

0.3443 g Sbst.: 18.73 ccm 0.1131-n. Baryt. — 0.2438 g Sbst.: 0.3278 g CO₂, 0.1240 g H₂O. — 0.2164 g Sbst.: 0.3060 g BaSO₄.

C₅H₉O₃NS (163.1). Ber. Äquiv.-Gew. 163.1, C 36.79, H 5.56, S 19.65.

Gef. „ „ 162.5, „ 36.67, „ 5.69, „ 19.42.

Stockholm, Organ.-chem. Laborat. d. Techn. Hochschule, Juli 1925.

340. Hans Heinrich Schlubach und Gertrud Rauchalles: Die Spaltung des γ -Methyl-fructosids durch Saccharasen. Zur Konfiguration des Rohrzuckers.

[Aus d. Chem. Laborat. d. Bayr. Akademie d. Wissensch. in München.]

(Eingegangen am 10. August 1925.)

Während die Enzym-Komplexe, die wir unter dem Namen α - und β -Glucosidase zusammenfassen, sowohl die Bindungen der Hexosen mit anderen Zuckern als auch diejenigen mit einfachen Alkoholen zu lösen vermögen, zeichnet sich das Invertin dadurch aus, daß es nur den Rohrzucker und diejenigen Derivate, die sich durch Veränderungen an seinem Glucose-Teil von ihm ableiten, wie die Raffinose, die Gentianose, die Stachyose u. a. zu hydrolysieren vermag. Denn nach E. Fischers Angabe wird ja das von ihm zuerst bereitete Methyl-fructosid von Invertin nicht verändert¹⁾, und ebenso finden C. S. Hudson und D. H. Brauns²⁾, daß Hefe-Enzyme das reine kristallisierte β -Methyl-fructosid nicht anzugreifen vermögen. Die letztgenannte Verbindung leitet sich nun unzweifelhaft von der normalen, stabilen Form der Fructose ab, während nach den Untersuchungen von W. N. Haworth und seinen Mitarbeitern³⁾ im Rohrzucker eine andere, höchst labile Form der Fructose, die sogenannte γ -Fructose, enthalten ist. Wenn wir den Angriffspunkt der Hefe-Saccharase in dem Fructose-Teil erblicken⁴⁾, so müssen wir ihr auch eine besondere Affinität zu eben dieser Form der Fructose zuerkennen. Falls eine Spaltung der Methylderivate der Fructose durch Invertin überhaupt möglich ist, sollte sie am ehesten bei den von dieser Form sich ableitenden zu erwarten sein.

Dies ist nun in der Tat der Fall. Das γ -Methyl-fructosid, wie es nach den Angaben von R. Ch. Menzies⁵⁾ als ein im wesentlichen aus den beiden stereoisomeren Formen des γ -Methyl-fructosids bestehendes Gemisch erhalten wird, wird durch Hefe-Invertin ebenso rasch wie Rohrzucker zu einem bestimmten Bruchteil, und nur zu diesem, gespalten.

Bevor wir auf die hierbei auftretenden Erscheinungen näher eingehen, ist es notwendig, hinsichtlich der Nomenklatur der in Frage kommenden Verbindungen eine Bemerkung einzuschalten. Das erste, von E. Fischer entdeckte Derivat eines labilen Zuckers, das γ -Methyl-glucosid⁶⁾, ist mit diesem Unterscheidungszeichen versehen worden, ohne daß damit über die Konstitution etwas Bestimmtes ausgesagt werden sollte. Die Bezeichnung ist dann auf die ganze Klasse der labilen Zucker übertragen worden; sie hat sich aber insofern als wenig glücklich erwiesen, als es sich in der Folgezeit

¹⁾ B. 27, 3479 [1894]. ²⁾ Am. Soc. 38, 1222 [1916].

³⁾ Soc. 109, 1322 [1916], 117, 1487 [1920], 123, 294, 308 [1923].

⁴⁾ R. Kuhn, Naturw. 11, 740 [1923]. ⁵⁾ Soc. 121, 2238 [1922].

⁶⁾ B. 47, 1980 [1914].

gezeigt hat, daß es sich hier nicht um neue stereoisomere, sondern um struktur-isomere Formen der Zucker handelt. Es sind demnach für zwei ganz verschiedene Arten von Isomerie die drei ersten aufeinander folgenden Zeichen des griechischen Alphabets zur Verwendung gekommen. Die hierdurch bedingte Verwirrung wird nun eine vollständige, nachdem jüngst⁷⁾ nachgewiesen werden konnte, daß diese γ -Zucker nach zwei stereoisomeren Formen Derivate zu bilden vermögen, die nach dem Vorbilde der normalen Zuckerderivate als die α - und β -Verbindungen bezeichnet werden müssen.

Wir möchten daher den Vorschlag machen, die Bezeichnungsweise der γ -Zucker durch diejenige der Hetero-Zucker, von ἕτερος, verschiedenartig abgekürzt mit dem lateinischen *h*, zu ersetzen. In dem Maße, in dem die Struktur der einzelnen *h*-Zucker ihre sichere Aufklärung gefunden hat, mag diese vorläufige Bezeichnung durch eine rationelle ersetzt werden.

Als wir *h*-Methyl-fructosid bei $+30^{\circ}$ mit einem Hefe-Invertin vom Zeitwert 0.26⁸⁾, für dessen Überlassung wir Hrn. Prof. R. Willstätter zu besonderem Danke verpflichtet sind, behandelten, sank innerhalb 35 Min. die Drehung von $+19.38^{\circ}$ auf $+6.90^{\circ}$ und blieb dann unverändert bei durchschnittlich $+6.36^{\circ}$. In der gleichen Zeit stieg der Reduktionswert von 2% auf 35% und machte dann ebenfalls bei diesem Wert halt. Erst nach 7 Tagen setzte sekundär ein ganz langsames weiteres Fallen der Drehung und damit verbunden ein ebenso langsames Ansteigen des Reduktionswertes ein. Es wird demnach ein bestimmter Teil des *h*-Methyl-fructosid-Gemisches gespalten, und zwar der Größenordnung nach ebenso rasch wie Rohrzucker, der andere Teil bleibt vollständig unverändert. Da während der Hydrolyse die Drehung nur von $+19.38^{\circ}$ auf $+6.36^{\circ}$ sank, die freigelegte Fructose aber nach den Beobachtungen von C. S. Hudson⁹⁾ fast augenblicklich in den Gleichgewichtswert der normalen Fructose von -90.9° übergeht, so muß der gespaltene Anteil selbst linksdrehend gewesen sein, mithin der mehr linksdrehende Teil des Gemisches der beiden stereoisomeren Formen oder daher nach der Bezeichnungsweise von C. S. Hudson das β -Methyl-fructosid. Die Hefe-Saccharase hat demnach das β -*h*-Methyl-fructosid gespalten und muß daher im Gegensatz zu der bisher gebräuchlichen Bezeichnung als eine β -*h*-Fructo-Saccharase bezeichnet werden.

Nach den im Versuchsteil gegebenen Ansätzen berechnet sich die Drehung des durch Invertin gespaltenen Anteils, also des β -*h*-Methyl-fructosids, aus den obigen Zahlen zu $[\alpha]_D = -17^{\circ}$, diejenige des ungespaltenen Teiles zu $[\alpha]_D = +36.36^{\circ}$. Der letztere stellt nun aber nicht das reine α -*h*-Methyl-fructosid dar; denn es ist in ihm der ebenfalls ungespalten gebliebene Teil des normalen Methyl-fructosid-Gemisches enthalten, der in dem Ausgangsmaterial bereits vorhanden war. Dieser Anteil läßt sich auf Grund der folgenden Überlegungen der Größenordnung nach berechnen: Für die Drehungen der reduzierenden Gleichgewichts-Tetramethyl-*h*-fructose aus Inulin¹⁰⁾ und aus Rohrzucker¹¹⁾ sind die Werte von $+32.9^{\circ}$ und $+32.6^{\circ}$ gefunden worden, und wir wollen den höheren der beiden Werte als den wahrscheinlich richtigen

7) H. H. Schlubach und W. Rauchenberger, B. 58, 1186 [1925].

8) dargestellt nach einer im Druck befindlichen Arbeit: Über Invertin, X.

9) Am. Soc. 31, 655 [1909].

10) J. C. Irvine und E. St. Steele, Soc. 117, 1487 [1920].

11) W. N. Haworth, Soc. 117, 199 [1920].

annehmen. Aus seinem *h*-Methyl-fructosid von der Drehung $+26.6^{\circ}$ hat R. Ch. Menzies¹²⁾ eine entsprechende Tetramethyl-*h*-fructose von der Drehung $+24.69^{\circ}$ erhalten. Da diese Erniedrigung des Wertes gegenüber den aus Inulin und Rohrzucker erhaltenen Tetramethyl-fructosen nur auf einer Verunreinigung mit der normalen Tetramethyl-fructose beruhen kann, für die J. C. Irvine und J. Patterson¹³⁾ den Wert von -123.2° gefunden haben, so berechnet sich der Gehalt an dieser Verbindung und dementsprechend auch an normalem Methyl-fructosid-Gemisch im Ausgangsmaterial zu 6.7%.

Dieses ist also auch der Mindestgehalt an normalem Methyl-fructosid-Gemisch, der in dem nach der Einwirkung des Invertins ungespalten gebliebenen Anteil enthalten ist. Da dieses Gemisch eine Drehung von etwa -100° haben dürfte — eine genaue Berechnung ist nicht möglich, da das reine normale α -Methyl-fructosid noch unbekannt ist —, so ergibt es sich, daß selbst ein so geringer Anteil wie der oben berechnete sehr stark erniedrigend auf die Gesamtdrehung einwirken muß, die Drehung des reinen α -*h*-Methyl-fructosids daher bedeutend höher als $+36.36^{\circ}$ anzunehmen ist.

Wir haben die Richtigkeit unserer Berechnungen dadurch bestätigen können, daß wir die Drehung des unangegriffen gebliebenen Anteils nach Abtrennung von der freigelegten Fructose durch Extraktion mit Essigester gemessen haben. In guter Übereinstimmung fanden wir den Wert von $+35.53^{\circ}$, der also bedeutend höher liegt als derjenige des Ausgangsmaterials ($+19.38^{\circ}$).

Da die bei der Hydrolyse des β -*h*-Methyl-fructosids durch Invertin freigelegte β -*h*-Fructose eine höhere Drehung haben muß als ihr zugehöriges Methyl-fructosid, so sollte sich, wenn ihre Isomerisierung zum Gleichgewichtsgemisch der normalen Fructose wesentlich langsamer verläuft als ihre Freilegung durch das Invertin, primär ein Anstieg der Drehung beobachten lassen.

Um für die Beobachtung dieses Vorgangs möglichst günstige Bedingungen zu schaffen, haben wir nach dem Vorgange von C. S. Hudson¹⁴⁾ die Hydrolyse bei 0° verfolgt. Diese Erniedrigung der Temperatur sollte dann von Nutzen sein, wenn der Temperatur-Koeffizient der Isomerisierung der *h*-Fructose wesentlich größer ist als derjenige der Invertin-Wirkung. Dies scheint nun nicht der Fall zu sein, denn wir konnten kaum eine Andeutung einer Drehungszunahme in den ersten Minuten beobachten. Die Hydrolyse macht bei genau dem gleichen Wert wie bei dem bei $+30^{\circ}$ durchgeführten Versuch halt, nur ist bis zur Erreichung dieses Endwertes etwa die 8-fache Zeit erforderlich. Dieser Temperatur-Koeffizient entspricht also durchaus dem bei der Rohrzucker-Inversion beobachteten Wert von etwa 2.0¹⁵⁾.

Die Drehung des β -*h*-Methyl-fructosids berechnet sich aus diesem Versuch zu -14.5° , diejenige des ungespaltenen Anteiles zu $+39.1^{\circ}$. Entsprechend dem an der höheren Anfangsdrehung erkennbaren geringeren Gehalt an normalen Methyl-fructosiden wurde hier der Wert von $[\alpha]_D = +53.15^{\circ}$ gefunden. Durch die Art der Extraktion mit Essigester scheint in diesem Falle vorwiegend nur das α -*h*-Methyl-fructosid herausgeholt worden zu sein.

¹²⁾ Soc. **121**, 2241 [1922]. ¹³⁾ Soc. **121**, 2696 [1922].

¹⁴⁾ Am. Soc. **31**, 655 [1909].

¹⁵⁾ H. v. Euler und J. Laurin, H. **108**, 64 [1919].

Nach der Untersuchung von Th. Purdie und D. Mc. L. Paul¹⁶⁾ enthält auch das nach E. Fischer bereitete Methyl-fructosid-Gemisch einen erheblichen Anteil an *h*-Methyl-fructosiden und sollte dementsprechend und entgegen der Angabe von E. Fischer partiell gespalten werden. Dies ist auch der Fall. Ein nach E. Fischers Vorschrift hergestelltes Präparat mit einem Anfangs-Reduktionswert von 30% zeigte nach $\frac{1}{2}$ -stdg. Einwirkung des Invertins eine Zunahme um 12%, dann blieb der Reduktionswert konstant. Es ist demnach mehr als $\frac{1}{6}$ des vorhandenen Methyl-fructosids gespalten, und das Gemisch bestand bei Annahme des oben gefundenen Verhältnisses von $\frac{1}{3}$ β -*h*-Methyl-fructosid zu $\frac{2}{3}$ α -*h*-Methyl-fructosid zur Hälfte aus *h*-Methyl-fructosiden. Die bei dieser Hydrolyse eintretende Drehungsänderung ist sehr gering, und es ist denkbar, daß aus diesem Grunde E. Fischer die Einwirkung des Invertins entgangen ist.

R. Kuhn¹⁷⁾ hat auf Grund von Hemmungsversuchen, die von ihm bei der Rohrzucker-Inversion nach Zusätzen der beiden Formen der Glucose sowie der normalen Fructose beobachtet wurden, die Anschauung entwickelt, daß die Angriffstelle der Hefe-Saccharase im Fructose-Teil, diejenige der Saccharase aus *Aspergillus oryzae*, der Taka-Saccharase, aber in dem Glucose-Teil des Rohrzuckers zu suchen ist und demzufolge zwischen einer Fructo- und einer Gluco-Saccharase unterschieden. Diese Annahme hat später in viel bestimmterer Form ihren Eingang in die Literatur¹⁸⁾ gefunden, obgleich inzwischen die Beweiskraft der Argumente, die zu ihrer Aufstellung geführt hatten, dadurch an Wirksamkeit verloren hatte, daß sowohl von H. v. Euler und K. Josephson¹⁹⁾ als auch von R. Kuhn²⁰⁾ selbst gezeigt wurde, daß auch andere Hexosen und Pentosen, die in keinerlei Beziehung zu den Spaltstücken des Rohrzuckers stehen, wie z. B. die Galaktose, Xylose oder Arabinose, z. T. eine noch weit stärkere Hemmungswirkung zeigen als Glucose und Fructose. Nachdem unsere obigen Versuche gezeigt haben, daß dem Hefe-Invertin eine besondere Affinität nur zu der *h*-Fructose und nicht zu der gewöhnlichen Form der Fructose zugeschrieben werden muß, scheinen uns auch die Schlüsse, welche aus der Hemmungswirkung durch Zusätze von gewöhnlicher Fructose gezogen wurden, für die Frage der Affinität des Invertins zu einem der Bestandteile des Rohrzuckers ebensowenig Bedeutung zu haben wie etwa die Zusätze von Galaktose. Als einziges Argument bleibt daher nur das verschiedene Verhalten der Hefe- und der Taka-Saccharasen gegenüber Zusätzen von α -Glucose übrig. Allein auch dieses wird hin-fällig angesichts der Tatsache, daß *h*-Methyl-fructosid ebenso glatt wie Rohrzucker auch durch Taka-Saccharase, für deren Überlassung wir Hrn. Prof. Willstätter ebenfalls sehr zu Dank verpflichtet sind, hydrolysiert wird. Entsprechend der komplexen Natur dieses Enzym-Gemisches geht hier die Hydrolyse sogar über den bei der Hefe-Saccharase gefundenen Bruchteil hinaus und steigt bis zu 69%.

Diese Erscheinung findet ihre einfachste Deutung darin, daß in der Taka-Diastase neben der β -*h*-Fructo-Saccharase ein Enzym enthalten ist, welches auch das α -*h*-Methyl-fructosid anzugreifen vermag. Ist diese Annahme zutreffend, so sollte der durch Hefe-Saccharasen nicht weiter

¹⁶⁾ Soc. **91**, 289 [1907]. ¹⁷⁾ H. **129**, 57 [1923].

¹⁸⁾ Oppenheimer-Kuhn, Die Fermente, 5. Aufl., S. 567 [1925].

¹⁹⁾ H. **132**, 301 [1923/24]. ²⁰⁾ H. **135**, 1 [1923/24].

hydrolysierbare Rest des *h*-Methyl-fructosids durch Taka-Enzym weiter gespalten werden. Der Versuch hat auch dies bestätigt; denn der nach der vollendeten Einwirkung des Hefe-Invertins bei 0° auf *h*-Methyl-fructosid zurückgebliebene Anteil von der Drehung +53.15° wurde durch Taka-Enzym noch bis zu 30% weiter hydrolysiert. Die Annahme einer α -*h*-Fructo-Saccharase in der Taka-Diastase neben der β -*h*-Fructo-Saccharase erscheint daher nicht unbegründet, sie bedarf jedoch noch wegen der Unsicherheit der optischen Beobachtungen der weiteren experimentellen Bestätigung.

Der eingangs hervorgehobene Unterschied zwischen α - und β -Glucosidasen einerseits und den Saccharasen der Hefe und des *Aspergillus oryzae* andererseits besteht also nicht mehr; denn die letzteren vermögen nicht nur den Rohrzucker und seine Derivate, sondern ebenso glatt das *h*-Methyl-fructosid zu spalten.

Während die Konstitution des Rohrzuckers durch die Untersuchungen von W. N. Haworth und seinen Mitarbeitern eine weitgehende Klärung erfahren hat, besteht hinsichtlich der Konfiguration noch eine Unstimmigkeit. E. F. Armstrong²¹⁾ und besonders C. S. Hudson²²⁾ haben mit Sicherheit nachweisen können, daß die Glucose im Rohrzucker in der α -Form von der Drehung +109° enthalten ist. Der letztere Forscher hat dann auf Grund der Beobachtung, daß die Fructose aus dem Rohrzucker durch Invertin bei 0° anfänglich ohne Drehungsänderung freigelegt wird, für die Fructose den Drehungswert von +17° berechnet. Unabhängig hiervon gelangt man zu einem ähnlichen Wert auf Grund der folgenden Überlegung: Der Rohrzucker hat mit der α, β -Trehalose die eine Hälfte des Moleküls, die α -Glucose, gemeinsam; die andere Hälfte, die Fructose, entspricht der β -Glucose in der α, β -Trehalose. Nach der Hypothese der optischen Superposition muß demnach die Fructose in ihrem Wert der β -Glucose entsprechen. Für die α, β -Trehalose hat nun C. S. Hudson²³⁾ den Wert von +70° berechnet, Rohrzucker zeigt +66.5° und β -Glucose +19°. Demnach muß die Fructose etwa 3° niedriger drehen als die β -Glucose, also etwa +16°.

Da nun von der stabilen Fructose nur die reine β -Form bekannt ist (-133.5°), nahm C. S. Hudson an, daß die Fructose von der Drehung +17° die zugehörige α -Form sei, und daß dementsprechend die Fructose im Rohrzucker in der α -Form enthalten ist. Andererseits hatte aber dieser Forscher auf Grund der Auffassung der Fructose als Derivat der *d*-Arabinose²⁴⁾ berechnet, daß ihre α -Form eine Drehung von -77° zeigen müßte. Er vermochte sich diese Unstimmigkeit nicht zu erklären, weil es damals noch nicht bekannt war, daß die Fructose des Rohrzuckers von der normalen, stabilen Fructose vollständig verschieden ist. Sie blieb deshalb auch weiter bestehen, als C. S. Hudson und E. Yanovsky²⁵⁾ auf Grund von Löslichkeitsversuchen zu dem Wert von -21° für die α -Fructose gelangten.

Mit Hilfe unserer Beobachtungen bei der Spaltung des *h*-Methyl-fructosids durch Invertin läßt sich nun auch diese letzte Unsicherheit beseitigen. Die im Rohrzucker vorkommende Form der Fructose von der Drehung von +17° ist die β -Form der *h*-Fructose, der von dem *h*-Methyl-fructosid-Gemisch durch Invertin gespaltenen Teil von der Drehung von 17° ist das zu dieser Form gehörige β -*h*-Methyl-fructosid.

²¹⁾ Soc. 83, 1305 [1903]. ²²⁾ Am. Soc. 31, 655 [1909].

²³⁾ Am. Soc. 38, 1571 [1916]. ²⁴⁾ Am. Soc. 31, 78 [1909].

²⁵⁾ Am. Soc. 38, 1025 [1916].

Zeit in Tagen	0	1	3	4	5	6	9	11	18
Drehung in °	+19.38	5.52	6.77	6.4	5.91	6.33	4.63	3.15	3.55
Reduktionswert in % .	2.0	35.0	—	34.7	—	—	—	37.8	—

Nach 18-tägigem Stehen wurde der Versuch abgebrochen, die Lösung filtriert und bei Zimmertemperatur im Vakuum zur Trockne verdampft, der Rückstand im Hochvakuum getrocknet und die Drehung in Wasser bestimmt. Da einige Flocken ungelöst blieben, so stellt sie den Minimalwert dar:

$$[\alpha]_D^{23} = + (0.054^0 \times 100) / (0.5 \times 0.3040) = +35.5^0.$$

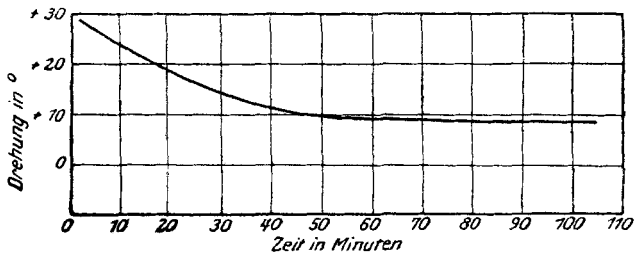
Die Berechnung der Werte des ungespaltenen sowie des gespaltenen Anteils erfolgte folgendermaßen:

Ist α der ungespaltene Anteil, d. h. das Gemisch aus α -*h*-Methyl-fructosid und den beiden normalen Methyl-fructosiden, 33 % der Grad der Spaltung und -90.9^0 der Gleichgewichtswert der normalen Fructose, so wird: $\alpha + 0.33 (-90.9^0) = +6.36^0$, wo letztere Zahl der Mittelwert der Drehung der ersten 5 Tage bedeutet. Hieraus berechnet sich für $\alpha = +36.36^0$, was in guter Übereinstimmung mit dem gefundenen Wert von $+35.5^0$ steht. Ist β die Drehung des gespaltenen Teiles, d. h. des β -*h*-Methyl-fructosids, so gilt die Gleichung: $\alpha + \beta = +19.38^0$. Hieraus ergibt sich für $\beta = -17^0$.

3. Einwirkung von Invertin auf *h*-Methyl-fructosid bei 0°.

Die Anfangsdrehung des angewandten Präparates betrug in Wasser: $[\alpha]_D^{24} = + (0.20^0 \times 100) / (1 \times 0.8108) = +24.67^0$, der Reduktionswert im Mittel 2.3 %.

0.6216 g *h*-Methyl-fructosid wurden in 20 ccm Wasser gelöst, 1 ccm einer 10-proz. primären Kaliumphosphat-Lösung und 1 ccm des Invertin-Präparates zugegeben und auf 25 ccm aufgefüllt. Alle Lösungen waren vorher auf 0° gekühlt. Der Drehungsabfall ergibt sich aus der folgenden Kurve:



Der Reduktionswert nach $5\frac{1}{2}$ Stdn. ergab im Mittel 36 %, es waren also 33.7 % gespalten. Der Versuch wurde mit Sodalösung abgestoppt, die Lösung im Hochvakuum bei 0° unter Kühlung der Vorlage auf -78^0 zur Trockne verdampft und der Rückstand nach Zugabe von Glasperlen mehrfach mit Essigester extrahiert. Die Auszüge wurden bei $+10^0$ eingengt, im Hochvakuum getrocknet und die Drehung in Wasser bestimmt: $[\alpha]_D^{20} = + (0.081^0 \times 100) / (0.5 \times 0.3048) = +53.15^0$.

Unter Zugrundelegung des Anfangswertes von $+24.67^0$ und des Endwertes von $+8.5^0$ berechnet sich $\alpha = +39.1^0$ und $\beta = -14.5^0$. Der gefundene Wert ist also in diesem Falle bedeutend höher als der berechnete. Durch die Extraktion mit Essigester scheint überwiegend das α -*h*-Methyl-fructosid ausgezogen zu sein, während die normalen Methyl-fructoside zurückblieben.

4. Einwirkung von Invertin auf Methyl-fructosid nach E. Fischer.

Das nach den Angaben von E. Fischer dargestellte Methyl-fructosid-Gemisch zeigte eine Anfangsdrehung von $[\alpha]_D^{25} = -57.02^\circ$ in Wasser und einen Reduktionswert von 30.5 %.

0.4057 g wurden in 20 ccm Wasser gelöst, 1 ccm einer 10-proz. primären Kaliumphosphat-Lösung und 1 ccm des Invertin-Präparates zugegeben und auf 25 ccm aufgefüllt. Die Spaltung wurde bei $+30^\circ$ durchgeführt. Nach 5 Stdn. war der Reduktionswert auf 42.5 % gestiegen, blieb dann mehrere Tage konstant und erhöhte sich am 7. Tage auf 43.5 %. Die Drehung war nahezu konstant geblieben: -57.4° .

5. Einwirkung von Taka-Enzym auf *h*-Methyl-fructosid.

a) Verwandt wurde das gleiche Präparat von *h*-Methyl-fructosid von der Drehung $[\alpha]^{25} = +19.38^\circ$ und dem Anfangs-Reduktionswert von 2 %, das für den ersten Invertin-Versuch gedient hatte. Die Takamine-Diastase war von Sankyo & Co., Tokio, bezogen.

0.7252 g *h*-Methyl-fructosid wurden in wenig Wasser gelöst und 4 ccm $m/8$ -Dinatriumcitrat-Lösung + 1 ccm $n/10$ -Natronlauge zugegeben. 0.0181 g Taka-Diastase wurden in wenig Wasser aufgeschlämmt, der *h*-Methyl-fructosid-Lösung zugefügt, auf 25 ccm aufgefüllt und bei $+30^\circ$ stehen gelassen. Die Lösung war sehr trübe und die Drehung daher nach 3 Tagen nicht mehr ablesbar. Zum Vergleich der Wirksamkeit der Taka-Diastase wurde eine Rohrzucker-Lösung unter den gleichen Bedingungen gespalten:

Zeit in Tagen	0	$\frac{1}{6}$	1	3	7	11	16	17	23	24
Drehung in $^\circ$	+19.38	14.48	13.10	8.41	—	—	—	—	—	—
Reduktionswert in %	2	—	—	—	—	69.5	53.1	49.8	50.2	49.6
Rohrzucker:										
Drehung in $^\circ$	+65.35	57.78	11.93	-12.37	-12.8	—	—	—	—	—
Reduktionswert in %	—	—	—	—	—	100.6	99.5	—	—	—

b) Bei einem zweiten Versuch wurde wegen der Trübung auf die Ableseung der Drehungen ganz verzichtet und nur die Veränderung des Reduktionswertes verfolgt. Der Anfangs-Reduktionswert des Präparats betrug im Mittel 2.3 %. Die Konzentration der Taka-Diastase wurde bedeutend höher gewählt.

0.2703 g *h*-Methyl-fructosid wurden in Wasser gelöst, 8 ccm $m/8$ -Dinatriumcitrat-Lösung + 2 ccm $n/10$ -Natronlauge sowie eine Lösung von 0.2047 g Taka-Diastase in 30 ccm Wasser hinzugefügt und auf 50 ccm aufgefüllt. Der Versuch wurde ebenfalls bei $+30^\circ$ durchgeführt.

Zeit in Tagen	0	1	2	3	4
Reduktionswert in %	2.3	38.7	41.9	43.1	44.3

6. Einwirkung von Taka-Enzym auf die Essigester-Extrakte von der Invertin-Spaltung.

Der bei der Spaltung des *h*-Methyl-fructosids mit Invertin bei 0° erhaltene Essigester-Extrakt von der Drehung $[\alpha]_D^{20} = +53.15^\circ$ und dem Anfangs-Reduktionswert von 5.3 % wurde mit Taka-Diastase behandelt:

0.0610 g des Rückstandes wurden in wenig Wasser gelöst, 8 ccm $m/8$ -Dinatriumcitrat-Lösung + 2 ccm $n/10$ -Natronlauge und 0.1020 g in wenig Wasser gelöste Taka-Diastase zugegeben, auf 50 ccm aufgefüllt und der Versuch bei $+30^\circ$ durchgeführt:

Zeit in Tagen	0	1	3
Reduktionswert in %	5.3	10.6	30.0

Blindversuche mit dem angewandten Invertin-Präparat und der Taka-Diastase zeigten keinerlei Reduktion der Fehlingschen Lösung.

7. Hydrolyse des *h*-Methyl-fructosids mit Salzsäure.

Um für den Gehalt des Präparates an *h*-Methyl-fructosid unabhängig von den Enzym-Versuchen einen Anhaltspunkt zu gewinnen, haben wir seine Hydrolyse mit Salzsäure verschiedener Konzentration und bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Die Anfangsdrehung in Wasser betrug: $[\alpha]_D^{20} = + (0.160 \times 100) / (2 \times 0.3126) = + 25.59^\circ$.

a) 0.5408 g *h*-Methyl-fructosid wurden in 100 ccm n_{11} -Salzsäure gelöst und 30 Min. bei $+96^\circ$ gelassen. Die Lösung färbte sich stark gelb und zeigte nach Abkühlen auf Zimmertemperatur: $[\alpha]_D^{20} = - (0.398^\circ \times 100) / (1 \times 0.5408) = - 73.59^\circ$. Die Bestimmung des Reduktionswertes ergab 95.9 %.

b) 0.3745 g *h*-Methyl-fructosid wurden in 100 ccm n_{100} -Salzsäure gelöst und 30 Min. bei 96° stehen gelassen: $[\alpha]_D^{21} = - (0.35^\circ \times 100) / (1 \times 0.3745) = - 93.46^\circ$. Reduktionswert: 97.2 %.

c) Die polarimetrische Verfolgung der Hydrolyse mit n_{110} -Salzsäure bei Zimmertemperatur (Mittel 20°) bestätigte die Angaben von R. Ch. Menzies. Außerdem wurde die Änderung des Reduktionswertes bestimmt:

Zeit in Minuten	0	4	10	17	25	30	85	275
Drehung in $^\circ$. . .	+ 25.32	23.37	22.07	28.89	24.02	22.72	17.53	18.83
Zeit in Tagen	0	$\frac{1}{8}$	1	2	3	6	7	
Drehung in $^\circ$	+ 25.32	18.83	5.52	- 23.04	- 48.69	- 77.19	- 70.43	
Reduktionswert in % .	0	5	18.8	39.1	54.6	78.5	—	
Zeit in Tagen	9	10	13	14	15	23		
Drehung in $^\circ$	- 80.49	- 77.9	- 77.9	- 77.27	- 77.9	- 91.92		
Reduktionswert in % .	—	88.6	—	—	104.9	—		

341. B. M. Margosches und Erwin Scheinost: Über die quantitative Kjeldahlisation der Nitrate mit Phenol-schwefelsäure und Kaliumsulfat. (Im Versuchsteil mitbearbeitet von Viktor Woynar¹⁾.)

[Aus d. Laborat. f. chem. Technologie I d. Deutsch. Techn. Hochschule Brünn.]

(Eingegangen am 24. Juni 1925.)

Die bereits von Kjeldahl²⁾ festgestellte Fähigkeit organischer Substanz, Nitrat-Stickstoff zu fixieren, führte Asboth, Arnold, Jodlbauer und andere auf den Gedanken, daß es sich bei der Kjeldahlisation von Nitraten primär um eine Nitrierung der zugesetzten organischen Substanz handle, ein Moment, welches den Weg zu einer vollständigen Kjeldahlisation, demgemäß zu einer quantitativen Bestimmung des Nitrat-Stickstoffes weisen konnte.

Jene organischen Verbindungen, die sich leicht nitrieren lassen, wie Benzoessäure, Phenol und Salicylsäure wurden in erster Linie für den genannten Zweck in Anwendung gebracht.

¹⁾ Vorliegende Arbeit bildet eine Fortsetzung der in Gemeinschaft mit Erwin Vogel, B. 52, 1992 [1919], 55, 1380 [1922], und mit Wilhelm Kristen und Erwin Scheinost, B. 56, 1943 [1923], veröffentlichten Kjeldahlisations-Studien.

Margosches.

²⁾ J. Kjeldahl, Fr. 22, 366 [1883]; siehe auch: A. v. Asboth, C. 1866, 16, und R. Warrington, Fr. 25, 427 (Ref.) [1886].