

ebenso bei der Darstellung der Zimtsäure aus der aus Heterozimtsäure dargestellten Phenylpropionsäure.

Gerade der Umstand, daß bei Anwendung des nämlichen Ausgangsmaterials unter scheinbar gleichen Bedingungen verschiedene Resultate erhalten werden können, veranlaßte mich von Anfang an die Annahme zu machen, daß die Verschiedenheit der erhaltenen Reaktionsprodukte auf Isomerie zurückzuführen sei und daß es sich nicht um Entstehung verschieden zusammengesetzter Körper handeln könne.

Eine endgültige Erklärung für dieses merkwürdige Erscheinungsbereich geben zu wollen, halte ich noch nicht an der Zeit.

Die Untersuchung wird fortgesetzt.

**395. Leonhard Wacker: Eine colorimetrische Methode zur Bestimmung der Molekulargröße von Kohlehydraten. (Unterscheidung der primären von den sekundären und tertiären Alkoholen.)**

[2. Mitteilung.]

(Eingegangen am 28. Juni 1909.)

In der letzten Mitteilung<sup>1)</sup> über diesen Gegenstand wurde eine Methode beschrieben, nach welcher aus den verschiedenartigsten Kohlehydraten durch Einwirkung von Phenylhydrazinsulfosäure in alkalischer Lösung bzw. Suspension Farbstoffe von nahezu gleicher Nuance erhalten werden, so daß sie bezüglich der Intensität verglichen werden können. Es zeigte sich dabei, daß Kohlehydratlösungen, welche die gleiche Anzahl Moleküle enthalten, Farblösungen von konstanter Farbstärke<sup>2)</sup> liefern, so daß der Weg gegeben war, auf diese Weise die Molekulargröße von Kohlehydraten unbekannter Konstitution, auch kolloidaler Natur, zu ermitteln. Im allgemeinen war die Reaktionsgeschwindigkeit, außer von der Konzentration, auch abhängig von der Molekulargröße, doch waren Ausnahmen hiervon z. B. auch bei den primären Alkoholen zu konstatieren.

Die konstante Farbstärke aus molekularen Mengen der verschiedenen Monosen und Polysaccharide läßt sich nur erklären, wenn man annimmt, daß immer die gleiche Anzahl chromophorer Gruppen in das Farbstoffmolekül eintritt und jeweils nur die endständige Aldehyd-

<sup>1)</sup> Diese Berichte **41**, 266 [1908].

<sup>2)</sup> Auch bei den primären Alkoholen liegen ähnliche Verhältnisse vor, jedoch nicht so gut übereinstimmend, wie bei der Mehrzahl der Kohlehydrate.

oder primäre Alkoholgruppe reagiert. Daß sekundäre oder tertiäre Alkohole eine weit geringere Reaktionsfähigkeit mit dem Hydrazin besitzen, läßt sich direkt beweisen, und diese Eigenschaft kann zur qualitativen Unterscheidung der primären Alkohole von den sekundären und tertiären dienen.

Da sich die mittelständigen Komplexe der Kohlehydrate nur aus sekundären Alkoholradikalen oder Ketonen<sup>1)</sup> zusammensetzen, ist die Annahme berechtigt, daß nur die endständigen Radikale in Reaktion treten<sup>2)</sup>.

Zur Ermittlung des Molekulargewichts zog ich als Vergleichsobjekt die Maltose heran, von dem Gesichtspunkte ausgehend, daß die Mehrzahl der biologisch wichtigen Polysaccharide sich durch Kombination einer Anzahl von Maltose bzw. Traubenzuckermolekülen aufbauen. Bei den weiteren Versuchen wurde nunmehr auch  $\frac{1}{1000}$ -Dextroselösung als Unterlage für die Vergleiche benutzt. Die auf diese Weise gewonnenen Molekulargewichte sind etwas größer als jene mit Maltose; dies rührt von dem Umstande her, daß die aus Hexosen entstehenden Farbstoffe gegenüber denen aus Di- und Poly-Sacchariden eine Spur blauer sind, so daß sie um 5–10% stärker erscheinen. Die mit Maltose als Unterlage gewonnenen Resultate sind somit jenen mit Dextrose vorzuziehen. Die Methode selbst wurde dadurch verbessert, daß eine stärkere Alkalilauge zur Anwendung kam, wodurch die durch Autoxydation entstehende Färbungen haltbarer gemacht werden können. Zur Entkräftung des Einwands, daß durch die Lauge allenfalls die Polysaccharide abgebaut werden könnten, wurde Stärke und lösliche Stärke mit Lauge in der Konzentration, wie sie bei den Versuchen Verwendung findet, 48 Stunden stehen gelassen und dann gegen dieselbe Gewichtsmenge Stärke und lösliche Stärke verglichen, die nicht längere Zeit mit Lauge vorbehandelt worden war. Es zeigte sich kein Unterschied in der Farbstärke, so daß also eine Zerlegung in kleinere Moleküle beim Stehen mit der Lauge nicht stattfand. Die Widerstandsfähigkeit der Polysaccharide gegen Alkalien ergibt sich z. B. auch aus der Beständigkeit des Glykogens gegen heiße, 60-prozentige Kalilauge, so daß darauf sogar eine quantitative Bestimmungsmethode begründet werden konnte.

Die weiteren Untersuchungen der Stärke und deren Abbauprodukte wurde fortgesetzt.

<sup>1)</sup> Ketone zeigen nur in stärkerer Konzentration erhebliche Rotfärbung, vgl. vorige Mitteilung loc. cit.

<sup>2)</sup> Diese Auffassung gewinnt noch mehr an Wahrscheinlichkeit durch das Verhalten des Inosits. Bekanntlich ist dieser ein Hexahydrohexaoxybenzol und enthält nur sekundäre Alkoholgruppen. Dementsprechend gibt er in den üblichen Verdünnungen von  $\frac{1}{1000}$  keine Reaktion.

Schon Nägeli<sup>1)</sup> hat gefunden, daß die Stärke aus zweierlei Substanzen besteht, die er mit Rücksicht auf die morphologischen Verhältnisse als Granulose und Stärkecellulose bezeichnet hat. Granulose nannte er den in warmem Wasser unter Zusatz von Speichel löslichen Teil, Cellulose den unlöslichen Teil. Neuerdings haben Maquenne und Roux<sup>2)</sup> diese Trennung mit überhitztem Wasser unter ähnlichen Erfolgen wie Nägeli aufgegriffen. Sie bezeichnen die der Granulose entsprechenden Bestandteile als Amylose<sup>3)</sup>. Der Stärkecellulose wurde wegen des pflanzenschleimartigen Charakters der Name »Amylopektin« beigelegt. Kocht man die Stärke in einer Verdünnung 1 : 1000 mit Wasser aus, so erhält man beim erstmaligen Auskochen eine Lösung, die in der Kälte klar bleibt; kocht man den Rückstand wiederholt aus, so erhält man beim Erkalten eine opalisierende Lösung, während der Rückstand, »die Cellulose«, den pflanzenschleimartigen Charakter besitzt. Nach dem teilweisen Einengen der wäßrigen Lösungen, Fällen mit Alkohol, Filtrieren und Trocknen, kann man vier verschiedene Fraktionen unterscheiden und isolieren, die colorimetrisch mit der Molekulargröße der Dextrose verglichen wurden.

Es wurde gefunden, daß

die leicht wasserlösliche Granulose aus ca. 5 Hexosen <sup>1)</sup> ,	
» schwerer » » » » 6 »	
» einmal ausgekochte Stärkecellulose » 7 »	
» mehrmals » » » 8 »	

besteht.

Man sieht daraus, daß sich die Stärke aus mehreren Verdichtungsstadien der Dextrose zusammensetzt. Die Stärkecellulose ist gewissermaßen der Verholzung näher als die Granulose. Die in der

<sup>1)</sup> Nägeli, Monographie »Die Stärkekörner«, 1858; J. 1859. 544; Botan. Mitteil. 1863.

<sup>2)</sup> Maquenne und Roux, Compt. rend. 140, 1303—1308; Bull. soc. chim [3] 33, 723—731; [3] 35, (I—XV): Zentralbl. 1905, II, 121, 314; 1906, II 1727.

<sup>3)</sup> Maquenne bezeichnet als Amylocellulose alle durch Wasser unter Druck extrahierbaren Bestandteile und befindet sich damit in einem gewissen Gegensatz zu Nägeli, der den mit Speichel extrahierbaren Teil »Granulose« nannte und dem Rückstand den Namen Amylocellulose beilegte. Übrigens schlägt Maquenne später an Stelle von Amylocellulose den Ausdruck Amylose vor. Jedenfalls charakterisieren die Nägelischen Bezeichnungen die morphologischen Verhältnisse sehr gut.

<sup>4)</sup> Die Methode zur Molekulargewichtsbestimmung wurde bereits in der letzten Mitteilung ausreichend besprochen, so daß hier nur die Endresultate aufgeführt werden.

letzten Mitteilung angegebene Molekulargröße der Stärke ist somit lediglich eine Durchschnittszahl. Dasselbe gilt für die lösliche Stärke.

In nachfolgender tabellarischer Übersicht sind die Molekulargrößen der Stärkebestandteile und Stärkeabbauprodukte vergleichend zusammengestellt. Obwohl die Mehrzahl der Hydrosole durch Lösen in Wasser und Fällen mit Alkohol gereinigt wurden, ist keine Garantie vorhanden, daß nicht dennoch Gemische vorliegen. Immerhin gibt die Tabelle ein Bild der bestehenden Verhältnisse:

Name	Inversionsquotient vergl. mit Dextrose	Mittel aus Anzahl von Versuchen	Inversionsquotient vergl. mit Maltose	Mittel aus Anzahl von Versuchen
	n		n	
Achroodextrin <sup>1)</sup> . . . .	4.3	8	3.8	2
Erythrodextrin <sup>2)</sup> . . . .	4.8	7	4.1	6
Lösliche Stärke . . . .	6.4	5	5.9	7
Stärke (natürl. Gemisch) .	7.2	2	6.8	8
Granulose, leicht lösl. Teil	5.2	8	5.1	2
Granulose, schwer lösl. Teil	6.0	1	—	—
Stärkecellulose, Rückstand bei einmal. Auskochen	7.3	2	—	—
Stärkecellulose, Rückstand nach mehrmaliger Aus- kochen . . . . .	8.0	3	7.7	2

Die Zahl n, der Inversionsquotient, bedeutet die Anzahl Dextrose-moleküle, in die das Polysaccharid zerfällt. Natürlich kann n nur eine ganze Zahl sein. Die Bruchzahl der Tabelle rührt davon her, daß keine einheitlichen Körper vorliegen, bezw. die Methode Schwankungen zuläßt.

Die Berechnung des Molekulargewichts geschieht nach der allgemeinen Formel für Polysaccharide,  $(C_6H_{10}O_5)_n + H_2O$ , wenn man für n die entsprechende ganze Zahl einsetzt.

Die Tabelle zeigt, daß dem Achroodextrin annähernd dieselbe Molekulargröße zukommt wie dem Erythrodextrin. Es ist demnach zweifelhaft, ob das Achroodextrin als ein Abbauprodukt des Erythrodextrins aufgefaßt werden kann<sup>3)</sup>.

<sup>1)</sup> Das durch Inversion von Stärke mit Oxalsäure hergestellte Achroodextrin, sowie die folgenden Daten verdanke ich Hrn. Prof. Lintner: Reduktion berechnet auf Maltose  $R = 15\%$ . Spez. Drehungsvermögen  $[\alpha]_D = 188$ . Nach Roultcher Gefrierpunktsbestimmung ist die Molekulargröße = 1500. Produkt enthält etwa 70% Achroodextrin I und 30% Achroodextrin II.

<sup>2)</sup> Spez. Drehungsvermögen  $[\alpha]_D = 195$ .

<sup>3)</sup> Moreau, Biochem. Zentralbl. 3, 648.

Das Molekül des Leberglykogens<sup>1)</sup> wurde als aus 10 Hexosen bestehend gefunden; das Molekulargewicht berechnet sich demnach gemäß der Formel  $(C_6H_{10}O_5)_{10} + H_2O$  auf 1638. Kaninchenleber- und Hundeleber Glykogen besitzen dieselbe Molekulargröße; es ist daher wahrscheinlich, daß alle Leberglykogene chemisch identisch sind. Ob dies auch für Muskelglykogen zutrifft, ist zurzeit noch nicht entschieden.

### Experimenteller Teil.

#### Unterscheidung der primären von den sekundären und tertiären Alkoholen.

Man fertigt sich zunächst von den zu vergleichenden Alkoholen  $\frac{1}{100}$ -Normallösungen ( $\frac{n}{100}$ ) an, füllt in die bereitgehaltene Serie von sogen. 200 g-Gläsern mit weiter Öffnung 10 bzw. 20 ccm und ergänzt mit Wasser auf 100 ccm, so daß man also mit  $\frac{n}{1000}$ - bzw.  $\frac{n}{500}$ -Lösungen arbeitet<sup>2)</sup>.

Weiter hat man pro Ansatz etwa 0.4 g *p*-Phenylhydrazinsulfosäure genau abgewogen, am zweckmäßigsten in der Weise, daß man das Hydrazin für sämtliche Versuche auf einmal abwägt, in abgemessener Menge Wasser unter Zusatz der zur Lösung erforderlichen Natronlauge auflöst und dann die Lösung gleichmäßig auf die Versuche verteilt. Hat man z. B. 18 Ausätze, so löst man 7.2 g Hydrazinsulfosäure in 20 ccm Wasser unter Zusatz von 1 ccm Natronlauge, 33-prozentig, und entnimmt dieser Lösung pro Ansatz 1 ccm. Es ist gleichgültig, ob man 0.3 oder 0.4 g des Hydrazins verwendet, aber es soll jeder Versuch unter genau gleichen Bedingungen bereitet sein. Diese Lösung muß immer frisch hergestellt sein. Gleich nach Zugabe derselben werden 25 ccm Natronlauge, 33-prozentig, hinzugefügt und innerhalb der ersten 2—3 Stunden alle 15 Minuten umgeschüttelt. Dies ist wichtig für eine gleichmäßige Entwicklung des Farbstoffs. Der Vergleich<sup>3)</sup> der Farblösungen erfolgt am besten nach 7—8 Stunden.

<sup>1)</sup> Das mehrfach gereinigte Glykogen wurde nach vorausgegangener Inversion nach der Allihnschen Methode analysiert. Das früher untersuchte, käufliche Produkt erwies sich als stark eiweißhaltig. Glykogen darf bei den Farbversuchen keine Schaumbildung zeigen. Schaum deutet auf Eiweißgehalt.

<sup>2)</sup> Die Empfindlichkeitsgrenze steigt bei Verwendung von mehr Alkali von  $\frac{n}{200}$  auf  $\frac{n}{1000}$  (vergl. die erste Mitteilung loc. cit.).

<sup>3)</sup> Die colorimetrische Bestimmung des Molekulargewichts geschieht am zweckmäßigsten in gleich großen Glasgefäßen von 2 cm Breite, 2 cm Tiefe und 10 cm Höhe. Man füllt in jedes Glas 20 ccm der Farblösung und vergleicht auf weißer Unterlage. Ein derartiger Apparat wurde von den »Verreinigten Fabriken für Laboratoriumsbedarf«, Berlin NW., angefertigt.

Soll die Färbung mehrere Tage konserviert werden, so kann dies durch Zugabe einer abgemessenen Quantität 33-prozentiger Natronlauge (beispielsweise 30 ccm) geschehen. Dies soeben beschriebene Verfahren ist auch zur colorimetrischen Molekulargewichtsbestimmung von Kohlehydraten empfehlenswert, nur wird man in einer Verdünnung von  $\frac{1}{2000}$  Normallösung arbeiten. Die Färbung wird auch hier durch Zusatz von Natronlauge fixiert, doch muß die Farbstoffbildung vollendet sein (dies ist nach 5—6 Stunden der Fall), weil die Lauge andernfalls auf die Kolloide ausfällend wirkt und dadurch die Reaktion hemmt, was natürlich zu unrichtigen Resultaten führt.

Zur Feststellung der Gesetzmäßigkeit, daß primäre Alkohole sich nach dem soeben beschriebenen Verfahren von den sekundären und tertiären scharf unterscheiden lassen, wurden als Vertreter der primären Alkohole zur Untersuchung herangezogen: Methyl-, Äthyl-, *n*-Propyl-, Isobutyl- und Gärungs-(Iso-)Amyl-Alkohol<sup>1)</sup>, als Vertreter der sekundären: Isopropyl- und sekundärer Amyl-Alkohol, und schließlich Tertiär-Butylalkohol als Repräsentant der Carbinole.

Dieselben wurden in  $\frac{1}{500}$ - und  $\frac{1}{1000}$ -Normallösung gegen einen sogenannten Kontrollansatz, d. h. also lediglich mit Wasser (vergl. die frühere Mitteilung loc. cit.) verglichen und gefunden, daß sich die sekundären und tertiären Alkohole nur wenig vom Kontrollansatz unterscheiden, während die primären intensivrote Färbungen geben.

Zum Schluß sei bemerkt, daß sich die primären, sekundären und tertiären Amine gegen Phenylhydrazinsulfosäure verhalten wie die Alkohole, insofern sie auch die Reaktion zeigen. Aminosäuren, wie z. B. Glykokoll, liefern eine bordeauxrote Farbreaktion. Der Umstand, daß auch tertiäre Amine reagieren, zwingt zu der Annahme, daß die Methanwasserstoffatome sich an der Farbstoffbildung beteiligen.

Würzburg, Juni 1909.

---

<sup>1)</sup> Die Zahlen der letzten Mitteilung betr. Amylalkohol sind zu korrigieren:  
 lies 0.0440 anstatt 0.0375  
 und 0.0220 anstatt 0.01875.