

Unser besonderer Dank gilt Herrn Prof. Asō für die freundliche Schenkung von Präparaten, ferner der Matsutani Kagaku Kogyō Akt. Ges. für die Überlassung von Hydrol.

Zusammenfassung

Die Prozesse der Perjodat-Oxydation der typischen Disaccharide werden unter Anwendung des früher beschriebenen, polarographischen Verfahrens untersucht. Im wesentlichen bedingt die Art der glykosidischen Bindung den Unterschied zwischen den Gestalten der Reaktionskurven, was zum Nachweis der Bindungsart dient. Die abnormale Überoxydation des 1,2-Disaccharids läßt sich dadurch erklären, daß in der wäßrigen Lösung ein Gleichgewicht zwischen der Hemiacetalform und der Aldehydform besteht, und die letztere eine große Menge Perjodat verlangt.

(Eingegangen am 21. Juli, 1960)

UDC 547.458

24. Kiyoshi Takiura und Kyōko Koizumi: Untersuchung der Oligosaccharide. II.¹⁾ Beziehung zwischen Polymerisationsgrad und Perjodatreaktionsgeschwindigkeit der Oligosaccharide der Amylosereihe.

(Pharmazeutische Fakultät, Universität Osaka*¹⁾)

Wit jetzt allgemein angenommen wird, sind alle Glukose-Einheiten in den Oligosacchariden der Amylose-Reihe nach der Art der Maltose-Bindung (1, 4) verknüpft, und alle Bindungen gehören der α -Reihe an. Die Versuchsergebnisse von Whelan und Roberts mit Speichel- α -Amylase hat diese Struktur bestätigt.²⁾ Wie von der Zellulose-Reihe^{3,4)} ist es auch von der Amylose-Reihe bekannt, dass zwischen optischer Drehung und Kettenlänge und zwischen papierchromatographischem R_M -Wert und Molekular-Gewicht lineare Beziehungen bestehen.⁵⁾

In der Vorangehenden Arbeit¹⁾ wurde der Nachweis geführt, dass die Geschwindigkeit der Perjodat-Oxydation der Disaccharide von der Art der glykosidischen Bindung abhängig ist, nämlich dass Disaccharide, deren Bindungen demselben Typ angehören, sehr ähnliche oder ganz gleiche Oxydationskurven ergeben, soweit unsre Erfahrung geht. Im allgemeinen ist die Art der Bindung in Polyosen einerhomologen Reihe von gleichem Typ; die Kettenlänge der Glieder nimmt in arithmetischer Progression zu und, je länger die Kettenlänge ist, desto träger reagiert die Polyose mit dem Oxydationsmittel. Also ist zu erwarten, dass man bei der Perjodat-Oxydation in der Amylose-Reihe gleichlaufende Oxydationskurven erhält, obwohl das bis jetzt noch nicht untersucht worden ist. Wir haben daher in der Amylose-Reihe—mit Maltose Maltotriose, -tetraose und -pentaose—die Beziehung ihrer Oxydationsverläufe zur Struktur der genannten Stoffe quantitativ untersucht.

*¹⁾ Toneyama, Toyonaka, Osaka-fu (滝浦 潔, 小泉京子).

1) I. Mitt. K. Takiura, K. Koizumi: Dieses Bulletin, **10**, 134 (1962).

2) W. J. Whelan, P. J. P. Roberts: J. Chem. Soc., **1953**, 1298.

3) K. Freudenberg, G. Blomqvist: Ber., **68**, 2070 (1935).

4) A. J. P. Martin: Biochem. Soc. Symposia, No. 3, 4 (1950).

5) W. J. Whelan, J. M. Bailey, P. J. P. Roberts: J. Chem. Soc., **1953**, 1293.

Abb. 1(a) zeigt die Ergebnisse der Oxydationsgeschwindigkeitsmessung bei den Oligosacchariden der Amylose-Reihe, die alle ganz analoge Resultate aufwiesen. Daraus folgt, dass am Anfang des Oxydationsverlaufs jeder Polyose die Geschwindigkeit der Perjodat-Oxydation in einem bestimmten Verhältnis zur ursprünglichen Konzentration der Problelösung steht, nach folgender Formel :

$$\frac{dx}{dt} = kA \tag{1}$$

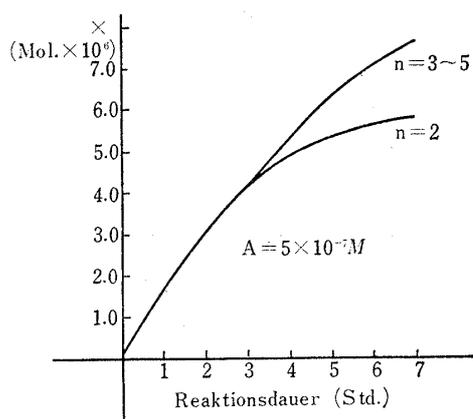
- x : Perjodatverbrauch (Moll.)
- t : Reaktionsdauer (Stdn.)
- k : Geschwindigkeitskonstante, die den Maltopolyosen gemeinsam ist.
- A : Ursprüngliche Konzentration von Polyose (Moll.) (Abb. 1(b))

Nimmt man die Molekularproportion des oxydierten Polyoses statt des Perjodatverbrauchs auf, so ist die Formel (1) umzuschreiben :

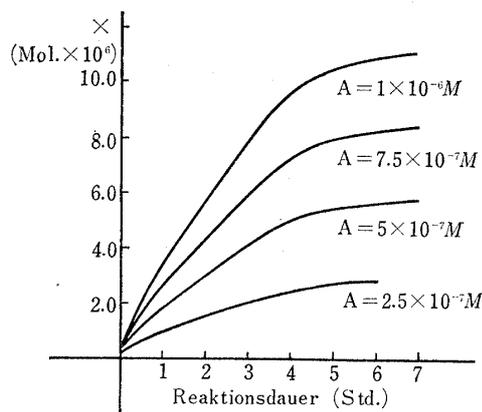
$$\frac{d(x/p)}{dt} = k'A \tag{2}$$

$$k' = \frac{1}{t+c} \frac{x/p}{A} \tag{3}$$

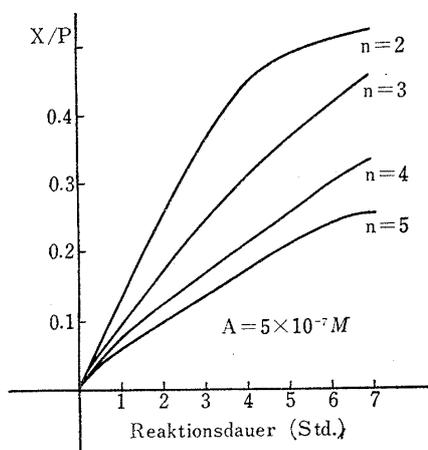
- k' : Geschwindigkeitskonstante (s. Tabelle I), die jeder Polyose charakteristisch ist.
- p : Die erforderliche Menge des Perjodats, um 1 Moll. Polyose vollständig zu oxydieren.
- c : Integrale Konstante; nach Experiment $c=0.5$.



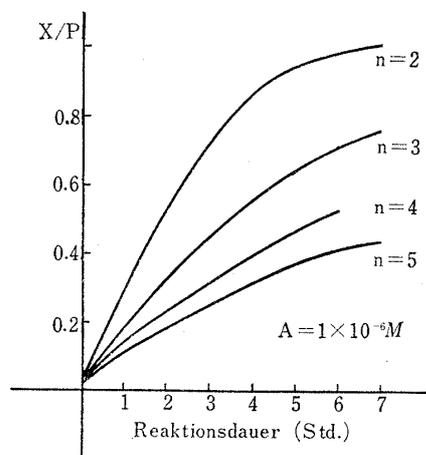
(a) Maltose, Maltotriose, -tetraose, -pentaose



(b) Maltose in verschied Konzentration



(c) Kurven zur Identifizierung



(d) Kurven zur Identifizierung

Abb. 1. Perjodatverbrauchs kurven für die Oligosaccharide der Amylose-Reihe

TABELLE I. Charakteristische Perjodat-Oxydationskonstanten für die Maltopolyosen

	Maltose	Maltotriose	Maltotetraose	Maltopentaose
p	11	17	23	29
k'	0.205	0.133	0.098	0.078
pk	2.26	2.26	2.25	2.26

Abb. 1(c) und (d) zeigen die charakteristischen Oxydationskurven, welche ohne Zweifel zur Identifizierung anwendbar sind. Aus der Darstellung der Zahlenwerte für p und k' in Tabelle I geht eindeutig hervor, daß das Produkt pk' konstant ist. Also nach Formel 3, vorausgesetzt, daß die Reaktionsdauer t und die ursprüngliche Konzentration A festgesetzt sind, muß der Perjodatverbrauch x für alle Maltopolyose gleich und bestimmt sein; also im ganzen genommen, ergeben sich auf jeden Fall in einer äquimolaren Konzentration identische Oxydationskurven, ob sie in der Probelösung jedes für sich allein oder miteinander zusammen gelöst sind (Abb. 2). Diese Folgerung ist zweckmäßig zur Molekulargewichtsbestimmung an Maltopolyosen anwendbar.

Abb. 3 und 4 zeigen das Prinzip der Methode, und daraus ist die Durchführung ersichtlich. Zu diesem Zwecke sind unter einer bestimmten Bedingung zunächst mit

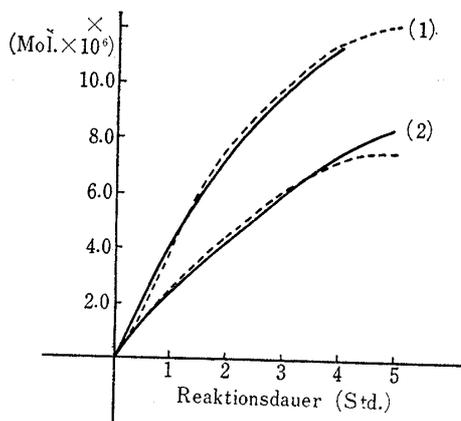


Abb. 2. Oxydationskurve für Gemische

- (1) ----- Maltose 1.112×10^{-6} Moll.
 — Maltose 0.871×10^{-6} Moll.
 + Maltotriose 0.293×10^{-6} Moll.
 (insgesamt 1.164×10^{-6} Moll.)
- (2) ----- Maltose 0.667×10^{-6} Moll.
 — Maltose 0.415×10^{-6} Moll.
 + Maltotriose 0.266×10^{-6} Moll.
 (insgesamt 0.681×10^{-6} Moll.)

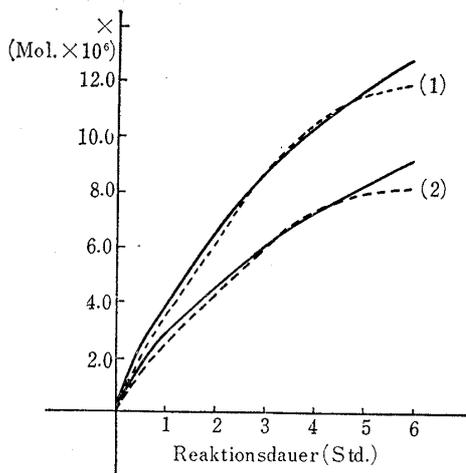


Abb. 3. Molekulargewichtsbestimmung des Pulverdextrins

- (1) — Dextrin 0.645 mg
 ----- Maltose 1.1×10^{-6} Moll.
- (2) — Dextrin 0.430 mg
 ----- Maltose 0.75×10^{-6} Moll.

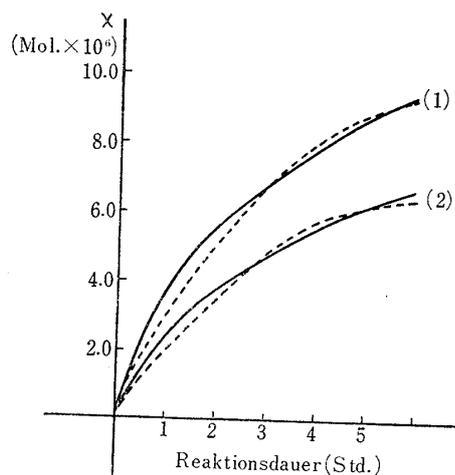


Abb. 4. Molekulargewichtsbestimmung des Kartoffelamylose

- (1) — Amylose 3.024 mg
 ----- Maltose 0.85×10^{-6} Moll.
- (2) — Amylose 2.016 mg
 ----- Maltose 0.6×10^{-6} Moll.

Maltose-Standard-Lösungen eine Reihe Referenzkurven (Abb. 1(b)) darzustellen. Dann bestimmt man für eine Probe der Polyose oder eines Gemisches der Polyose die entsprechende Versuchskurve. Wenn diese Kurve mit einer der Referenzkurven übereinstimmt, so muß die Probelösung mit der entsprechenden Standardlösung äquimolar sein. In der Praxis braucht man aber nicht den ganzen Verlauf der Reaktion zu verfolgen, sondern es genügt, an einem geeigneten Zeitpunkt, nämlich z. B. nach Verlauf von 3 Stunden, den Perjodatverbrauch nur einmal abzulesen. Wenn auch der Verbrauch mit keinem Referenzverbrauch genau übereinstimmt, läßt sich die Probekonzentration durch Interpolation ablesen.

Wir haben auf diese Weise die molare Konzentration der Probelösungen von Dextrin und auch von Amylose aus Kartoffelstärke bestimmt und daraus ihre Molekulargewichte und Kettenlängen berechnet. Die Resultate haben mit den durch die übliche Endgruppenbestimmungsmethode gewonnenen Zahlenwerten recht gut in Einklang gestanden.

Experimentelles

Amylose aus Kartoffelstärke—Nach der Beschreibung von Ling und Nanji⁶⁾ erfolgte die Darstellung der Amylose. Weisses Pulver, Ausbeute, 4.5 g aus 40 g Stärke (11.3%), $[\alpha]_D^{23.5} + 190.6^\circ$ ($c = 0.514$ in 2.5N NaOH).

Maltose, Maltotriose, -tetraose und -pentaose aus Amylose—a) Partialhydrolyse der Amylose mit Säure: Nach Whelan, *et al.*⁷⁾ wurden 4.2 g Kartoffel-Amylose mit 10 ccm Alkohol angefeuchtet, mit 10 ccm 6N NaOH und 200 ccm Wasser versetzt und unter starkem Schütteln völlig aufgelöst; die Lösung wurde mit 6N H₂SO₄ neutralisiert, mit, 56 ccm dieser Säure angesäuert, dann mit 250 ccm Wasser verdünnt und 220 Min. lang im Wasserdampf erhitzt. Der Verlauf der Hydrolyse wurde nach Somogyi verfolgt. Am Ende dieser Zeitdauer betrug die prozentuale Umwandlung (als Glucose) 25.3-proz. Das saure Hydrolysat wurde abgekühlt, neutralisiert, in Vakuum eingedampft und mit Kollodiummembran insgesamt 70 Std. lang unter dreimaliger Erneuerung des äusseren Wassers dialysiert. Die vereinigten Dialysate wurden in Vakuum auf 50 ccm abgedampft und mit einer Säule (3 × 17 ccm) aktivierter Kohle (Takeda Chromato-Kohle) chromatographiert. Abb. 5 zeigt das Elutionsdiagramm. Zunächst wurde die Glukose mit Wasser ausgewaschen (Fraktion I). Dann wurde mit 7.5-proz. Alkohol Maltose (Fraktion II) und mit 15-proz. Alkohol Maltotriose (Fraktion III) eluiert.

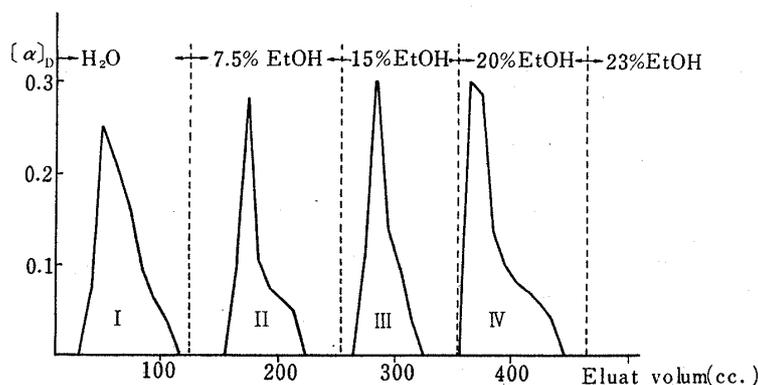


Abb. 5. Elutionsdiagramm des Säurehydrolysats der Kartoffelamylose

Die beiden Fraktionen erwiesen durch Papierchromatographie (BuOH-AcOH-H₂O; Fuselöl-Pyridin-H₂O) ihre Einheitlichkeit. Um Tetraose rein zu trennen, musste die Fraktion IV refraktioniert werden. Ausbeute: Maltose 233 mg, Triose 168 mg, Tetraose 244 mg. IR $\nu_{\max}^{\text{Nujol}}$ cm⁻¹: Maltose, 907 (907), 897 (894), 869, 847 (846), 778 (778). Triose, 925 (919), 843 (834), 766 (767). Tetraose, 927 (927), 845 (861, 840), 763 (763).

Die eingeklammerten Zahlen sind die Zahlenwerte aus der chemischen Literatur.

b) Durch Amylolyse mit α -Amylase: 570 mg Kristallisierte α -Amylase wurden in 30 ccm. 0.1M

6) A. R. Ling, D. R. Nanji: J. Chem. Soc., 123, 2666 (1923).

7) W. J. Whelan, J. M. Bailey, P. J. P. Roberts: *Ibid.*, 1953, 1297.

Phosphatpuffer (pH 6.5) gelöst. Je 1 ccm dieser Lösung wurde mit derselben Pufferlösung auf 2, 3, 12, 24 oder 36 ccm verdünnt, und je 2 ccm der verdünnten Enzymlösung wurden mit 1.2-proz. Lösung der löslichen Stärke versetzt und 10 Min. bei 40° stengelassen. Nach dieser Zeit wurde jede für sich mit je 2 ccm N/3,000-Jodlösung versetzt und der Farbton von Jodstärkereaktion beobachtet: bei 2-, 3- und 12-facher Verdünnung trat keine Färbung ein, aber bei 24-facher Verdünnung zeigte sich Orange, bei 36-facher Verdünnung Rot. Der Amylozelösung (4 g/500 ccm) wurde also die 36-fach verdünnte Amylase-Pufferlösung (50 ccm) hinzugefügt und, bis die orangefarbige Jodstärkereaktion erwiesen wurde, nämlich ungefähr 15 Min. lang, wurde die Mischung bei 36° aufbewahrt, dann 10 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt und filtriert. Das Filtrat wurde im Vakuum auf 20 ccm eingedampft und dem Adsorptionsverfahren (Säule: 3 × 40 ccm), wie oben erwähnt, nuterworfen. Abb. 6 zeigt das Chromatogramm. Ausbeute: Maltose 110 mg, Triose 113 mg, Tetraose 47 mg, Pentaose 46 mg.

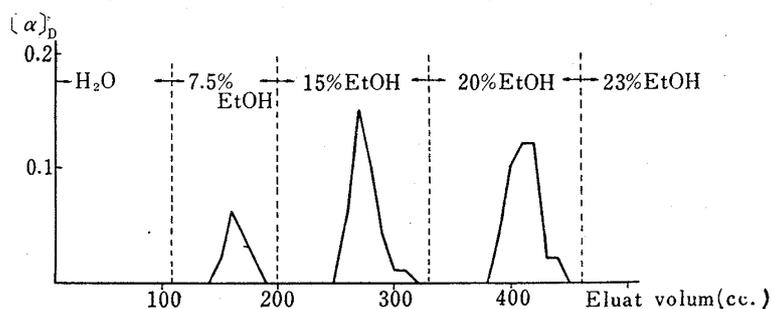
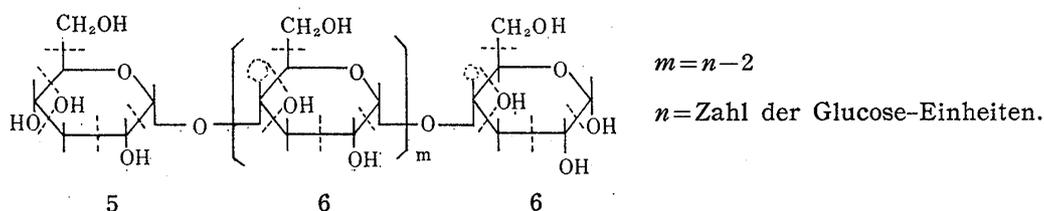


Abb. 6. Elutionsdiagramm des α -Amylolysats der Kartoffelamylose

Apparaturen und Methodik—Zur Durchführung der polarographischen Versuche dienten durchweg die in des vorigen Mitteilung¹⁾ beschriebene Einrichtung und das gleiche verfahren unter derselben Versuchsbedingung.

Perjodat-Oxydation der Maltopolyose (Abb. 1)—1 Moll. Maltopolyose verbrauchte $(6n-1)$ Moll. Perjodat entsprechend dem folgenden Schema :



In Tabelle II ist der zeitliche Verlauf der Oxydation und in Tabelle III die Geschwindigkeitskonstante jeder Polyose zusammengestellt.

Perjodat-Oxydation des Maltopolyosengemisches (Abb. 2)—In Tabelle IV (a) und (b) sind die Versuchsergebnisse für Gemische zusammengefasst. Der Kurvenverlauf des Gemisches (a)—Maltose $0.871 \times 10^{-6}M$, Maltotriose $0.293 \times 10^{-6}M$: insgesamt $1,164 \times 10^{-6}M$.—war fast identisch mit dem der $1,112 \times 10^{-6}M$ Maltose; die Kurve für das Gemisch (b)—Maltose $0.415 \times 10^{-6}M$, Triose $0.266 \times 10^{-6}M$, insgesamt $0.681 \times 10^{-6}M$ —und die für $0.667 \times 10^{-6}M$ Maltose lagen übereinander.

TABELLE II. Zeitlicher Verlauf der Oxydation jeder Polyose (Moll. $\times 10^6$)

Reaktionsdauer (Std.)	$x = \text{Perjodatverbrauch (Moll.)}, p = 6n - 1.$							
	Maltose		Maltotriose		Maltotetraose		Maltopentaose	
	x	x/p	x	x/p	x	x/p	x	x/p
1	1.68	0.158	1.63	0.096	1.63	0.071	1.69	0.058
2	2.90	0.264	2.80	0.165	2.80	0.122	2.83	0.098
3	4.02	0.365	4.00	0.235	3.99	0.173	3.72	0.128
4	4.94	0.449	5.35	0.315	4.90	0.213	4.88	0.168
5	5.38	0.489	6.28	0.369	5.99	0.260	5.88	0.203
6	5.59	0.508	—	—	6.91	0.300	7.07	0.244
7	5.71	0.519	7.73	0.455	7.66	0.333	7.35	0.253

(ii) $A=1 \times 10^{-7}M$

Reaktionsdauer (Std.)	Maltose		Maltotriose		Maltotetraose		Maltopentaose	
	x	x/p	x	x/p	x	x/p	x	x/p
1	3.29	0.299	3.13	0.184	3.17	0.138	3.38	0.117
2	5.56	0.505	5.54	0.326	5.44	0.237	5.39	0.186
3	7.97	0.725	7.39	0.435	7.25	0.315	7.29	0.251
4	9.53	0.866	9.43	0.555	9.00	0.391	9.34	0.322
5	10.42	0.947	10.80	0.635	10.80	0.470	10.81	0.373
6	10.73	0.975	12.08	0.711	12.00	0.522	11.91	0.411
7	10.95	0.995	12.94	0.761	—	—	12.55	0.433

TABELLE III. Geschwindigkeitskonstante (k') für jede Polyose

(i) $5 \times 10^{-7}M$

t	$\frac{1}{t+0.5} \cdot \frac{1}{A}$	Maltose	Maltotriose	Maltotetraose	Maltopentaose
1	1.33	0.20	0.13	0.09	0.08
2	0.80	0.21	0.13	0.10	0.08
3	0.57	0.21	0.13	0.10	0.07
4	0.44	0.20	0.14	0.10	0.08
im Mittel		0.205	0.133	0.098	0.078

(ii) $1 \times 10^{-6}M$

t	$\frac{1}{t+0.5} \cdot \frac{1}{A}$	Maltose	Maltotriose	Maltotetraose	Maltopentaose
1	0.67	0.20	0.12	0.09	0.08
2	0.40	0.20	0.13	0.10	0.07
3	0.29	0.21	0.13	0.09	0.07
im Mittel		0.203	0.127	0.093	0.073

TABELLE IV. Perjodat Verbrauch des Gemisches (Moll. $\times 10^{-6}$)

(a) Maltose $0.371 \times 10^{-6}M$ + Maltotriose $0.293 \times 10^{-6}M$

Reaktionsdauer (Std.)	1	2	3	4	5
Gemisch ($1.164 \times 10^{-6}M$)	3.93	6.800	9.57	11.38	
Maltose ($1.112 \times 10^{-6}M$)	3.87	7.24	9.78	11.39	12.16

(b) Maltose $0.415 \times 10^{-6}M$ + Maltotriose $0.266 \times 10^{-6}M$

Reaktionsdauer (Std.)	1	2	3	4	5
Gemisch ($0.681 \times 10^{-6}M$)	2.47	4.39	6.06	7.55	8.35
Maltose ($0.667 \times 10^{-6}M$)	2.48	4.41	6.16	7.24	7.52

Molekulargewichtsbestimmung des Pulverdextrins*²—0.645 mg und 0.430 mg Pulverdextrin wurden getrennt, unter der oberschriebenen Bedingung der Perjodat-Oxydation unterworfen, und jeder einzelne Perjodatverbrauch wurde zeitlich verfolgt (Tabelle V, Abb. 3). Die Kurve des ersteren entsprach der von $1.1 \times 10^{-6}M$ Maltose und die des letzteren der von $0.75 \times 10^{-6}M$. Daraus kann man also das durchschnittliche Molekulargewicht und die durchschnittliche Kettenlänge dieses Dextrins berechnen:

$$M. G. = \frac{0.645 \times 10^{-3}}{1.1 \times 10^{-6}} = 586; \text{ Kettenlänge} = \frac{586 - 180}{162} + 1 = 3.5$$

$$M. G. = \frac{0.430 \times 10^{-3}}{0.75 \times 10^{-6}} = 573; \text{ K. L.} = \frac{573 - 180}{162} + 1 = 3.4$$

TABELLE V. Perjodat Verbrauch des Pulverdextrins (Moll. $\times 10^6$)

Reaktionsdauer (Std.)	Dextrin 0.645 mg	Maltose $1.1 \times 10^{-6}M$	Dextrin 0.430 mg	Maltose $0.75 \times 10^{-6}M$
1	3.92	3.62	2.79	2.50
2	6.34	6.12	4.50	4.25
3	8.80	8.78	5.92	6.00
4	10.32	10.48	7.35	7.30
5	11.70	11.46	7.89	7.98
6	12.72	11.80	9.19	8.15

*² "Kona-Ame" der Matsutani-Kagaku-Kōgyō Akt. Ges.

Molekulargewichtsbestimmung der Kartoffelamylose—Die Oxydationskurven der Kartoffelamylose (3.024 und 2.016 mg) entsprachen den Kurven der Maltose (0.85×10^{-6} und $0.6 \times 10^{-6} M$). (Tabelle VI, Abb. 4)

$$M. G. = \frac{3.024 \times 10^{-3}}{0.85 \times 10^{-6}} = 3558 \quad K. L. = \frac{3558 - 180}{162} + 1 = 21.9$$

$$M. G. = \frac{2.016 \times 10^{-3}}{0.6 \times 10^{-6}} = 3360 \quad K. L. = \frac{3360 - 180}{162} + 1 = 20.6$$

Nach der üblichen jodmetrischen Endgruppenbestimmungsmethode erhielten wir, wie folgt, für die durchschnittliche Kettenlänge derselben Probe den Zahlenwert 19.8.

100.8 mg Amylose, gelöst in einer 3-proz. heißen Kochsalzlösung, wurde nach Kühlen zu 2° mit 10 ccm 0.37M NaIO₄ versetzt und 25 Std. stehend elassen. Das übriggebliebene Perjodat wurde mit 1 ccm Äthylenglykol zersetzt. Nach einstündigem Stehenlassen wurde die gebildete Säure mit 0.01 N Ba(OH)₂ (Faktor 0.937) titriert. Nach der Abziehung des Leerwerts betrug der Barytverbrauch von Ameisensäure 10.05 ccm.

$$\frac{0.01 \times 0.937 \times 10.05}{3 \times 10000} = \frac{0.1008}{x}; \quad x = 3213$$

$$\text{Kettenlänge} \quad \frac{3213}{162} = 19.8.$$

TABELLE VI. Perjodat Verbrauch der Kartoffelamylose (Moll. $\times 10^6$)

Reaktionsdauer (Std.)	Amylose 3.024 mg	Maltose $0.85 \times 10^{-6} M$	Amylose 2.016 mg	Maltose $0.6 \times 10^{-6} M$
1	3.73	2.81	2.37	1.98
2	5.59	4.96	3.80	3.35
3	6.78	6.80	4.72	4.80
4	7.71	8.08	5.47	5.70
5	8.53	8.84	6.31	6.24
6	9.42	9.35	6.65	6.24

Wir danken Frl. Y. Kobayashi für ihre Hilfe bei den Experimenten und der Matsutani Kagaku Kōgyō Akt. Ges. für die freundliche Lieferung des Dextrins.

Zusammenfassung

Die Reaktionsgeschwindigkeiten der Oligosaccharide der Amylose-Reihe mit Perjodat werden in verschiedenen Konzentrationsgraden untersucht und dabei festgestellt, daß am Anfang des Oxydationsverlaufs (1~5 Std.) die Geschwindigkeit in einem bestimmten Verhältnis zu der ursprünglichen Konzentration der Polyose steht, und daß die Lösung derselben molaren Konzentration von verschiedenen Polyosen im Verlauf einer bestimmten Zeit ein und dieselbe Menge Perjodat verbraucht. Daraus ergibt sich eine neue Methode der Molekulargewichtsbestimmung in der Amylose-Reihe, z.B. beim Maltodextrin und der Kartoffelamylose.

(Eingegangen am 12. August, 1960)