *Reinigung aus Alkohol-Wasser*: 12,5 g werden in 40 ml Alkohol siedend gelöst, filtriert und das Filtrat in 500 ml kaltes Wasser eingegossen. Der ausgefallene Niederschlag wird nach 2 bis 3 Stdn. abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet: 8,55 g.

2. *Reinigung aus Alkohol allein*: 29,45 g wurden in zirka 200 ml Alkohol siedend gelöst, filtriert und das Filtrat nach Einengen auf das halbe Volumen 12 bis 15 Stdn. stehen gelassen. Das Methylabauinulin scheidet sich hierbei in sehr schönen Sphäroliten ab. Es wird abgesaugt, mit Alkohol gewaschen und getrocknet: 26,4 g.  $[\alpha]_D^{22} = -53,5^\circ$  in Chloroform ( $c = 1,58$ ).

Nach Sintern ab 129° schmilzt das Produkt bei 138 bis 142°.

Ber.  $\text{CH}_3\text{O}$  45,6. Gef.  $\text{CH}_3\text{O}$  43,2.

Molekulargewicht: kryoskopisch in 20 ml reinstem Benzol:

$$E_1 = 1,1945 \text{ g}, \Delta t_1 = 0,080^\circ, M = 4351; \\ E_2 = 0,9903 \text{ g}, \Delta t_2 = 0,086^\circ, M = 3355; \\ E_3 = 1,4360 \text{ g}, \Delta t_3 = 0,099^\circ, M = 4226.$$

#### *Nachmethylierung des nach Haworth und Streight dargestellten Methyl-Abbauinulins*

3 g Methylabauinulin wurden in 25 g Methyljodid<sup>10</sup> gelöst und im Wasserbad bei 40° unter gelindem Sieden des Methyljodids nach und nach mit 8 g Silberoxyd versetzt. Nach 8 Stund. Kochen wurde das überschüssige Methyljodid abdestilliert und der getrocknete Rückstand 2mal mit je 40 ml Chloroform heiß eluiert. Die filtrierten Eluate wurden eingedampft und der Rückstand im Vak. bei 40° getrocknet. Ausbeute: 2,8 g; weitere Reinigung nach Vorschrift 2 des nach Haworth und Streight methylierten Abbauinulins. Das Produkt schmilzt nach Sintern ab 132° bei 146°.  $[\alpha]_D^{20} = -53^\circ$  in Chloroform ( $c = 0,95$ ).

Ber.  $\text{CH}_3\text{O}$  45,6. Gef.  $\text{CH}_3\text{O}$  45,9.

### Hydrolyse von Trimethylabbauinulin

Die Hydrolyse wurde nach *Schlubach* und *Müller*<sup>20</sup> für Methylavenarin durchgeführt. Es wurde jedoch die Primärspaltung in 0,2 n HCl und die Nachspaltung in 0,1 n HCl vorgenommen. Nach Neutralisation, Eindampfen und Trocknung wurde der Rückstand 3mal mit Chloroform in der Wärme ausgezogen und die filtrierten Auszüge eingedampft.

### Chromatographische Auf trennung der Methylhexosen des hydrolysierten Methylabbauinulins

Die Trennung wurde nach *Schlubach* und *Heesch*<sup>11</sup> auf Silikagelsäulen durchgeführt. Es erwies sich hierbei als sehr zweckmäßig, das mit Wasser angerührte Kieselgelpulver in der 6fachen Menge Chloroform aufgeschlämmt, unter schwachem Saugen in die Säule einzufüllen. Nach Festigung der luftfreien Säule wurde ohne weiteres Saugen das zu trennende, in Chloroform aufgenommene Hydrolysat aufgetragen und mit Chloroform entwickelt.

Auf 2 Säulen wurde das Hydrolysat von je 0,3 g Trimethylabbauinulin aufgetragen; aus den oberen 10 cm wurden zusammen 97 mg Dimethylfruktose + Trimethylglukose erhalten, aus dem unteren Teil 450,6 mg Trimethylfruktose und aus der durchlaufenden Fraktion 54,6 mg Tetramethylfruktose.

Drehwert des Dimethylfruktose- + Trimethylglukose-Gemisches:  $[\alpha]_D^{20} = -14^\circ$  in Wasser ( $c = 1$ ). Nach 4 Stdn. keine Drehwertsänderung.

Drehwert der Trimethylfruktose<sup>21</sup>:  $[\alpha]_D^{20} = +23,6^\circ$  in Wasser ( $c = 1$ ); nach 16 Stdn.  $+26,8^\circ$ .

Drehwert der Tetramethylfruktose<sup>22</sup>:  $[\alpha]_D^{19} = +26,8^\circ$  in Wasser ( $c = 1$ ).

Papierchromatographische Untersuchung: Schleicher und Schüll 2043 a; Butanol-Äthanol-Wasser (45 : 5 : 50); Naphthoresorcin:

Trimethylabbauinulinhydrolysat:  $R_{TF} = 0,61$  3,4-Dimethylfruktose.

$R_{TF} = 0,85$  3,4,6-Trimethylfruktose.

$R_{TF} = 1,00$  1,3,4,6-Tetramethylfruktose.

Methylhexosen der obersten Zone der Kieselgelsäule (siehe auch Abb. 1a und 1b der Kurzmitteilung<sup>1</sup>):

a) Mit Anilinphthalat:  $R_{TG} = 0,82$  bis  $0,84$  2,3,6-, 2,3,4- oder 3,4,6-Tri-methylglukose<sup>16</sup>.

b) Mit Naphthoresorcin:  $R_{TG} = 0,62$  bis  $0,63$  3,4-Dimethylfruktose.

### Aldosebestimmung nach Willstätter und Schudel

3 ml der wäsr. Lösung ( $c = 1$ ) des Gemisches von Dimethylfruktose und Trimethylglukose verbrauchen 0,9 ml 0,1 n Jodlösung, das entspricht 33,3% Trimethylglukose.

### Quantitative papierchromatographische Glukosebestimmung im Abbauinulin und dessen Mutterlauge

1. 50 g Abbauinulin wurden in 200 ml Wasser gelöst, mit 2 ml 1 n HCl versetzt und auf dem siedenden Wasserbad vollständig hydrolysiert. Nach

<sup>20</sup> *H. H. Schlubach und H. Müller*, Ann. Chem. 572, 113 (1951).

<sup>21</sup> Tabelle bei *H. H. Schlubach und H. Knoop*, Ann. Chem. 497, 208 (1932).

<sup>22</sup> *H. H. Schlubach und H. Lübbbers*, Ann. Chem. 598, 226 (1956).

Neutralisation mit 2 ml 1 n NaOH wurde im Vak. bei 40 bis 50° zum dicken Sirup eingeengt (58 g); dieser wurde unter Erwärmung in 52 ml Methanol aufgenommen, abgekühlt, mit Fruktose angeimpft und zur Kristallisation gestellt. Es schieden sich 27,9 g = 55,8% Fruktose aus. Von der methanol. Mutterlauge (78 ml) wurden 0,5, 1, 2 und 4 cmm, wie üblich, neben bekannten Mengen Glukose chromatographiert. Nach Entwicklung mit Anilinphthalat wurden die Flecke nach Größe und Intensität mit den Flecken bekannter Konzentrationen verglichen.

2. Die methanol. Mutterlauge, die bei der Darstellung des Abbauinulins anfällt, wurde im Vak. weitgehend vom Methanol befreit und wie unter 1 beschrieben, hydrolysiert, neutralisiert und zum Sirup eingedampft. Dieser (104 g) wurde in 104 ml Methanol aufgenommen und wie unter 1 ein Teil der Fruktose durch Kristallisation entfernt: 27,3 g = 30,5% Fruktose. Von der methanol. Mutterlauge der Fruktosekristallisation (150 ml) wurden Mengen wie oben chromatographiert.

Abbauinulin (78 ml) ... 50 γ Glukose in 4 cmm ... 2% Glukose.

Mutterlauge (150 ml) ... 50 γ Glukose in 3 cmm ... 2,8% Glukose bezogen auf Trockensubstanz.

#### *Epimerisation von 3,4,6-Trimethylfruktose zu Trimethylglukose*

0,4 g 3,4,6-Trimethylfruktose, die durch Kieselgelchromatographie von hydrolysiertem Trimethylabbauinulin gewonnen wurden, erhitzt man in 1%iger währ. Lösung mit 4 ml 2 n HCl 2 Stdn. auf dem Wasserbad. Dann bringt man mit Natriumbicarbonat auf pH = 7, dampft im Vak. bei 50° zur Trockene und läßt über  $P_2O_5$  stehen. Der Rückstand wurde in 20 ml Chloroform aufgenommen, filtriert und je 10 ml auf 2 Kieselgelsäulen, wie üblich, mit je 150 ml Chloroform chromatographiert. Die auslaufenden Fraktionen sind zuckerfrei. Die oberste Zone der Säule (3 cm) wurde mit Methanol eluiert, das Eluat zur Trockene verdampft: 0,0273 g = 13%. Am Papierchromatogramm des in 1,25 ml Wasser aufgenommenen Rückstandes zeigt sich nach der Entwicklung mit Anilinphthalat die 3,4,6-Trimethylglukose:  $R_{TG} = 0,81$  bis 0,82. Aus dem Rest der Kieselgelsäule wurden 0,1353 g unveränderte 3,4,6-Trimethylfruktose zurückgewonnen.

#### *Versuch der Epimerisation von Fruktose zu Glukose unter den Hydrolysebedingungen von Inulin (Abb. 2)*

Lösungen von je 50 g reinstem Abbauinulin und Fruktose in je 200 ml Wasser wurden nach Zugabe von je 2 ml 1 n HCl gleichzeitig im selben Wasserbad eingetaucht und 1 Std. auf 80° erhitzt. Dann wurden beide Lösungen mit je 2 ml 1 n NaOH neutralisiert, abgekühlt und im Vak. bei 50° zum dicken Sirup eingedampft. Dieser wurde in je 50 ml Methanol in der Wärme aufgenommen, die methanol. Lösung eisgekühlt, mit Fruktose angeimpft und zur Kristallisation gestellt. Auf diese Art konnten nach 3 Tagen aus dem Fruktoseansatz 27,3 g = 49,1% und aus dem Abbauinulinansatz 34,6 g = 69,3% Fruktose entfernt werden. Die Mutterlauen beider Ansätze wurden mit Methanol auf gleiches Volumen (70 ml) aufgefüllt und je 2 und 4 cmm, wie üblich, papierchromatographisch untersucht.

Der *Laevosan-Gesellschaft*, Linz (*Franck und Dr. Freudl*), danken wir für die Förderung unserer Untersuchungen und für die Bereitstellung der Ausgangsstoffe herzlichst.